

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS



“EXTRACTOS DE MAQUI Y CALAFATE INHIBEN MECANISMOS INFLAMATORIOS CARACTERÍSTICOS DE LA OBESIDAD, EN UN MODELO *IN VITRO* DE ADIPOCITOS Y MACRÓFAGOS HUMANOS”

Memoria para optar al título profesional de Bioquímica, presentado a la Universidad de Chile por:

ANGÉLICA PAZ OVALLE MARÍN

DIRECTOR

Dr. Diego García Díaz
Laboratorio Genómica Nutricional
Departamento de Nutrición
Facultad de Medicina
Universidad de Chile

PATROCINANTE

Dra. Lorena García Nanning
Departamento de Bioquímica y
Biología Molecular
Facultad de Ciencias Químicas y
Farmacéuticas
Universidad de Chile

SANTIAGO-CHILE

Enero 2015

FINANCIAMIENTO

Esta memoria de título fue financiada por el proyecto FONDECYT 11110219

PRESENTACIÓN EN CONGRESOS CIENTÍFICOS

Ovalle-Marín A, Vásquez K, Fuentes F, Reyes-Farías M, Parra C, Quitral V, Jimenez P, García-Díaz DF. “Efecto de extractos de frutos nativos chilenos, Maqui y Calafate, sobre la expresión génica de biomarcadores de inflamación en macrófagos y adipocitos humanos *in vitro*”. XXV Congreso Chileno de Endocrinología y Diabetes (SOCHED). Punta Arenas, Chile. 5-7 de noviembre 2014.

García-Díaz DF, Reyes-Farías M, **Ovalle-Marín A**, Hernando C, Parra C, Jiménez P, Quitral V. “Extract of Chilean native fruits Inhibit inflammation, oxidative stress and insulin-resistance of adipocytes induced by macrophages conditioned media treatment”. 14th International Nutrition & Diagnostic Conference (INDC). Praga, República Checa. Septiembre 2014.

Reyes-Farías M, Vasquez K, Fuentes F, **Ovalle-Marín A**, Lorenzo C, Morales R, Ossandon C, Torres G, Jiménez P, Quitral V, García-Díaz DF. “Efecto de los extractos de frutos nativos chilenos sobre la expresión génica de marcadores de inflamación de macrófagos de ratón”. XXIV Congreso Chileno de Endocrinología y Diabetes (SOCHED). Viña del mar, Chile. 7-9 de noviembre 2013.

Reyes-Farías M, Vasquez K, Fuentes F, **Ovalle-Marín A**, Jiménez P, Quitral V, García-Díaz DF. “Extractos de frutos nativos Chilenos, Maqui y Calafate, inhiben la expresión génica de marcadores de inflamación en adipocitos en un modelo *in vitro* de inflamación ligada a obesidad”. XXIV Congreso Chileno de Endocrinología y Diabetes (SOCHED). Viña del mar, Chile. 7-9 de noviembre 2013.

PUBLICACIONES

Reyes-Farias Marjorie, Vasquez Karla, **Ovalle-Marin Angelica**, Fuentes Francisco, Parra Claudia, Quitral Vilma, Jimenez Paula, and Garcia-Diaz Diego F. "Chilean Native Fruit Extracts Inhibit Inflammation Linked to the Pathogenic Interaction Between Adipocytes and Macrophages". Journal of Medicinal Food. Octubre, 2014.

Diego F García-Díaz, Marjorie Reyes-Farias, **Angelica Ovalle-Marin**. "Compuestos bioactivos e inflamación ligada a obesidad". Revista chilena de endocrinología y diabetes. Enero, 2014.

AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer a todas las personas que han contribuido a que esta Memoria de Título se lleve a cabo. Principalmente, a mis padres, Angélica y Patricio, por ser un apoyo esencial en este proceso, por su amor y ánimo diario. Una mención honrosa a mi madre por ser mi compañera de interminables horas de estudio nocturno y por los ángeles que me comparte. A mis hermanos, Manuel y Javier, que han nacido y crecido junto con esta carrera, aportando cuotas de ternura y risas antiestrés. A mi familia, en especial a mi tía Patricia, Oscar y tía Malú, por siempre apoyar los caminos que decido recorrer.

A Diego, mi director de Memoria, por su disposición a enseñar acompañando en cada paso, por dar espacio para proponer nuevas ideas y por su constante motivación. A mis compañeros y compañeras del laboratorio, en especial a Marjorie, Claudia, Francisco y Carolina, por hacer del laboratorio un lugar acogedor y acontecido donde trabajar y llenar de anécdotas mis días.

A los Lantánidos, Fernanda y Carlos, por encontrarnos desde el comienzo BQ y por la amistad linda que construimos. A los CEBQ, Macarena, Roberto y Gonzalo, por el cariño y hacer de mi paso en la U algo más que sólo estudiar.

A mis amigas/os de la vida, Nicolás, Natalia, Marina, Belén, Catalina y Tiare, por estar pendientes de mis logros y miedos, impulsándome siempre a continuar y crecer.

A Luis del Laboratorio de Virología, a Daniela y Claudia del Laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular, a Marcela, Cecilia y Lautaro del INTA, a Karla del Departamento de Nutrición, por compartir sus conocimientos, enseñar técnicas que apliqué en mi trabajo y facilitar sus equipos.

A la 36ª Comisaría y Los Quillayes en La Florida, por haber recuperado mi bitácora de Memoria y permitir que procesase todos los datos.

ÍNDICE GENERAL	Páginas
ÍNDICE GENERAL	i
ÍNDICE DE FIGURAS	ii
ÍNDICE DE TABLAS	iii
ABREVIATURAS	iv
RESUMEN	iv
SUMMARY	vi
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Obesidad en Chile y prevalencia	1
1.2. Fisiopatología e inflamación asociada a obesidad	2
1.3. Obesidad y estrés oxidativo	5
1.4. Comorbilidades de la obesidad	6
1.5. Compuestos bioactivos con potencial beneficioso en la salud	7
1.6. Frutos nativos chilenos: maqui y calafate	10
2. HIPÓTESIS	14
3. OBJETIVOS	14
3.1. Objetivo general	14
3.2. Objetivos específicos	14
4. MATERIALES Y MÉTODOS	15
4.1. Extractos de frutos nativos	15
4.2. Cultivos celulares	15
4.2.1. Cultivo de línea celular de macrófagos humanos y tratamientos	15
4.2.2. Cultivo de línea celular comercial de adipocitos humanos y tratamientos	16
4.3. Expresión génica de citoquinas y adipoquinas	18
4.4. Secreción proteica de citoquinas y adipoquinas	19
4.5. Liberación de Óxido Nítrico	19
4.6. Viabilidad celular	20

4.7.	Muerte celular	20
4.8.	Adipogénesis	20
4.9.	Lipólisis	20
4.10.	Marcadores fosforilados de cascadas de señalización proinflamatoria y de señalización de la insulina.	21
4.11.	Glutati3n reducido (GSH), oxidado (GSSG) y raz3n GSSG/GSH.	21
4.12.	Enzimas antioxidantes	22
4.13.	Captaci3n de glucosa	22
4.15.	Análisis estadístico	22
5.	RESULTADOS	24
5.1.	Efecto anti-inflamatorio de los extractos de maqui y calafate sobre macrófagos humanos activados con LPS <i>in vitro</i> .	24
5.1.1.	Efecto sobre la liberaci3n de óxido nítrico.	24
5.1.2.	Efecto sobre la viabilidad y muerte celular.	25
5.1.3.	Efecto sobre la expresi3n génica y la secreci3n proteica de marcadores de inflamaci3n.	26
5.2.	Efecto antilipolítico y adipogénico de los extractos de maqui y calafate sobre adipocitos humanos activados con TNF- α <i>in vitro</i> .	29
5.2.1.	Efecto sobre la adipogénesis.	29
5.2.2.	Efecto sobre la lipólisis.	30
5.3.	Efecto anti-inflamatorio de los extractos de maqui y calafate sobre adipocitos humanos activados con TNF- α <i>in vitro</i> .	30
5.3.1.	Efecto sobre la viabilidad y muerte celular.	30
5.3.2.	Efecto sobre la expresi3n génica y la secreci3n proteica de marcadores de inflamaci3n.	31
5.3.3.	Efecto sobre marcadores fosforilados de cascadas de señalización proinflamatoria.	33
5.4.	Efecto antioxidante de los extractos de maqui y calafate sobre adipocitos humanos activados con TNF- α <i>in vitro</i> .	34
5.4.1.	Efecto sobre el glutati3n oxidado, glutati3n reducido y la raz3n glutati3n oxidado/glutati3n reducido.	34
5.4.2.	Efecto sobre la actividad de enzimas antioxidantes.	36

5.5.	Efecto insulino-sensibilizador de los extractos de Maqui y Calafate sobre adipocitos humanos resistentes a insulina inducidos por inflamación <i>in vitro</i> .	36
5.5.1.	Efecto sobre la captación de glucosa.	36
5.5.2.	Efecto sobre la viabilidad celular.	37
5.5.3.	Efecto sobre un marcador fosforilado de la cascada de señalización de la insulina.	38
6.	DISCUSIÓN	39
6.1.	Efecto anti-inflamatorio de los extractos de Maqui y Calafate sobre macrófagos humanos activados con LPS <i>in vitro</i> .	39
6.2.	Efecto antilipolítico y adipogénico de los extractos de Maqui y Calafate sobre adipocitos humanos activados con TNF- α <i>in vitro</i> .	41
6.3.	Efecto anti-inflamatorio de los extractos de Maqui y Calafate sobre adipocitos humanos activados con TNF- α <i>in vitro</i> .	42
6.4.	Efecto antioxidante de los extractos de Maqui y Calafate sobre adipocitos humanos activados con TNF- α <i>in vitro</i> .	44
6.5.	Efecto insulino-sensibilizador de los extractos de Maqui y Calafate sobre adipocitos humanos resistentes a insulina inducidos por inflamación <i>in vitro</i> .	45
7.	CONCLUSIONES	47
8.	BIBLIOGRAFÍA	48

ÍNDICE DE FIGURAS	Páginas
Figura 1 : Polarización de macrófagos a diferentes estados de activación	3
Figura 2 : Mecanismo molecular de inflamación del tejido adiposo por sobrenutrición	5
Figura 3 : Activación de macrófagos THP-1.	24
Figura 4 : Liberación de ON en macrófagos THP-1.	25
Figura 5 : Viabilidad celular y Muerte celular de macrófagos THP-1 inducida por LPS.	26
Figura 6 : Expresión génica y secreción de TNF- α en macrófagos.	27
Figura 7 : Expresión génica y secreción de IL-6 en macrófagos.	28
Figura 8 : Expresión génica de iNOS en macrófagos.	28
Figura 9 : Expresión génica de IL-10 en macrófagos.	29
Figura 10 : Diferenciación de preadipocitos a adipocitos.	29
Figura 11 : Lipólisis inducida por TNF- α .	30
Figura 12 : Viabilidad celular y Muerte celular de adipocitos inducida por TNF- α .	31
Figura 13 : Expresión génica y secreción de MCP-1 en adipocitos.	32
Figura 14 : Expresión génica y secreción de IL-6 en adipocitos.	32
Figura 15 : Expresión génica y secreción de Adiponectina en adipocitos.	33
Figura 16 : Marcadores fosforilados de cascadas de señalización proinflamatoria en adipocitos.	34
Figura 17 : Niveles de glutatión oxidado y reducido, y la razón entre glutatión oxidado/reducido en adipocitos.	35
Figura 18 : Actividad de enzimas antioxidantes en adipocitos.	36
Figura 19 : Captación de glucosa en adipocitos con insulino-resistencia inducida por inflamación.	37
Figura 20 : Viabilidad celular de adipocitos con insulino-resistencia inducida por inflamación.	37
Figura 21 : Fosforilación de PI3K en adipocitos con insulino-resistencia inducida por inflamación.	38

ÍNDICE DE FIGURAS	Páginas
Figura 1 : Polarización de macrófagos a diferentes estados de activación	3
Figura 2 : Mecanismo molecular de inflamación del tejido adiposo por sobrenutrición	5
Figura 3 : Activación de macrófagos THP-1.	24
Figura 4 : Liberación de ON en macrófagos THP-1.	25
Figura 5 : Viabilidad celular y Muerte celular de macrófagos THP-1 inducida por LPS.	26
Figura 6 : Expresión génica y secreción de TNF- α en macrófagos.	27
Figura 7 : Expresión génica y secreción de IL-6 en macrófagos.	28
Figura 8 : Expresión génica de iNOS en macrófagos.	28
Figura 9 : Expresión génica de IL-10 en macrófagos.	29
Figura 10 : Diferenciación de preadipocitos a adipocitos.	29
Figura 11 : Lipólisis inducida por TNF- α .	30
Figura 12 : Viabilidad celular y Muerte celular de adipocitos inducida por TNF- α .	31
Figura 13 : Expresión génica y secreción de MCP-1 en adipocitos.	32
Figura 14 : Expresión génica y secreción de IL-6 en adipocitos.	32
Figura 15 : Expresión génica y secreción de Adiponectina en adipocitos.	33
Figura 16 : Marcadores fosforilados de cascadas de señalización proinflamatoria en adipocitos.	34
Figura 17 : Niveles de glutatión oxidado y reducido, y la razón entre glutatión oxidado/reducido en adipocitos.	35
Figura 18 : Actividad de enzimas antioxidantes en adipocitos.	36
Figura 19 : Captación de glucosa en adipocitos con insulino-resistencia inducida por inflamación.	37
Figura 20 : Viabilidad celular de adipocitos con insulino-resistencia inducida por inflamación.	37
Figura 21 : Fosforilación de PI3K en adipocitos con insulino-resistencia inducida por inflamación.	38

ÍNDICE DE TABLAS	Páginas
Tabla 1 : Principales efectos adversos asociados a sobrepeso y obesidad.	7
Tabla 2 : Antocianinas detectadas en extractos acuosos de Maqui, Calafate y Arándano mediante HPLC-MS	11
Tabla 3 : Sondas TaqMan®.	19
Tabla 4 : Anticuerpos de detección de marcadores fosforilados de vías de señalización proinflamatoria y de señalización de la insulina.	21

ABREVIATURAS

ANOVA	: Análisis de la varianza
AR	: Arándano
ASS	: Ácido sulfosalicílico
BAEC	: Células endoteliales bovinas de aorta
CA	: Calafate
CAT	: Catalasa
COX-2	: Inhibidores de la ciclooxigenasa 2
DE	: Desviación estándar
DIF	: Condición diferenciada
C/EBP α	: Proteína de unión al enhancer CCAAT alfa
EAG	: Equivalentes de ácido gálico
EC-3G	: Equivalentes de cianidina 3-glucósido
ECNT	: Enfermedades crónicas no transmisibles
eNOS	: Óxido nítrico sintasa endotelial
ENS	: Encuesta Nacional de Salud
ERK	: Quinasa activada por señales extracelulares
FRAP	: Poder antioxidante reductor del hierro
FBS	: Suero fetal bovino
GPx	: Glutación peroxidasa
GRd	: Glutación reductasa
GSH	: Glutación reducido
GSSG	: Glutación oxidado
ICAM	: Molécula de adhesión intercelular 1
IMC	: Índice de masa corporal
HPLC-MS	: Cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectrometría de masa
iNOS	: Óxido Nítrico sintasa inducible
IL-1 β	: Interlequina 1 β
IL-6	: Interlequina-6
IL-8	: Interlequina 8
IL-10	: Interlequina-10
INS	: Condición de tratamiento con Insulina
IR	: Insulino-resistencia
JNK	: Quinasa N-terminal de c-Jun
LDH	: Lactato Deshidrogenasa
LDL	: Lipoproteína de baja densidad

LPS	: Lipopolisacáridos
MA	: Maqui
MAPK	: Proteína quinasa activada por mitógenos
MEK1	: Proteína quinasa con especificidad dual
MCP-1	: Proteína quimioattractante de monocitos-1 o CCL2
MKP-1	: MAPK fosfatasa 1
MMP-1	: Metaloproteinasa 1
NF-kB	: Factor nuclear kB
OCDE	: Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos
ON	: Óxido Nítrico
ORO	: Oil-Red-O
PAI-1	: Inhibidor del activador del plasminógeno-1
PBMC	: Célula mononuclear de sangre periférica
PMA	: Forbol-12-miristato-13-acetato
PPAR- γ	: Receptor activador de la proliferación de peroxisomas
PI-3K	: Fosfatidilinositol- 3 quinasa
qRT-PCR	: Transcripción reversa-Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa
ROS	: Especies reactivas del oxígeno
SAA	: Amiloide sérico A
Ser	: Serina
SOD	: Superóxido dismutasa
SREBP-1	: Proteína de unión al elemento regulador del colesterol
TAB	: Tejido adiposo blanco
TAS	: Tejido adiposo subcutáneo
TAV	: Tejido adiposo visceral
THP-1	: Línea celular monocítica humana
Thr	: Treonina
TLR4	: Receptor tipo Toll 4
TNF- α	: Factor de necrosis tumoral alfa
TNF-R	: Receptor de TNF- α
TPA	: 13-acetato de 12-tetradecanoilforbol
Tyr	: Tirosina
VCAM	: Molécula de adhesión vascular 1

RESUMEN

La obesidad se ha posicionado como un alarmante problema de salud por su alta prevalencia a nivel mundial, realidad de la que Chile no queda exento. Esta patología se presenta debido a un desbalance energético positivo mantenido en el tiempo, que conduce a la expansión del tejido adiposo y a una posterior infiltración de monocitos al tejido. Como consecuencia, se establece una interacción adipocito-macrófago que desencadena un característico estado inflamatorio crónico de bajo grado. Dicho estado inflamatorio se asocia al desarrollo de co-morbilidades tales como diabetes tipo 2, enfermedades cardiovasculares, entre otras. Por ello, es de gran interés investigar nuevas estrategias nutricionales que logren contrarrestar los mecanismos proinflamatorios asociados al desarrollo de obesidad. En este sentido, se ha descrito que los frutos nativos chilenos, *Aristotelia chilensis* (Maqui) y *Berberis microphylla* (Calafate), tienen un alto contenido de polifenoles, los cuales se han asociado a respuestas anti-inflamatorias en diversos modelos de experimentación. De esta manera, la presente investigación evaluó los efectos anti-inflamatorios de extractos acuosos de Maqui y Calafate sobre la respuesta patogénica de adipocitos y macrófagos humanos activados con LPS y TNF- α *in vitro*, respectivamente, considerando a *Vaccinium corymbosum* (Arándano) como un control positivo no nativo. Para este propósito, se utilizó una línea celular monocítica humana (THP-1) y una línea celular comercial de preadipocitos viscerales humanos, y se realizaron ensayos para determinar los efectos antiinflamatorios, adipogénicos, antilipolíticos, antioxidantes e insulino-sensibilizadores de los extractos. Los resultados obtenidos muestran que ambos extractos inhibieron la apoptosis y promovieron viabilidad celular; el extracto de maqui disminuyó la secreción de óxido nítrico y la expresión génica de IL-10; y el extracto de calafate disminuyó la secreción de IL-6 en macrófagos. Además, ambos extractos disminuyeron la apoptosis y la secreción de IL-6, aumentaron los niveles de GSH y no presentaron efecto sobre la adipogénesis; el extracto de maqui aumentó la actividad de la superóxido dismutasa, la captación de glucosa y los niveles de p-PI3K; el extracto de calafate inhibió la lipólisis, la secreción de MCP-1 en adipocitos. En conclusión, los extractos de maqui y calafate presentaron respuestas antiinflamatorias en macrófagos y adipocitos humanos, por lo que podrían tener implicancia en la prevención o el tratamiento de comorbilidades asociadas a obesidad.

“MAQUI AND CALAFATE EXTRACTS INHIBIT INFLAMMATORY MECHANISMS CHARACTERISTIC OF DEVELOPMENT OF OBESITY IN A *IN VITRO* MODEL OF HUMAN ADIPOCYTES AND MACROPHAGES”

SUMMARY

Obesity has emerged as an alarming health problem given its high prevalence worldwide, reality that Chile is not exempt. This condition occurs due to a positive energy imbalance maintained over time leading to the expansion of adipose tissue and subsequent tissue infiltration of monocytes. Consequently, an adipocyte-macrophage interaction triggers a chronic low-grade inflammatory state is established. This inflammatory condition is associated with the development of co-morbidities such as type 2 diabetes, cardiovascular diseases, among others. It is therefore of great interest to investigate new nutritional strategies that can counteract the proinflammatory mechanisms associated with the development of obesity. In this regard, it has been described that Chilean native fruits, *Aristotelia chilensis* (Maqui) and *Berberis microphylla* (Calafate), have a high content of polyphenols, which have been associated with antioxidant and anti-inflammatory responses in various experimental models. Thus, this research evaluated the anti-inflammatory effects of Maqui and Calafate aqueous extracts on the pathogenic response of *in vitro* activated human macrophages and adipocytes with LPS and TNF- α , respectively, considering a *Vaccinium corymbosum* (Blueberry) as a nonnative positive control. Human monocytic cell line (THP-1) and visceral preadipocytes was used for this purpose, and assays were performed to determine the anti-inflammatory, adipogenic, antilipolytic, antioxidants and insulin sensitizers effects of extracts. The results exhibit that both extracts inhibited apoptosis and promoted cell viability; maqui extract decreased nitric oxide secretion and gene expression of IL-10; and calafate extract decreased IL-6 secretion in macrophages. Also, both extracts decreased apoptosis and IL-6 secretion, increased levels of reduced glutathione and exhibit no effect on adipogenesis; maqui extract increased the activity of superoxide dismutase, glucose uptake and p-PI3K levels; calafate extract decreased lipolysis and MCP-1 secretion in adipocytes. In conclusion, Maqui and Calafate extracts showed anti-inflammatory responses in human adipocytes and macrophages, which could have implications in the treatment or prevention of comorbidities associated with obesity.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Obesidad en Chile y prevalencia

Según la Organización Mundial de la Salud, la obesidad se define como una acumulación anormal o excesiva de grasa que puede ser perjudicial para la salud¹, dada por un desbalance energético positivo sostenido en el tiempo. Esta patología es desencadenada de forma multifactorial, y si bien puede existir predisposición genética para su desarrollo, los principales factores que determinan su magnitud son una excesiva ingesta de alimentos de alta densidad energética o un gasto insuficiente de energía por falta de actividad física, o ambos²⁻⁴.

En los últimos 20 años, se ha producido un fenómeno de transición alimentaria y nutricional, desde una condición de alta prevalencia de bajo peso y déficit de crecimiento hacia un escenario marcado por el predominio de la obesidad⁵, la cual comenzó afectando a países desarrollados y se ha propagado a varios países en vías de desarrollo. Esta transición se caracteriza por la sustitución de dietas tradicionales ricas en cereales y hortalizas por “dietas occidentales” con gran contenido de grasas saturadas y azúcares simples, y por la adopción de estilos de vida sedentarios en la sociedad actual⁶. De esta forma, la obesidad se ha convertido en un importante problema de salud pública que ha alcanzado características de epidemia a nivel mundial⁷, provocando la muerte de alrededor de 2,6 millones de personas al año.

Respecto a esto, Chile no queda exento pues según la Encuesta Nacional de Salud (ENS) de 2010, un 25,1% de la población chilena adulta padece de obesidad ($IMC \geq 30$), siendo las mujeres, las personas mayores de 45 años y las personas con menor escolaridad los principales grupos de riesgo^{8,9}. Dichos resultados presentan una tendencia de aumento alarmante, en comparación con las cifras obtenidas en la ENS de 2003¹⁰, correspondientes a 23,2% de obesidad. Asimismo, Chile se integra a los países de la OCDE de mayor prevalencia de obesidad, quedando en el quinto lugar, después de EE.UU., México, Australia y Nueva Zelanda¹¹.

1.2. Fisiopatología e inflamación asociada a obesidad

La obesidad se define por un aumento patológico en el depósito del tejido adiposo blanco (TAB), lo que altera su perfil secretor y su función de regulación del peso corporal^{12,13}. Sus características de expansión y distribución anatómica determinan el potencial patológico de la obesidad¹⁴. Este tejido se subdivide en depósitos de distintos efectos metabólicos: el tejido adiposo subcutáneo (TAS) y el tejido adiposo visceral (TAV). El TAV se encuentra en el interior de la cavidad abdominal y posee una mayor actividad metabólica, una menor sensibilidad a insulina y a drogas antidiabéticas¹⁵, y el aumento de su masa se relaciona a efectos perjudiciales para la salud en comparación con el TAS¹⁶.

Como consecuencia del exceso de energía, el tejido adiposo sufre expansión mediante hiperplasia e hipertrofia de los adipocitos que lo componen debido al aumento del depósito citoplasmático de triglicéridos¹⁴. Esto es seguido por un aumento de la angiogénesis, de infiltración de macrófagos y de sobreproducción de la matriz extracelular, que determina el remodelamiento del tejido^{17,18}.

La infiltración de macrófagos al TAB ocurre mediante diversos mecanismos, entre los que destacan:

- Muerte celular de los adipocitos, ya sea necrótica o apoptótica, dada por la hipertrofia excesiva, lo cual generará señales endógenas asociadas a daño tisular que actuarán como un estímulo fagocítico¹⁹.
- Fibrosis local inducida por microhipoxia en diversas zonas del tejido al comienzo de su expansión, lo cual estimula respuestas inflamatorias locales^{20,21}.
- Quimiotaxis, debido a la desregulación de las quimioquinas proinflamatorias que movilizan a los macrófagos desde la médula ósea al tejido, entre las que destaca MCP-1^{22,23}. Esta quimioquina es inducida, principalmente, debido a la disminución de la familia de las fosfatasa MKP-1²⁴ y la activación de MAPKs (ERK, p38 y JNK) mediante receptores tirosina quinasa río arriba que ocurre en procesos de hipertrofia²⁵.

- Aumento del flujo de ácidos grasos libres debido a la alta tasa de lipólisis en los adipocitos hipertrofiados²⁶, los que actúan como ligandos del receptor TLR4, generando respuesta inflamatoria clásica mediante la activación de NF- κ B²⁷⁻²⁹.

Además, los macrófagos pueden cambiar su polarización dependiendo de los estímulos ambientales³⁰ (**Figura 1**). En estado estacionario, presentan efectos anti-inflamatorios intrínsecos tipo M2, involucrados en el mantenimiento de la homeostasis del tejido adiposo, en la prevención de la inflamación y en promover la sensibilidad a la insulina^{31,32}. Sin embargo, se ha observado un cambio de este fenotipo M2 anti-inflamatorio hacia un fenotipo M1 inflamatorio³³ dependiente de la acumulación lipídica³⁴.

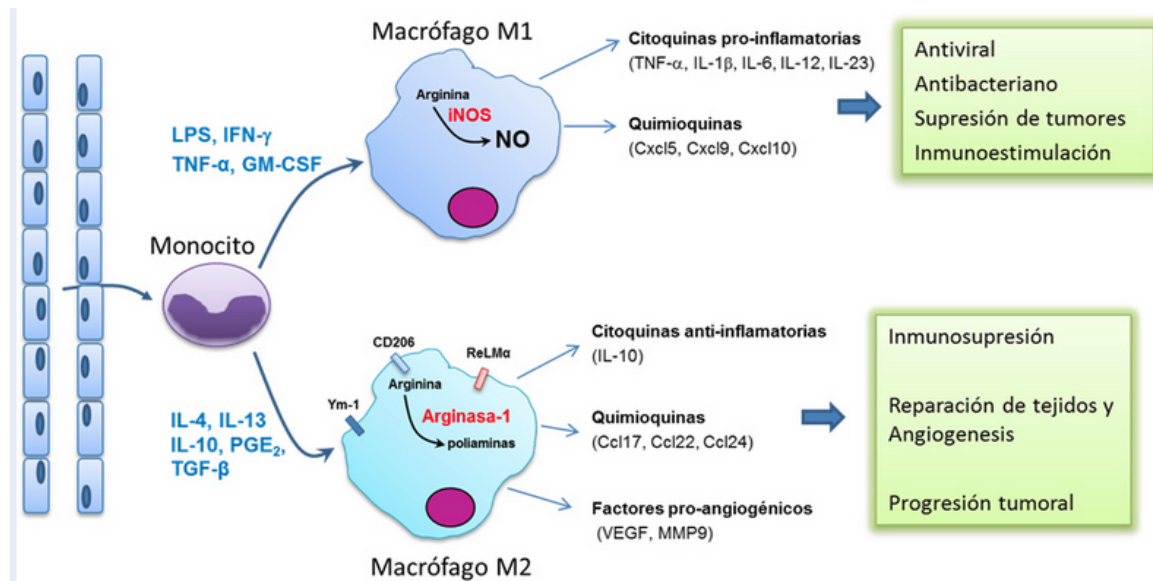


Figura 1. Polarización de macrófagos a diferentes estado de activación³⁵. Según los estímulos que censen los macrófagos, éstos serán activados presentando polarización hacia diferentes fenotipos, ya sea de tipo M1 o de tipo M2. Los macrófagos M1 (activados clásicamente) presentan un fenotipo citotóxico y pro-inflamatorio, mientras que los macrófagos M2 (activados alternativamente) inhiben la respuesta inmune e inflamatoria, son protumorales y promueven reparación de tejidos.

Los macrófagos infiltrados y su polarización de tipo M1 característica en obesidad, contribuyen en la producción de mediadores de inflamación, tales como TNF- α ^{36,37}. El TNF- α señala a través de los receptores TNF-R en los adipocitos hipertrofiados, induciendo lipólisis, a través de mecanismos independientes de NF- κ B (cascadas

proinflamatorias vía MAPK)^{38,39}, y producción de adipocinas pro-inflamatorias, a través de mecanismos dependientes de NF-κB.

Entonces, como consecuencia de la interacción entre los macrófagos infiltrados y los adipocitos en el tejido, se modifica el perfil de expresión y secreción de adipocinas¹³, conduciendo a un aumento en la producción de factores inflamatorios como TNF-α, IL-6 (relacionados con el establecimiento de la inflamación), resistina (relacionado con la señalización de TNF-α), óxido nítrico (NO) e iNOS (relacionados con la respuesta inmune), PAI-1 (relacionado con la inhibición de la fibrinólisis), amiloide sérico A (SAA) (relacionado con la degradación de la matriz extracelular) y MCP-1 (relacionado con la infiltración de macrófagos), y a una disminución de factores anti-inflamatorios como adiponectina (activador de PPAR_{γ2} relacionado con sensibilización a la insulina) e IL-10 (relacionado con respuesta antiinflamatoria)^{33,37,40-45}.

Los mediadores inflamatorios desencadenan efectos locales a nivel del endotelio que aumentan la producción de moléculas de adhesión vascular e intercelular, VCAM e ICAM, respectivamente, y modifican la permeabilidad vascular, por lo que se permite mayor infiltración de células inmunes al tejido que producirán más factores quimiotácticos atrayentes de otros macrófagos^{46,47}. De esta forma, se perpetúa un círculo vicioso de aumento de inflamación que fomenta aún más hipertrofia, induce lipólisis e inhibe adipogénesis, estableciéndose el característico estado inflamatorio crónico de bajo grado en obesidad¹⁷ (**Figura 2**).

Dicho estado inflamatorio se ha relacionado al condicionamiento de insulino-resistencia (IR)^{36,48} mediante un deterioro progresivo de la señalización de la insulina⁴⁹, que primero ocurre a nivel local, y luego a nivel sistémico¹⁷. Ciertos estudios han determinado que este condicionamiento es contrarrestado por la pérdida de peso que conduce a la reducción de marcadores inflamatorios y de macrófagos en el tejido⁵⁰⁻⁵³, lo cual corrobora que la inflamación puede ser un potencial mecanismo, mediante el cual la obesidad induce a IR.

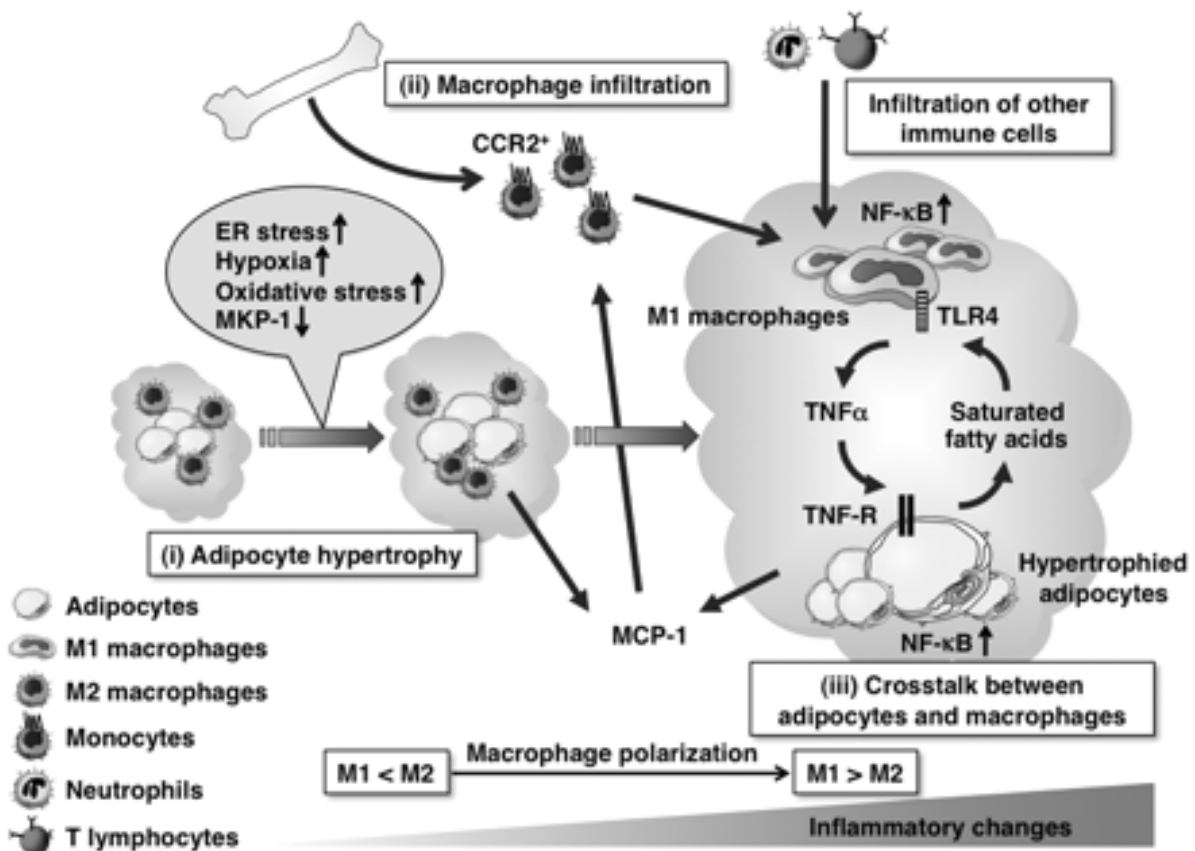


Figura 2. Mecanismo molecular de inflamación del tejido adiposo por sobrenutrición¹⁷. (i) Aumento del estrés metabólico (estrés del retículo endoplásmico, hipoxia y estrés oxidativo), junto con una disminución de MKP-1, inducen alteraciones inflamatorias durante la hipertrofia de los adipocitos. (ii) Luego ocurre infiltración de células inmunes, como los macrófagos que intensifican alteraciones inflamatorias al interactuar con los adipocitos. (iii) El TNF- α derivado de macrófagos induce la lipólisis, que a su vez, induce a respuestas inflamatorias mediante TLR4, por lo que se constituye un círculo vicioso de inflamación. Asimismo, ocurre con la polarización de macrófagos desde un fenotipo M2 a uno M1 en el tejido adiposo obeso.

1.3. Obesidad y estrés oxidativo

La expansión de TAB conlleva al aumento de estrés del retículo endoplásmico, de hipoxia celular y de estrés oxidativo por sobreproducción de especies reactivas de oxígeno (ROS por sus siglas en inglés)⁵⁴. Dichos fenómenos también se encuentran implicados en la desregulación hacia un perfil patogénico de secreción de adipoquinas⁵⁵ y, tanto en forma independiente como en conjunto, potencian el desarrollo del estado inflamatorio crónico ya mencionado⁴⁹.

Respecto al estrés oxidativo, se ha descrito un aumento de éste en modelos animales con sobrepeso^{54,56} y en pacientes obesos, lo cual se ha asociado con IR e hiperleptinemia^{43,57}. Los mecanismos que podrían explicar su inducción en obesidad son variados⁵⁷, dentro de ellos destacan, el aumento de citoquinas proinflamatorias que estimulan la producción de ROS y especies reactivas de nitrógeno en macrófagos, y el aumento de ácidos grasos libres que generan mayores reacciones de oxidación, lo que aumenta la producción de ROS. Si hay sobreproducción de ROS y la defensa antioxidante de la célula se ve sobrepasada, el estrés oxidativo podría inducir lipoperoxidación⁴³. Junto con esto, el tejido adiposo en expansión secreta angiotensina II⁵⁸ que estimula la actividad de la NADPH oxidasa, la cual aumenta la producción de ROS en adipocitos⁵⁹.

Por otro lado, se ha reportado que las principales enzimas que participan en la defensa antioxidante, tales como la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT) y la glutatión peroxidasa (GPx), aumentan en pacientes con sobrepeso infantil, pero disminuyen en pacientes con obesidad infantil^{60,61}. Del mismo modo, al comparar pacientes adultos sanos con pacientes obesos, se detecta menor actividad de las enzimas antioxidantes en los pacientes obesos^{62,63}.

De esta forma, el aumento del estrés oxidativo y la disminución de las enzimas antioxidantes también participan en la desregulación dada en el tejido adiposo obeso, junto con la inflamación.

1.4. Comorbilidades de la obesidad

La obesidad preocupa por los trastornos psico-sociales que podrían afectar a las personas que la padecen, mermando su calidad de vida y autoestima, pero además, porque la expansión del tejido adiposo y la desregulación de su perfil secretor son factores de riesgo para el desarrollo de comorbilidades físico-mecánicas⁶⁴⁻⁶⁶ y metabólicas^{64,67} (**Tabla 1**).

El estudio de las comorbilidades metabólicas es de gran interés, pues éstas engloban a diversas enfermedades crónicas no transmisibles (ECNT) de alta prevalencia mundial, las

cuales aumentan la morbimortalidad de la población⁶⁴. Entre estas enfermedades se distinguen la diabetes tipo 2⁶⁴, las enfermedades cardiovasculares⁴¹ y algunos tipos de cáncer^{68,69}.

Tabla 1. Principales efectos adversos asociados a sobrepeso y obesidad⁶⁴. Tabla adaptada de Arteaga A., 2012

METABÓLICOS	FISICO-MECÁNICOS	PSICO-SOCIALES
Diabetes Mellitus 2	Osteoartritis	Depresión
Hipertensión arterial	Hipoventilación	Ansiedad
Dislipidemia aterogénica	Apnea del sueño	Alteraciones conductuales
Enfermedades cardiovasculares	Miocardiopatía	Mayor riesgo a adicción
Hígado graso	Insuficiencia cardíaca	
Cáncer		
Colelitiasis		
Síndrome de ovario poliquístico		

En este sentido, cada vez hay mayor evidencia científica que permite relacionar el estrés oxidativo y la inflamación, característicos en la obesidad, como factores claves en el desarrollo de enfermedades metabólicas⁴⁹.

1.5. Compuestos bioactivos con potencial beneficioso en la salud

Para prevenir o tratar las comorbilidades antes mencionadas, es necesario generar nuevas estrategias terapéuticas que permitan contrarrestar los mecanismos pro-oxidantes y pro-inflamatorios ligados al desarrollo de obesidad. En este sentido, se ha descrito que el consumo habitual de frutas y verduras, ricas en compuestos bioactivos, se asocia a una mejora en el estatus antioxidante e inflamatorio^{70,71} y a una disminución del riesgo de ECNT^{72,73}. Ciertos alimentos y bebidas de origen vegetal con compuestos bioactivos asociados a efectos protectores mediante distintos mecanismos de acción, se describen a continuación.

Se ha reportado que el té negro y el té verde presentan efectos positivos en la función endotelial. Ambos tipos de té han mostrado aumentar la actividad de eNOS en células endoteliales bovinas de aorta (BAEC) e inducir vasodilatación dependiente del endotelio en anillos aórticos de rata, y además, aumentar la dilatación mediada por flujo de la arteria

en humanos⁷⁴. Asimismo, el té negro es capaz de revertir la disfunción endotelial en pacientes con enfermedad arterial coronaria⁷⁵. Por otro lado, la epigallocatequina galato derivada del té verde, podría prevenir la diabetes y controlar el peso corporal. Se ha descrito que esta catequina disminuye los niveles de expresión génica y proteica de Resistina en adipocitos 3T3-L1 probablemente, mediante activación de la vía ERK/MAPK, ya que es capaz de disminuir los sustratos fosforilados ERK1/2. Y además, a que la disminución en la expresión génica de resistina fue inhibida al sobreexpresar MEK1 en 3T3-L1⁷⁶.

También se ha descrito que la curcumina, un polifenol derivado de la cúrcuma, posee propiedades antiinflamatorias e hipoglicemiantes. Este polifenol impide la acumulación de lípidos asociada a la diferenciación de adipocitos 3T3-L1 e inhibe la activación de C/EBP α y PPAR γ , lo que conduce a una disminución en los niveles de SREBP-1 y FASN⁷⁷. Por otra parte, inhibe la degradación de I κ B y la translocación de NF κ B al núcleo, junto con disminuir la expresión génica de COX-2, IL-1 β e IL-6 en adipocitos en 3T3-L1 activados con TNF- α . Asimismo, se ha descrito que disminuye el nivel de transcrito de TNF- α en adipocitos^{78,79}.

Del mismo modo, se ha estudiado que una ingesta moderada de bebidas alcohólicas que contienen polifenoles presentan propiedades antiinflamatorias, pues son capaces de inhibir la activación de NF- κ B en células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y disminuir los niveles plasmáticos de MCP-1 en sujetos sanos al consumir una dieta alta en grasa durante cinco días⁸⁰. Por otra parte, el consumo de vino tinto ha mostrado contrarrestar la disfunción endotelial inducida por una dieta alta en grasa⁸¹. Junto con esto, un producto de uva rico en fibra dietética y antioxidantes naturales presentó reducción en factores de riesgo asociados a enfermedades cardiovasculares⁸². El resveratrol, una fitoalexina presente en altas concentraciones en el vino tinto^{83,84}, ha exhibido propiedades hipoglicemiantes e hipolipemiantes. Este polifenol modula la alteración del perfil de expresión de adipoquinas dado por inflamación, en células 3T3-L1 incubadas con medio condicionado de macrófagos RAW264.7 y reduce los niveles de transcrito de COX-2, IL-1 β e IL-6 inducidos por TNF- α . Estos efectos tienen directa relación con la habilidad de inhibir la activación de NF- κ B en adipocitos 3T3-L1⁸⁵. Por otro lado, el resveratrol inhibe la activación del receptor TLR en tejido adiposo de ratones con

dieta alta en grasa, lo que conduce a una reducción en los niveles de transcrito de TNF- α , IFN α , IFN β e IL-6^{79,86}. Asimismo, se ha observado que actúa como un activador de SIRT1, mejorando la homeostasis de la glucosa y la sensibilidad a la insulina en ratas diabéticas⁸⁷.

De la misma manera, la quercetina, un flavonoide derivado de alcaparras, manzanas, cebollas y uvas, presenta propiedades antiinflamatorias en cultivos primarios de adipocitos humanos. Este flavonoide disminuye la fosforilación de ERK, JNK, c-Jun y la degradación de I κ B α que permite la liberación del factor transcripcional NF- κ B, lo cual se refleja en la disminución de la expresión génica de IL-6, IL-1 β , IL-8 y MCP-1 y la secreción de IL-6, IL-8 y MCP-1^{79,88}. Conjuntamente, se ha observado que presenta propiedades protectoras frente a enfermedades coronarias mediante la inhibición de la expresión de la metaloproteinasas MMP-1 y el impedimento de formación de placas ateroscleróticas⁸⁹. Y además, su ingesta se ha relacionado con menor incidencia de asma, menor riesgo de cáncer de mama y menor incidencia de cáncer de pulmón⁹⁰.

Adicionalmente, la capsaicina, un polifenol derivado del ají, ha mostrado inhibir la expresión y secreción de IL-6 y MCP-1, y un aumento de la adiponectina en cocultivo de macrófagos y adipocitos extraídos de tejido adiposo de ratones obesos. También se ha demostrado que la administración de capsaicina *in vivo*, contrarresta la resistencia a la insulina asociada a obesidad⁹¹.

Igualmente, las antocianinas, un tipo de flavonoide derivado de frutos rojos/violáceos, han demostrado tener actividad anti-inflamatoria en tejido adiposo obeso, mediada por mecanismos independientes a PPAR γ ^{92,93}. Referente a esto, se ha reportado que extractos concentrados de antocianinas inhiben la producción de NO en macrófagos activados⁹⁴. Además, se les atribuye propiedades anticancerígenas, antitumorales y antidiabéticas, y diferentes efectos terapéuticos relacionados con sus propiedades antioxidantes⁹⁵. Por ejemplo, son capaces de atrapar ROS⁹⁶, inhibir la oxidación de lipoproteínas y la agregación de plaquetas⁹⁷. También se las ha relacionado con el mejoramiento del comportamiento cognitivo en ratas que han recibido suplementación nutricional con extractos ricos en antocianinas⁹⁸.

1.6. Frutos nativos chilenos: maqui y calafate

La evidencia científica existente indica que el consumo regular de bayas proporciona diversos beneficios para la salud y efectos anti-inflamatorios⁹⁹⁻¹⁰³, las cuales se encuentran en gran diversidad en Chile, pero no han sido muy bien estudiadas. Es por esto, que es relevante potenciar su investigación, con el fin de combatir la inflamación asociada a obesidad y sus comorbilidades, junto con potenciar la comercialización de bayas nativas chilenas como una fuente de compuestos bioactivos saludables. Respecto a esto, se ha descrito que los frutos nativos chilenos, *Aristotelia chilensis* y *Berberis microphylla*, poseen un importante contenido de polifenoles¹⁰⁴⁻¹⁰⁷, lo que sugiere una asociación de su consumo a respuestas antioxidantes y antiinflamatorias que podrían contrarrestar la inflamación ligada a obesidad.

Aristotelia chilensis (Mol.) Stuntz, también denominada maqui, pertenece a la familia *Elaeocarpaceae* y es una especie siempre-verde nativa de los bosques subantárticos de Chile. Crece desde el Limarí (IV Región) hasta Aysén (IX Región), tanto en el Valle Central como en ambas cordilleras, pudiendo alcanzar altitudes de hasta 2500 m.s.n.m.¹⁰⁵. El fruto del maqui es una baya comestible redonda de 5 mm de diámetro de color negro brillante o azuladas, y de alto valor alimenticio^{104,108}. Para la cultura mapuche es uno de los tres árboles sagrados y es ampliamente usado como medicina natural. Según la medicina popular la infusión de sus hojas se utiliza como tratamiento de enfermedades de la garganta, tumores intestinales, lavado de úlceras de la boca y fiebre; las hojas secas y en polvo, como cicatrizante y en ungüentos para curar heridas; los frutos en tisana, como antidiarreico; y el jugo de los frutos, como tinte en el vino y tejidos mapuche. Dentro de los productos fabricados con maqui se encuentran: mermeladas artesanales, helados, jugos, bebidas alcohólicas y cosméticos^{104,109}.

Berberis microphylla, también denominado calafate, pertenece a la familia *Berberidaceae*, y es un especie siempre-verde nativa de la Patagonia chilena y argentina. Crece desde Curicó hasta Tierra del Fuego, pudiendo alcanzar altitudes de hasta 2500 m.s.n.m. El fruto del calafate es una baya comestible de color negro brillante de 7-11 mm de diámetro. Debido a que su madera, corteza y raíces contienen berberina, de estos productos se extraen sustancias colorantes para teñir lana. Sus hojas, raíces y frutos se emplean en la

medicina popular como antidiarreicos, antifebriles y antisépticos. Aparte del fruto fresco, se puede consumir en vinagre, vinos, mermeladas, bebidas, jaleas y jarabes^{105,110}.

En relación a la caracterización de los frutos, tanto maqui y calafate como *Vaccinium corymbosum* (Arándano), un fruto no nativo chileno de gran consumo mundial con propiedades anti-inflamatorias^{102,111,112}, utilizado como control positivo, presentan una elevada capacidad antioxidante, la cual se ha correlacionado fuertemente con el contenido total de polifenoles y con la concentración de un tipo de polifenoles de gran abundancia en ellos, las antocianinas^{113,114}. Dichos compuestos bioactivos han sido identificados mediante HPLC-MS en estudios previos en nuestro laboratorio, respecto a extractos acuosos de los frutos en cuestión¹⁰⁷ (**Tabla 2**).

RT (min)	Compound	Molecular ion (m/z)	Fragment ions (m/z)		
			Maqui	Calafate	Blueberry
3.6	Cyanidin-3,5-diglucoside or cyanidin-3-soforoside	611.4	449.0 286.9 593.1	449.0 287.0	
4.2	Delphinidin-3-sambubioside-5-glucoside	759.5	465.0 597.0 303.0		
4.4	Petunidin-3-O-galactoside-5-O-glucoside or petunidin-3-O-glucoside-5-O-glucoside	641.4		479.0 317.1	
4.7	Delphinidin-3,5-O-diglucoside	627.4	465.0 303.0		
6.0	Cyanidin-3-sambubioside-5-glucoside	743.6	449.0 581.0 287.0		
6.2	Delphinidin-3-glucoside or galactoside.	465.3	303.0	303.0	303.0
6.3	Delphinidin-3-sambubioside	597.4	303.0		
8.0	Delphinidin-3-arabioside	435.4			303.0
8.4	Cyanidin-3-sambubioside	581.4	287.0		
8.7	Cyanidin-3-glucoside or cyanidin-3-galactoside	449.3	287.0	287.0	
9.4	Cyanidin-3-rutinoside	595.4		287.0 449.0 578.2	
9.7	Cyanidin-3-arabioside or cyanidin-3-xiloside	419.3			287.0
9.8	Petunidin-3-galactoside or petunidin-3-glucoside	479.1		317.1	317.1
10.6	Petunidin-3-rutinoside	625.4		317.1 479.0	
11.1	Petunidin-3-arabioside	449.2			317.1
11.9	Peonidin-3-galactoside or peonidin-3-glucoside	463.4		301.0	
12.9	Malvidin-3-galactoside or malvidin-3-glucoside	493.2		331.1	331.1
13.0	Peonidin-3-arabioside	433.4			301.0
13.5	Malvidin-3-rutinoside	639.4		331.1 493.0	
14.1	Malvidin-3-arabioside	463.3			331.1

LC-MS, liquid chromatography coupled to mass spectrometry; RT, retention time.

Tabla 2. Antocianinas detectadas en extractos acuosos de maqui, calafate y Arándano mediante HPLC-MS¹⁰⁷. En extracto de maqui, los principales componentes identificados fueron: delfinidina-3-sambubiosido-5-glucósido (m/z: 759.5, peak 3, 36.5%), delfinidina-3-galactósido (m/z: 465.3, peak 7, 23.8%) y delfinidina-3,5-O-diglucósido (m/z: 627.4, peak 4, 18.9%). Para el extracto de calafate, fueron: delfinidina-3-glucósido (m/z: 465.3; peak 3, 36.1%), petunidina y malvidina, conjugadas a 3-glucósido o 3-galactósido (m/z: 479.1, peak 7, 29.9% and m/z: 493.2, peak 10, 15.2%, respectivamente). Y para el extracto de Arándano, fueron: alvidina-3-glucósido o conjugado a galactosa (m/z: 493.4, peak 6, 35.4%), malvidina-3-arabinósido (m/z: 463.3, peak 8, 19.9%).

Respecto a los potenciales efectos positivos de maqui en la salud, estudios *in vitro* con zumo de este fruto dan cuenta de la capacidad de inhibir la oxidación de la LDL inducida por cobre, y de proteger contra el estrés oxidativo intracelular de forma dosis-dependiente en células endoteliales humanas, sugiriendo con ello un potencial anti-aterogénico¹¹⁵. En la misma dirección, se observó un efecto anti-inflamatorio de subfracciones de maqui en ratas y ratones a las cuales se indujo edema de pata¹¹⁶ y edema de oreja con 13-acetato de 12-tetradecanoilforbol¹¹⁷, respectivamente. Junto con un efecto antioxidante y cardioprotector de un extracto metanólico de maqui en ratas sometidas a estrés oxidativo por isquemia-reperfusión *in vivo*, que redujo la oxidación lipídica y la lipoperoxidación¹¹⁸. Complementando tales actividades, se observó un efecto anti-inflamatorio dado por la disminución en la producción de NO (3.7-25.5%), la expresión de iNOS (3.7-25.5%) y COX-2 (16.6-62.0%) en macrófagos RAW264.7 estimulados con lipopolisacáridos (LPS), y además, inhibición en la adipogénesis y la acumulación lipídica en adipocitos 3T3-L1 *in vitro*¹⁰⁸. Por otra parte, recientes estudios *in vitro* con extractos crudos de maqui presentaron capacidad de inhibir la actividad de las enzimas digestivas alfa-glucosidasa y alfa-amilasa, responsables de la degradación de carbohidratos en glucosa, lo cual sugiere un potencial efecto "modulador" de la glicemia postprandial de este fruto¹¹⁹. Además, se ha descrito que la administración oral de una fracción enriquecida de antocianinas de extracto de maqui, mejoró los niveles de glucosa plasmática en ayuno y la tolerancia a la glucosa en ratones hiperglicémicos obesos alimentados con una dieta alta en grasas¹²⁰. Asimismo, un extracto de maqui rico en delfinidinas, fue capaz de disminuir los niveles basales de glucosa y mejorar la tolerancia a la glucosa en ratas con diabetes inducida por estreptozotocina, junto con disminuir la glucosa postprandial y la insulina en pacientes con tolerancia a la glucosa alterada, sugiriendo su uso potencial en pacientes pre-diabéticos. El mecanismo de acción posible, se ha descrito que podría medirse por inhibición del transporte de glucosa dependiente de sodio (Na⁺) dado por las delfinidinas¹²¹.

Respecto a los potenciales efectos positivos de calafate en la salud, se ha reportado que un extracto acuoso de este fruto fue capaz de inhibir la producción de ROS inducida por cloranfenicol en células sanguíneas humanas, lo cual se correlacionó con la viabilidad celular, mostrando acción antioxidante¹²². Recientemente, se ha descrito que extractos acuosos de maqui y calafate fueron capaces de disminuir marcadores inflamatorios, correspondientes a la liberación de NO y a la expresión génica de iNOS y TNF- α , en

macrófagos RAW264.7 activados con LPS, con medio condicionado de adipocitos 3T3-L1 y en un co-cultivo de ambos tipos celulares, lo cual muestra una acción antiinflamatoria de ambos frutos¹⁰⁷.

En base a lo anteriormente expuesto, el objetivo de la presente Memoria de Título es evaluar la posible inhibición de la respuesta inflamatoria dada por la interacción adipocito-macrófago presente en el desarrollo de obesidad y en el establecimiento de insulino-resistencia, mediante el tratamiento con extractos de *Aristotelia chilensis* y *Berberis microphylla*, en un modelo celular humano *in vitro*.

2. HIPÓTESIS

Extractos de *Aristolelia chilensis* y *Berberis microphylla* inhiben la respuesta inflamatoria *in vitro* de adipocitos y macrófagos humanos.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general

Evaluar los posibles efectos anti-inflamatorios de los extractos de dos frutos nativos chilenos, maqui y calafate, en adipocitos y macrófagos humanos *in vitro*.

3.2. Objetivos específicos

Los objetivos específicos de este trabajo experimental fueron analizar *in vitro*:

- a) El efecto anti-inflamatorio de los extractos de maqui y calafate sobre macrófagos humanos activados.
- b) El efecto antilipolítico y adipogénico de los extractos de maqui y calafate sobre adipocitos humanos activados.
- c) El efecto anti-inflamatorio de los extractos de maqui y calafate sobre adipocitos humanos activados.
- d) El efecto antioxidante de los extractos de maqui y calafate sobre adipocitos humanos activados.
- e) El efecto insulino-sensibilizador de los extractos de maqui y calafate sobre adipocitos humanos con resistencia a insulina inducida por inflamación.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Extractos de frutos nativos

Se utilizaron extractos acuosos de frutos nativos chilenos, maqui (MA) (*Aristotelia chilensis*) y calafate (CA) (*Berberis microphylla*), y el extracto de un fruto no nativo chileno, Arándano (AR) (*Vaccinium Corymbosum*), como control positivo. Todos los frutos se obtuvieron de la empresa SAAUTCHILE (Valdivia, Chile), se les realizó una extracción en metanol:agua (1:1) y fueron concentrados en un rotavapor, evaporando el metanol. Los extractos fueron caracterizados previamente, obteniéndose la concentración de polifenoles totales expresada en mg EAG/ 100g de peso seco (MA: 1906.5 ± 73.2; CA:1344.2 ± 10.5; AR: 1229.6 ± 20.9), medida mediante Folin-Ciocalteu; el contenido de antocianinas expresada en mg EC-3G/ 100g de peso seco (MA: 72.7 ± 0.1; CA:31.5 ± 0.8; AR: 20.1 ± 1.2), medido mediante método del pH diferencial; y la capacidad antioxidante total expresada en mmol Fe⁺²/ 100 g de peso seco (MA: 38.9 ± 1.7; CA:11.7 ± 1.8; AR: 5.9 ± 0.1), medida mediante FRAP (poder antioxidante reductor del hierro). También fue caracterizado el perfil de antocianinas de los tres extractos (**Tabla 2**), de acuerdo a lo descrito por Reyes-Farias et al (2014).

4.2. Cultivos celulares

4.2.1. Cultivo de línea celular de macrófagos humanos y tratamientos:

Se utilizó la línea celular monocítica humana THP-1, obtenida del Departamento de Inmunología del Instituto de Ciencias Biomédicas (ICBM) de la Universidad de Chile. Los monocitos fueron cultivados en medio RPMI 1640 (Biological Industries, Beit Haemek, Israel) suplementado con 10% v/v de suero fetal bovino (FBS) (Biological Industries, Beit Haemek, Israel) y con antibióticos Penicilina (100 U/ml) y Estreptomina (100 µg/ml) (Corning Life Sciences, EEUU). Luego, fueron contados en una cámara de Neubauer mediante microscopía utilizando tinción con solución de Azul de Tripán (Biological Industries, Beit Haemek, Israel) hasta obtener una densidad de 1x10⁶ células por pocillo para diferenciar a macrófagos en placas de 6 pocillos. Los monocitos fueron diferenciados con 100 nM de forbol-12-miristato-13-acetato (Sigma-Aldrich Chemical Co., San Luis,

EEUU) a 37° C y 5% v/v de CO₂ durante 48 horas. Posterior a esto, fueron pretratados con 100µM [polifenoles totales] de cada extracto durante 2 horas y, finalmente, se trataron con 5µg/ml de LPS (Sigma-Aldrich Chemical Co., San Luis, EEUU) durante 48 horas, considerando un control sin extractos ni LPS. La diferenciación de los monocitos y la activación de los macrófagos se basó en protocolos de Harrison et al. y Wang et al. modificados^{123,124}. La efectividad de la diferenciación se evaluó según la adhesión de los macrófagos en la placa de cultivo.

Tras este tratamiento, tanto las células para medir expresión génica de citoquinas como el medio sobrenadante de cultivo para medir liberación de NO, citoquinas proinflamatorias, muerte y viabilidad celular, fueron conservados. Las condiciones evaluadas para todos los casos fueron (n=6): Control, no activada ni pre-tratada con extractos de frutos; LPS, activada con LPS; MA/LPS, pre-tratada con extracto de maqui y activada con LPS; CA/LPS, pretratada con extracto de Calafate y activada con LPS; AR/LPS, pretratada con extracto de Arándano y activada con LPS.

4.2.2. Cultivo de línea celular comercial de adipocitos humanos y tratamientos:

Se utilizaron preadipocitos viscerales humanos (Lonza, Nueva Jersey, EEUU) aislados de tejido adiposo visceral de una donante mujer de 92 años y de IMC 19. Los preadipocitos fueron cultivados en medio de crecimiento que corresponde a medio PBM-2 suplementado con 10% v/v de FBS, 2 mM de L-glutamina y 37 ng/ml de GA-1000 SingleQuots™ (LONZA, Walkersville, Maryland, EEUU). Luego, fueron contados en una cámara de Neubauer mediante microscopía utilizando tinción con solución de Azul de Tripán (Biological Industries, Beit Haemek, Israel) hasta obtener una densidad de 5x10⁴ células por pocillo para diferenciar a adipocitos en placas de 48 pocillos, estimulando con el medio de diferenciación que corresponde a 500 ml de PBM-2 más PGM™-2 SingleQuots™ (LONZA, Walkersville, Maryland, EEUU), el cual contiene indometacina, 3-isobutil-1-methylxanthina, dexametasona y h-insulina, a concentraciones dadas por el proveedor.

En primer lugar, para realizar el ensayo de adipogénesis se indujo la diferenciación de los preadipocitos a adipocitos durante 10 días, en ausencia y presencia de 100µM

[polifenoles totales] de cada extracto, considerando un control no diferenciado. Las condiciones evaluadas en este caso fueron (n=4): Control, no diferenciada ni tratada con extractos de frutos; DIF, diferenciada; DIF/MA, diferenciada y tratada con extracto de maqui; DIF/CA, diferenciada y tratada con extracto de Calafate; DIF/AR, diferenciada y tratada con extracto de Arándano.

En segundo lugar, se diferenciaron preadipocitos durante 9 días, los cuales fueron pre-tratados con 100 μ M [polifenoles totales] de cada extracto tras este periodo durante 1 hora y activados con 4 ng/ml de TNF- α (Sigma-Aldrich Chemical Co., San Luis, EEUU) durante 24 horas. Tras este tratamiento, tanto las células para medir expresión génica de adipoquinas, niveles de glutatión, actividad de enzimas antioxidantes y de Caspasa-3, y activación de cascada proinflamatoria, como el medio de cultivo para medir secreción de adipoquinas, lipólisis y viabilidad celular, fueron conservados. Las condiciones evaluadas en este caso fueron (n=4): Control, no activada ni pre-tratada con extractos de frutos; TNF- α , activada con TNF- α ; MA/TNF- α , pre-tratada con extracto de maqui y activada con TNF- α ; CA/ TNF- α , pre-tratada con extracto de Calafate y activada con TNF- α ; AR/ TNF- α , pre-tratada con extracto de Arándano y activada con TNF- α .

Por último, se diferenciaron los preadipocitos durante 9 días, se pre-trataron con 100 μ M [polifenoles totales] de cada extracto más 4 ng/ml de TNF- α durante 24 horas por 4 días y, al quinto día, se trataron solo con 100 nM de Insulina (Sigma-Aldrich Chemical Co., San Luis, EEUU) durante 24 horas para generar un modelo de insulino-resistencia en adipocitos. Tras este tratamiento, tanto las células para medir fosforilación de PI3K como el medio de cultivo para medir viabilidad celular y captación de glucosa, fueron conservados. Las condiciones evaluadas en este caso fueron (n=4): Control, no activada ni tratada con extractos de frutos ni insulina; INS, no activada y tratada con insulina; TNF- α /INS, activada con TNF- α y tratada con insulina; TNF- α / MA/INS, activada con TNF- α y tratada con extracto de maqui e insulina; CA/TNF- α /INS, activada con TNF- α y tratada con extracto de Calafate e insulina; AR/TNF- α /INS, activada con TNF- α y tratada con extracto de Arándano e insulina.

4.3. Expresión génica de citoquinas y adipoquinas

Se obtuvo el RNA total de células según el método de extracción del isotiocianato de guanidinio-fenol-cloroformo¹²⁵, usando Trizol (Invitrogen, Paisley, Reino Unido). Se determinó la concentración del ARN (ng/ μ L) según la absorbancia a 260 nm y su pureza, según la razón de absorbancias 260nm/280nm mediante espectrofotometría (NanoQuant, infinite M200PRO, TECAN). Posteriormente, se le realizó un tratamiento con rDNasa I para evitar interferencias de ADN contaminante, utilizando el kit "DNA-free™" (Ambion, Austin, Texas, EEUU), y se sintetizó ADNc mediante transcripción reversa con el kit *High Capacity cDNA Reverse Transcription* (Applied biosystems, Carlsbad, California, EEUU), considerando dos controles negativos, uno sin ARN y otro sin la enzima retrotranscriptasa. La concentración de ADNc sintetizada fue de 50ng/ μ L en el caso del lisado de macrófagos y de 100ng/ μ L para el lisado de adipocitos.

El ADNc fue utilizado para medir la expresión génica de citoquinas y adipoquinas mediante qRT-PCR (Stratagene Mx3000P System, Agilent Technologies). Las reacciones se realizaron en duplicado según el protocolo para ensayos de expresión génica TaqMan® de Applied Biosystems, utilizando un mix de reacción compuesto de Universal PCR Master mix (Applied Biosystems, Branchburg, Nueva Jersey, EEUU) al 50%, ADNc al 20%, Sonda TaqMan® (Applied biosystems, Foster City, California, EEUU) (**Tabla 3**) al 5% y agua libre de nucleasas. Para el análisis de los amplificados se consideraron los controles negativos de la síntesis de ADNc y un tercer control negativo con agua libre de RNasas en remplazo del ADNc en el mix de reacción.

En los macrófagos se cuantificó la expresión génica de TNF- α , IL-6, iNOS e IL-10, y en los adipocitos, MCP-1, IL-6 y Adiponectina. La expresión génica de dichos genes de interés fue normalizada por la expresión del gen endógeno β -actina y la cuantificación de la expresión relativa de cada uno se determinó mediante el método de la segunda derivada $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ¹²⁶.

Tabla 3. Sondas TaqMan®. Información detallada de las sondas TaqMan® utilizadas para realizar qRT-PCR y determinar expresión de genes a partir de lisado celular de macrófagos y de adipocitos humanos *in vitro*.

Código de referencia	Nombre del gen	Símbolo del gen
Hs01113624_g1	factor de necrosis tumoral	<i>TNF</i>
Hs01075529_m1	óxido nítrico sintasa 2 inducible	<i>NOS2</i>
Hs00985639_m1	interleuquina 6	<i>IL6</i>
Hs00961622_m1	interleuquina 10	<i>IL10</i>
Hs00234140_m1	ligando 2 del motif C-C	<i>CCL2</i>
Hs00605917_m1	adiponectina	<i>ADIPOQ</i>
Hs01060665_g1	beta-actina	<i>ACTB</i>

4.4. Secreción proteica de citoquinas y adipocinas

Se determinó la secreción de citoquinas (TNF- α e IL-6) y adipocinas (MCP-1, adiponectina e IL-6) con el kit *MILLIPLEX® MAP Human Adipocyte Magnetic Bead Panel* (Merck Millipore, Darmstadt, Alemania). Este kit permitió realizar múltiples inmunoensayos donde los analitos de interés y su concentración (pg/mL) fueron cuantificadas respecto a su unión específica con microesferas magnéticas coloreadas acopladas a anticuerpos, lo cual se detectó mediante tecnología Luminex® xMAP® en el Departamento de Virología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile.

4.5. Liberación de óxido nítrico

Se midieron los niveles de nitrito NO₂⁻ mediante el ensayo colorimétrico de Griess. Fueron cargados 200 μ L de solución 1:1 entre medio de cultivo y reactivo de Griess (Sigma-Aldrich Chemical Co., San Luis, EEUU) al 4% p/v, en una placa de 96 pocillos, dejando incubar durante 15 minutos en oscuridad para leer a 540 nm mediante espectrofotometría (NanoQuant, infinite M200PRO, TECAN).

4.6. Viabilidad celular

Se determinó la viabilidad celular como una medida inversamente proporcional a la actividad de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH), marcador de citotoxicidad. Los niveles de LDH fueron determinados mediante el kit de ensayo colorimétrico “LDH Cytotoxicity Assay kit” (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, Michigan, EEUU) por espectrofotometría (NanoQuant, infinite M200PRO, TECAN) o mediante exámenes encargados al laboratorio RedLab S.A. (Santiago, Chile).

4.7. Muerte celular

Se determinó la muerte celular con el kit de ensayo de fluorescencia “Caspase-3 fluorescence assay kit” modificado (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, Michigan, EEUU), mediante fluorimetría (SynergyHT, BioTec).

4.8. Adipogénesis

Se determinaron los cambios en la adipogénesis mediante tinción con Oil-Red-O (ORO) (Sigma-Aldrich Chemical Co., San Luis, EEUU), siguiendo el protocolo realizado por Omatsu-Kanbe et al. con modificaciones¹²⁷, leyéndose las absorbancias a 540 nm mediante espectrofotometría (NanoQuant, infinite M200PRO, TECAN), utilizando isopropanol como blanco.

4.9. Lipólisis

Se cuantificó la lipólisis respecto la liberación de glicerol en el medio de cultivo, mediante un kit de ensayo colorimétrico de glicerol (Randox Laboratories Ltd., Crumlin, Reino Unido) por espectrofotometría (NanoQuant, infinite M200PRO, TECAN).

4.10. Marcadores fosforilados de cascadas de señalización proinflamatoria y de señalización de la insulina.

Se evaluó la activación de cascadas de señalización proinflamatoria, cuantificando el porcentaje de fosforilación de las MAP quinasas JNK (Thr¹⁸³/Tyr¹⁸⁵) y p38 MAPK (Thr¹⁸⁰/Tyr¹⁸²), junto con el porcentaje de fosforilación de la subunidad p65 (Ser⁵³⁶) del factor transcripcional NF-κB. Y por otro lado, se evaluó la activación de la señalización de la insulina vía PI3K cuantificando el porcentaje de fosforilación de PI3K. En ambos casos se consideró a β-actina como control endógeno. Las detecciones se realizaron con anticuerpos de reconocimiento específico de los analitos en estudio (**Tabla 4**) y se utilizó “Bio-Plex Pro™ Cell Signalling Reagent Kit” (Bio-Rad Laboratories Inc., California, EEUU). Los inmunoensayos fueron medidos con tecnología Luminex® xMAP® en el Departamento de Virología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile.

Tabla 4. Anticuerpos de detección de marcadores fosforilados de vías de señalización proinflamatoria y de señalización de la insulina. Información detallada de los anticuerpos de detección de β-actina, JNK (Thr¹⁸³/Tyr¹⁸⁵), p38 MAPK (Thr¹⁸⁰/Tyr¹⁸²), p65 NFκB (Ser⁵³⁶) y p85 PI3K (Tyr⁴⁵⁸).

Código de referencia	Anticuerpos de detección
171-V60020M	Bio-Plex Pro™ Total β-Actin
171-V50011M	Bio-Plex Pro™ Phospho-JNK (Thr ¹⁸³ /Tyr ¹⁸⁵)
171-V50014M	Bio-Plex Pro™ Phospho-p38 MAPK (Thr ¹⁸⁰ /Tyr ¹⁸²)
171-V50013M	Bio-Plex Pro™ Phospho-NF-κB p65 (Ser ⁵³⁶)
171-V50011M	Bio-Plex Pro™ Phospho-PI3K p85 (Tyr ⁴⁵⁸)

4.11. Glutación reducido (GSH), oxidado (GSSG) y razón GSSG/GSH.

Las células fueron tripsinizadas y resuspendidas en ácido sulosalicílico al 5%, luego fueron centrifugadas. Una alícuota del sobrenadante se utilizó para determinar los niveles de glutación total (GT) según el método cinético de Griffith¹²⁸, el cual se basa en el reciclaje enzimático donde el glutación es oxidado por el ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico y reducido por el NADPH en presencia de glutación reductasa (GRd). Junto con esto, se utilizó otra alícuota del sobrenadante para determinar los niveles de GSSG según el

método de Griffith combinado con el método de Suzuki ¹²⁹, en el cual se tratan las muestras con 4-vinilpiridina para dejar como único sustrato del ensayo al GSSG. En ambos casos, se realizan lecturas a 6 tiempos a 412 nm, cuantificando la formación de ácido 2-nitro-5-tiobenzoico. El GSH fue calculado según la diferencia entre GT y GSSG. El NADPH utilizado es de Calbiochem (Billerica, Massachusetts, EEUU) y el resto de los reactivos utilizados son de Sigma-Aldrich Chemical Co. (San Luis, EEUU). Los resultados de GSH y GSSG se expresan en porcentajes, y además, se expresan como la razón GSSG/GSH, la cual es un indicador de estrés oxidativo.

4.12. Enzimas antioxidantes

Se midió la actividad de las enzimas antioxidantes SOD y CAT según los kits colorimétricos “Superoxide Dismutase Assay kit” y “Catalase Assay kit” (Cayman Chemical Company, Michigan, EEUU), mediante espectrofotometría (NanoQuant, infinite M200PRO, TECAN), respectivamente.

4.13. Captación de glucosa

Se realizaron exámenes de glicemia en RedLab S.A. y se determinó la captación de glucosa según el diferencial de la concentración inicial versus la concentración final de glucosa en el medio de cultivo recolectado.

4.14. Análisis estadístico

Los resultados se expresaron como el promedio \pm DE de cada tratamiento y las letras en cada barra indican las diferencias significativas entre tratamientos, considerando un $n=6$ para los experimentos con macrófagos y un $n=4$ para los experimentos con adipocitos. Se determinó la normalidad del conjunto de datos mediante el análisis de Shapiro–Wilk. La significancia estadística de los datos paramétricos entre tratamientos se realizó mediante análisis de la varianza (one-way ANOVA) seguido de un análisis post-hoc de Tukey o de Student-Newman-Keuls. Por otra parte, el análisis estadístico comparativo entre tratamientos con datos no paramétricos fue evaluado mediante análisis de Kruskal-Wallis seguido de un análisis post-hoc de Dunn. Además, las comparaciones entre 2

tratamientos, fueron realizadas mediante un análisis t-Student. Todos los análisis de datos se realizaron usando el programa estadístico GraphPadPrism Inc. version 6.0 para Windows (GraphPad Software Incorporated, San Diego, CA, EEUU).

5. RESULTADOS

En esta memoria se evaluaron los posibles efectos anti-inflamatorios de los extractos de maqui y calafate sobre adipocitos y macrófagos humanos *in vitro*, con el fin de determinar su posible uso como una nueva estrategia terapéutica que permita inhibir el estado inflamatorio asociado a obesidad, y así, sus comorbilidades. Por un lado, se trabajó con un modelo de inflamación en macrófagos humanos para determinar el efecto anti-inflamatorio de los extractos. Por otro lado, se trabajó con un modelo de diferenciación en adipocitos humanos para determinar el efecto adipogénico de los extractos, un modelo de inflamación de adipocitos humanos para determinar el efecto antilipolítico, anti-inflamatorio y antioxidante de los extractos, y con un modelo de insulino-resistencia por inflamación en adipocitos humanos para determinar el efecto insulino-sensibilizador de los extractos.

5.1. Efecto anti-inflamatorio de los extractos de maqui y calafate sobre macrófagos humanos activados con LPS *in vitro*.

5.1.1. Efecto sobre la liberación de Óxido Nítrico.

Se instauró el modelo de activación, pues hay un aumento significativo en la liberación de NO al medio de cultivo en la condición activada con LPS respecto a la condición control no activada (**Figura 3**).

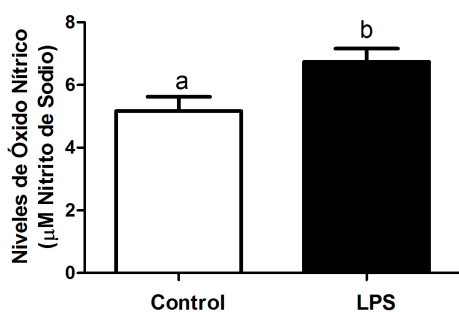


Figura 3. Activación de macrófagos THP-1. Niveles de Óxido Nítrico liberado al medio de cultivo por macrófagos THP-1, en condición control y en condición activada con LPS. Los resultados corresponden al promedio \pm DE de cada tratamiento y las letras sobre las barras indican las diferencias significativas entre ellos. Los datos fueron analizados mediante la prueba t de Student de dos colas. Las condiciones evaluadas fueron (n=6): Control, no activada; LPS, activada con LPS.

Al comparar el porcentaje de liberación de NO corregido por la viabilidad celular bajo cada condición, no hubo diferencias significativas bajo los pre-tratamientos de CA o AR

respecto a la condición activada, lo cual sí se observó al pre-tratar con MA (**Figura 4**). Es decir, MA fue capaz de contrarrestar la liberación de NO inducida por LPS, presentando un nivel sin diferencia significativa respecto a la condición control.

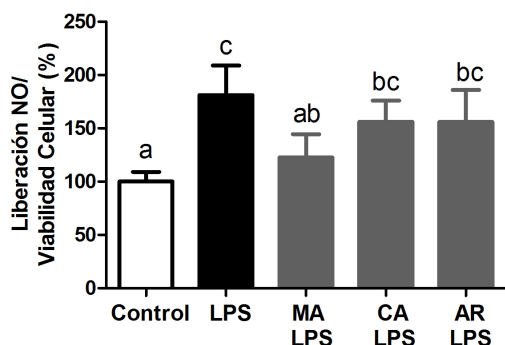


Figura 4. Liberación de NO en macrófagos THP-1. Porcentaje de liberación de NO al medio de cultivo corregido por la viabilidad celular de los macrófagos en cada condición evaluada. Los resultados corresponden al promedio \pm DE de cada tratamiento y las letras sobre las barras indican las diferencias significativas al menos $p < 0.05$ entre ellos. Los datos fueron analizados mediante el análisis de la varianza (ANOVA) con el test post-hoc de Tukey. Las condiciones evaluadas fueron (n=6): Control, no activada ni pretratada con extractos de frutos; LPS, activada con LPS; MA/LPS, pretratada con extracto de maqui y activada con LPS; CA/LPS, pretratada con extracto de calafate y activada con LPS; AR/LPS, pretratada con extracto de arándano y activada con LPS.

5.1.2. Efecto sobre la viabilidad y muerte celular.

Se observó una disminución en el porcentaje de viabilidad celular al activar con LPS respecto a la condición control no activada. Y al realizar pre-tratamientos con los tres tipos de extractos, la viabilidad celular aumentó de forma significativa respecto a la condición activada (**Figura 5A**). Es decir, tanto MA como CA contrarrestaron la pérdida de viabilidad celular inducida por LPS, y en el caso de MA, permitió mantener la viabilidad al mismo nivel que la condición control.

Además, se observó un aumento de la muerte celular al activar con LPS respecto a la condición control no activada. Al realizar pre-tratamientos con los tres extractos la actividad de Caspasa-3 disminuyó de forma significativa respecto a la condición activada (**Figura 5B**). Es decir, tanto MA como CA contrarrestaron la muerte celular inducida por LPS.

Al realizar un análisis de asociación bivariada entre el porcentaje de viabilidad celular versus el porcentaje de actividad de Caspasa-3, indica una correlación lineal negativa ($r = -0,6519^{**}$; $p < 0,001$). Se observa mayor apoptosis en la condición activada con LPS respecto a la condición control, y además, los tres extractos contrarrestaron la apoptosis inducida por LPS (**Figura 5C**).

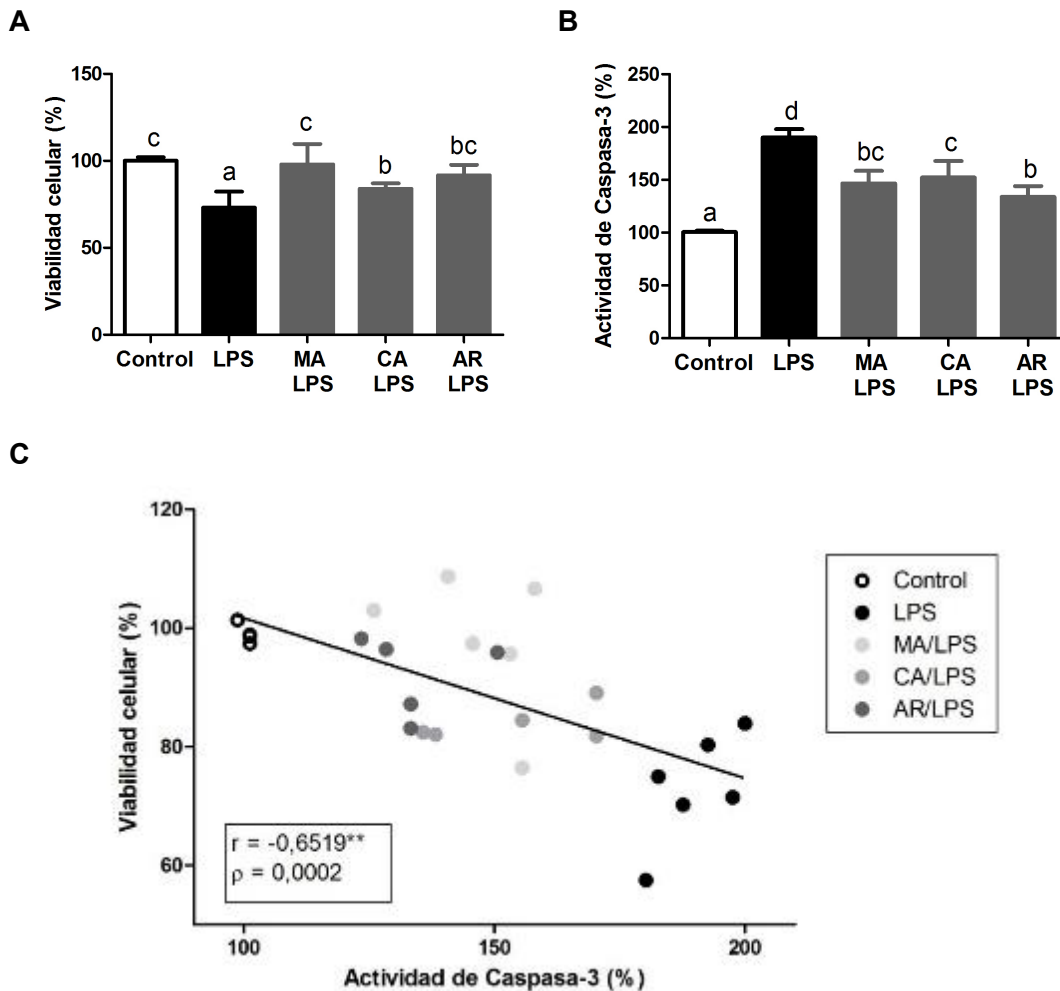


Figura 5. Viabilidad celular y Muerte celular de macrófagos THP-1 inducida por LPS. (A) Porcentaje de Viabilidad celular medida mediante ensayo colorimétrico. **(B)** Porcentaje de actividad de Caspasa-3 medida mediante ensayo fluorimétrico. **(C)** Relación lineal entre viabilidad celular y muerte celular. Los resultados corresponden al promedio \pm DE de cada tratamiento y las letras sobre las barras indican las diferencias significativas al menos $p < 0.05$ entre ellos. Los datos de viabilidad celular fueron analizados mediante el análisis de la varianza (ANOVA) con el test post-hoc de Student–Newman–Keuls; los datos de muerte celular, por ANOVA con la prueba post-hoc de Tukey; y los datos de viabilidad celular y muerte celular fueron relacionados según el análisis del coeficiente de correlación de Pearson. Las condiciones evaluadas fueron (n=6): Control, no activada ni pretratada con extractos de frutos; LPS, activada con LPS; MA/LPS, pretratada con extracto de maqui y activada con LPS; CA/LPS, pretratada con extracto de calafate y activada con LPS; AR/LPS, pretratada con extracto de arándano y activada con LPS.

5.1.3. Efecto sobre la expresión génica y la secreción proteica de marcadores de inflamación.

No se observó variación en la expresión génica de TNF- α al comparar la condición control respecto a la condición activada con LPS, y al realizar los pre-tratamientos con los

extractos no hubo cambios significativos a nivel de transcrito respecto a la condición activada (**Figuras 6A**). La secreción de TNF- α disminuyó al comparar la condición control respecto a la condición activada, y no se observaron diferencias significativas al pre-tratar con los extractos, respecto a la condición activada (**Figuras 6B**).

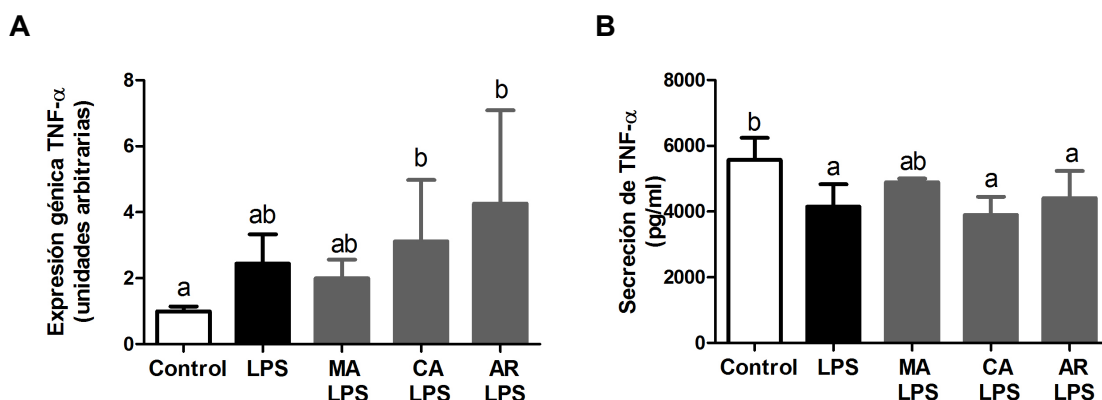


Figura 6. Expresión génica y secreción TNF- α en macrófagos. (A) Expresión génica de TNF- α normalizada por la expresión del gen endógeno β -Actina. (B) Secreción de TNF- α al medio de cultivo (pg/ml). Los resultados corresponden al promedio \pm DE de cada tratamiento y las letras sobre las barras indican las diferencias significativas al menos $p < 0.05$ entre ellos. Los datos de expresión génica fueron analizados mediante el análisis de Kruskal-Wallis con el test post-hoc de Dunn, y los datos de secreción, mediante el análisis de la varianza (ANOVA) con la prueba post-hoc de Tukey. Las condiciones evaluadas fueron (n=6): Control, no activada ni pretratada con extractos de frutos; LPS, activada con LPS; MA/LPS, pretratada con extracto de maqui y activada con LPS; CA/LPS, pretratada con extracto de calafate y activada con LPS; AR/LPS, pretratada con extracto de arándano y activada con LPS.

No hubo cambios a nivel de expresión génica de IL-6 entre las distintas condiciones de tratamiento (**Figuras 7A**). Sin embargo, se observó un aumento significativo en la secreción proteica de esta citoquina pro-inflamatoria, al comparar la condición activada con LPS respecto a la condición control. Al realizar los pre-tratamientos, con MA no se detectó una variación significativa en la secreción de IL-6, como sí ocurrió con CA y AR, donde se observó una disminución respecto a la condición activada (**Figuras 7B**). Es decir, CA contrarrestó la secreción de IL-6 inducida por LPS, presentando niveles que no difieren significativamente de la condición control.

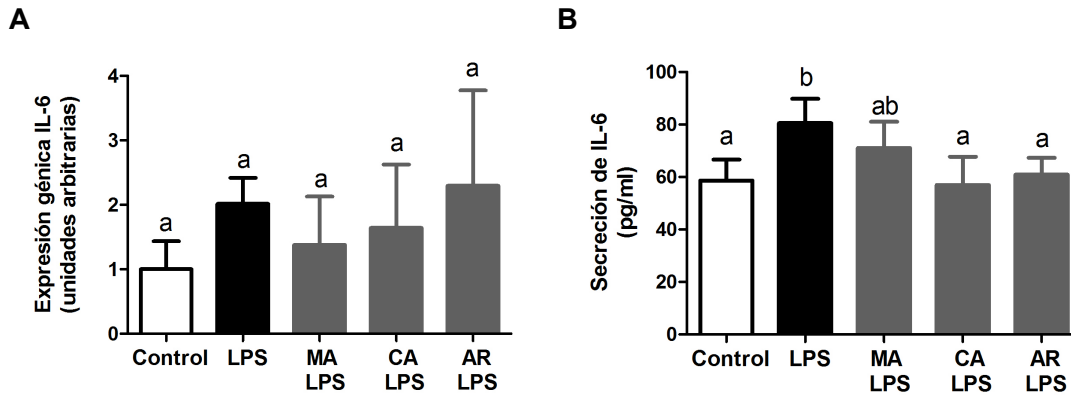


Figura 7. Expresión génica y secreción de IL-6 en macrófagos. (A) Expresión génica de IL-6 normalizada por la expresión del gen endógeno β -Actina. (B) Secreción de IL-6 al medio de cultivo (pg/ml). Los resultados corresponden al promedio \pm DE de cada tratamiento y las letras sobre las barras indican las diferencias significativas al menos $p < 0.05$ entre ellos. Los datos fueron analizados mediante el análisis de la varianza (ANOVA) con la prueba post-hoc de Tukey. Las condiciones evaluadas fueron (n=6): Control, no activada ni pretratada con extractos de frutos; LPS, activada con LPS; MA/LPS, pretratada con extracto de maqui y activada con LPS; CA/LPS, pretratada con extracto de calafate y activada con LPS; AR/LPS, pretratada con extracto de arándano y activada con LPS.

Se detecta una disminución significativa en la expresión génica de iNOS al comparar la condición activada con LPS, respecto a la condición control. Al pre-tratar con los extractos, no hubo diferencias significativas respecto a la condición activada (**Figura 8**).

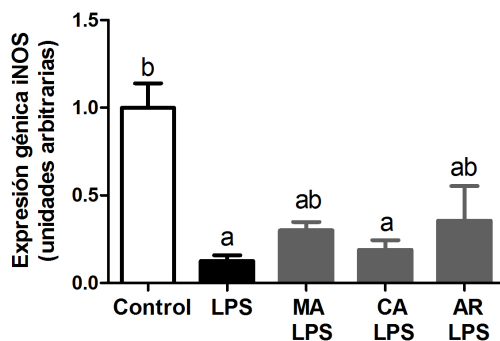


Figura 8. Expresión génica de iNOS en macrófagos. Expresión génica de iNOS normalizada por la expresión del gen endógeno β -Actina. Los resultados corresponden al promedio \pm DE de cada tratamiento y las letras sobre las barras indican las diferencias significativas al menos $p < 0.05$ entre ellos. Los datos fueron analizados mediante el análisis de Kruskal-Wallis con el test post-hoc de Dunn. Las condiciones evaluadas fueron (n=6): Control, no activada ni pretratada con extractos de frutos; LPS, activada con LPS; MA/LPS, pretratada con extracto de maqui y activada con LPS; CA/LPS, pretratada con extracto de calafate y activada con LPS; AR/LPS, pretratada con extracto de arándano y activada con LPS.

El nivel de expresión génica de IL-10 aumentó de forma significativa en la condición activada con LPS respecto a la condición control. Y al pre-tratar con MA y AR se observó una disminución respecto a la condición activada, no así con CA, el cual no indujo cambios significativos en el nivel de transcrito de esta citoquina (**Figura 9**).

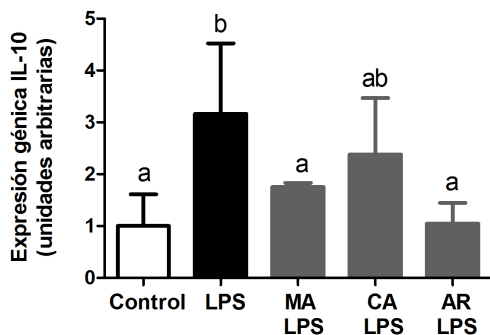


Figura 9. Expresión génica de IL-10 en macrófagos. Expresión génica de IL-10 normalizada por la expresión del gen endógeno β -Actina. Los resultados corresponden al promedio \pm DE de cada tratamiento y las letras sobre las barras indican las diferencias significativas al menos $p < 0.05$ entre ellos. Los datos de expresión génica fueron analizados mediante el análisis de la varianza (ANOVA) con el test post-hoc de Student–Newman–Keuls. Las condiciones evaluadas fueron ($n=6$): Control, no activada ni pretratada con extractos de frutos; LPS, activada con LPS; MA/LPS, pretratada con extracto de maqui y activada con LPS; CA/LPS, pretratada con extracto de calafate y activada con LPS; AR/LPS, pretratada con extracto de arándano y activada con LPS.

5.2. Efecto antilipolítico y adipogénico de los extractos de maqui y calafate sobre adipocitos humanos activados con $TNF-\alpha$ *in vitro*.

5.2.1. Efecto sobre la adipogénesis.

Al comparar el porcentaje de triglicéridos en preadipocitos tratados y no tratados (Control) con el medio de diferenciación PGMTM-2 SingleQuotsTM, se observó un aumento significativo en aquellos que recibieron el tratamiento, lo cual se traduce en que se consiguió inducir su diferenciación a adipocitos (**Figura 10A**). Y al tratar con los extractos no hubo cambios significativos en el porcentaje de triglicéridos (**Figura 10B**).

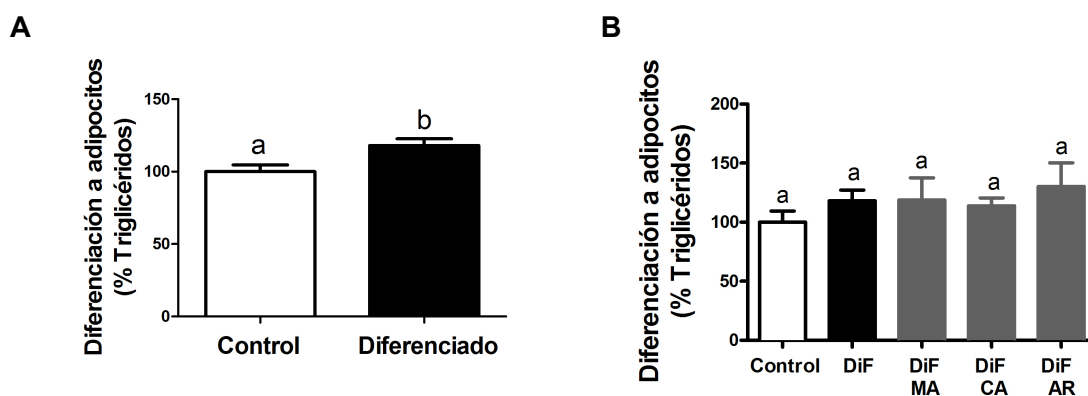


Figura 10. Diferenciación de preadipocitos a adipocitos. (A) Porcentaje de triglicéridos teñidos con ORO, en condición control sin diferenciar y en condición diferenciada a adipocitos. (B) Porcentaje de triglicéridos teñidos con ORO en ausencia y presencia de extractos de frutos nativos. Los resultados corresponden al promedio \pm DE de cada tratamiento y las letras sobre las barras indican las diferencias significativas al menos $p < 0.05$ entre ellos. Los datos entre la condición control y la condición

diferenciada, fueron analizados mediante la prueba t de Student de dos colas, y los datos de diferenciación en presencia y ausencia de extractos de frutos mediante el análisis de la varianza (ANOVA) con el test post-hoc de Tukey. Las condiciones evaluadas fueron (n=4): Control, no diferenciada ni tratada con extractos de frutos; DIF, diferenciada; DIF/MA, diferenciada y tratada con extracto de maqui; DIF/CA, diferenciada y tratada con extracto de calafate; DIF/AR, diferenciada y tratada con extracto de arándano.

5.2.2. Efecto sobre la lipólisis.

No hubo variación significativa en la liberación de glicerol al comparar la condición activada con TNF- α respecto a la condición control. En presencia de los extractos no se detectaron cambios respecto a la condición activada, sin embargo, al pre-tratar con CA se observó una disminución de la liberación de glicerol respecto al control, lo que sugiere un efecto antilipolítico (**Figura 11**).

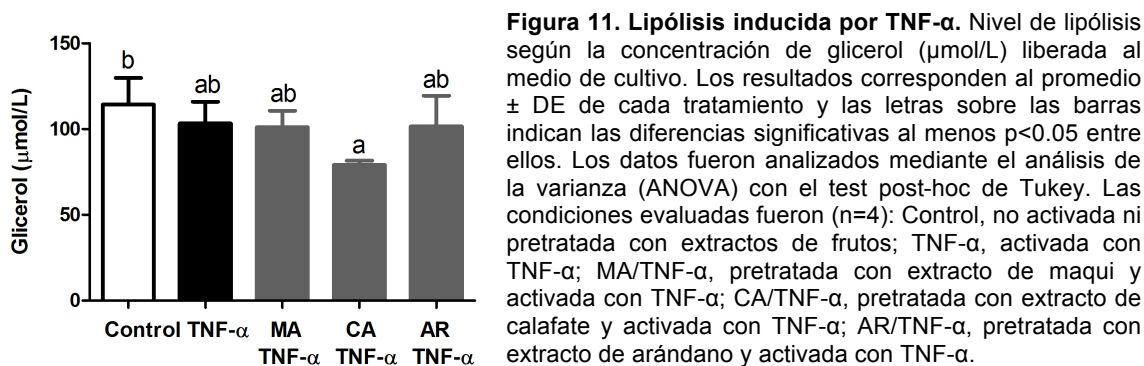


Figura 11. Lipólisis inducida por TNF- α . Nivel de lipólisis según la concentración de glicerol ($\mu\text{mol/L}$) liberada al medio de cultivo. Los resultados corresponden al promedio \pm DE de cada tratamiento y las letras sobre las barras indican las diferencias significativas al menos $p < 0.05$ entre ellos. Los datos fueron analizados mediante el análisis de la varianza (ANOVA) con el test post-hoc de Tukey. Las condiciones evaluadas fueron (n=4): Control, no activada ni pretratada con extractos de frutos; TNF- α , activada con TNF- α ; MA/TNF- α , pretratada con extracto de maqui y activada con TNF- α ; CA/TNF- α , pretratada con extracto de calafate y activada con TNF- α ; AR/TNF- α , pretratada con extracto de arándano y activada con TNF- α .

5.3. Efecto anti-inflamatorio de los extractos de maqui y calafate sobre adipocitos humanos activados con TNF- α *in vitro*.

5.3.1. Efecto sobre la viabilidad y muerte celular.

No se detectaron cambios significativos en la viabilidad celular de los adipocitos al comparar la condición activada con TNF- α versus la condición control no activada, o versus las condiciones bajo pre-tratamiento con los extractos (**Figura 12A**).

Se observó un aumento en la actividad de Caspasa-3 inducido por estímulo con TNF- α respecto a la condición control no activada, lo cual fue contrarrestado al realizar pre-

tratamiento con los tres extractos, expresando niveles que no difieren significativamente respecto a la condición control (**Figura 12B**).

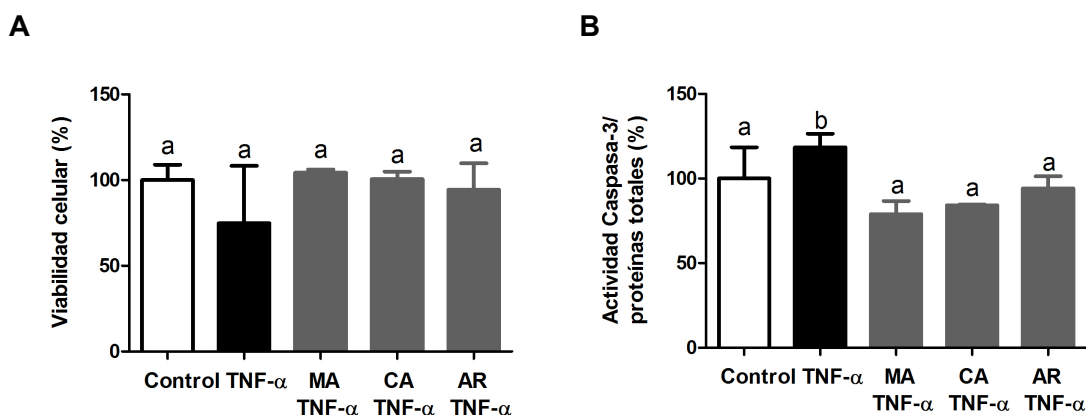


Figura 12. Viabilidad celular y muerte celular de adipocitos inducida por TNF- α . (A) Porcentaje de Viabilidad celular medida mediante ensayo colorimétrico. (B) Porcentaje de actividad de Caspasa-3 medida mediante ensayo fluorimétrico. Los resultados corresponden al promedio \pm DE de cada tratamiento y las letras sobre las barras indican las diferencias significativas al menos $p < 0.05$ entre ellos. Los datos de viabilidad celular fueron analizados mediante el análisis de la varianza (ANOVA) con el test post-hoc de Tukey, y los datos de muerte celular, mediante el análisis de la varianza (ANOVA) con el test post-hoc de Student–Newman–Keuls. Las condiciones evaluadas fueron ($n=4$): Control, no activada ni pretratada con extractos de frutos; TNF- α , activada con TNF- α ; MA/TNF- α , pretratada con extracto de maqui y activada con TNF- α ; CA/TNF- α , pretratada con extracto de calafate y activada con TNF- α ; AR/TNF- α , pretratada con extracto de arándano y activada con TNF- α .

5.3.2. Efecto sobre la expresión génica y la secreción proteica de marcadores de inflamación.

Los adipocitos activados con TNF- α mostraron un aumento en la expresión génica y en la secreción proteica de MCP-1, al comparar versus la condición control no activada. Y al realizar los pre-tratamientos con los extractos, MA y CA no presentaron variación significativa en los niveles de transcrito respecto a la condición activada, no así AR, el cual los disminuyó de forma significativa (**Figura 13A**). Respecto a la secreción de MCP-1, ésta disminuyó al pre-tratar con CA y AR, y en presencia de MA no mostró cambios significativos respecto a la condición activada (**Figura 13B**). Es decir, CA contrarrestó el aumento de la secreción de MCP-1 inducida por TNF- α .

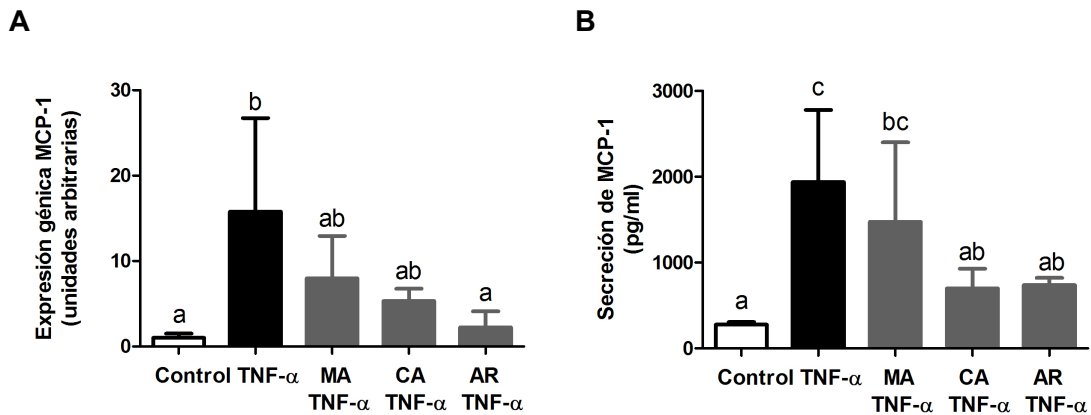


Figura 13. Expresión génica y secreción de MCP-1 en adipocitos. (A) Expresión génica de MCP-1 normalizada por la expresión del gen endógeno β -Actina. (B) Secreción de MCP-1 al medio de cultivo (pg/ml). Los resultados corresponden al promedio \pm DE de cada tratamiento y las letras sobre las barras indican las diferencias significativas al menos $p < 0.05$ entre ellos. Los datos de expresión génica fueron analizados mediante el análisis de la varianza (ANOVA) con el test post-hoc de Tukey, y los datos de secreción, mediante el análisis de la varianza (ANOVA) con la prueba post-hoc de Student-Newman-Keuls. Las condiciones evaluadas fueron ($n=4$): Control, no activada ni pretratada con extractos de frutos; TNF- α , activada con TNF- α ; MA/TNF- α , pretratada con extracto de maqui y activada con TNF- α ; CA/TNF- α , pretratada con extracto de calafate y activada con TNF- α ; AR/TNF- α , pretratada con extracto de arándano y activada con TNF- α .

Los adipocitos activados con TNF- α presentaron un aumento significativo en la expresión génica y secreción de IL-6, respecto a la condición control. Y al pre-tratar con los extractos, no se observaron cambios significativos a nivel de transcrito respecto a la condición activada (**Figura 14A**). Por otro lado, los tres extractos disminuyeron la secreción de IL-6 al comparar con la condición activada (**Figura 14B**). Es decir, MA y CA contrarrestaron el aumento de la secreción de IL-6 inducida por TNF- α .

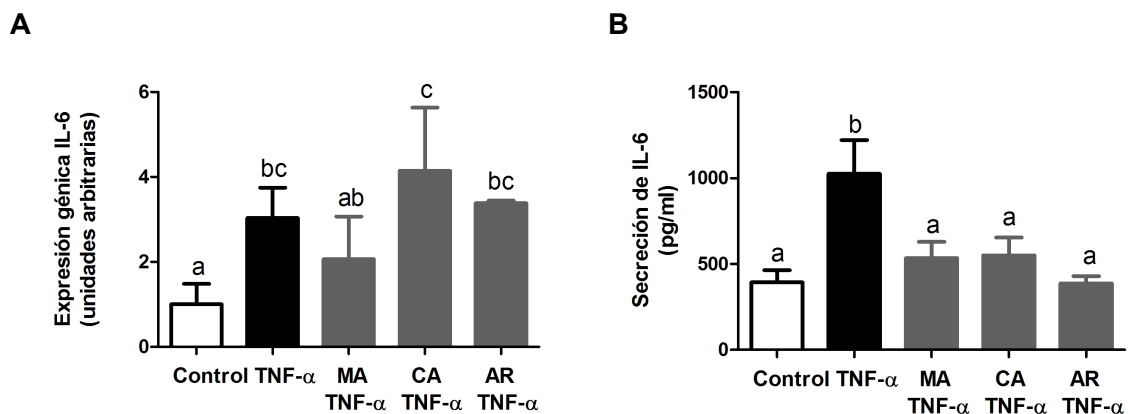


Figura 14. Expresión génica y secreción de IL-6 en adipocitos. (A) Expresión génica de IL-6 normalizada por la expresión del gen endógeno β -Actina. (B) Secreción de IL-6 al medio de cultivo

(pg/ml). Los resultados corresponden al promedio \pm DE de cada tratamiento y las letras sobre las barras indican las diferencias significativas al menos $p < 0.05$ entre ellos. Los datos de expresión génica fueron analizados mediante el análisis de la varianza (ANOVA) con el test post-hoc de Student-Newman-Keuls, y los datos de secreción, mediante el análisis de la varianza (ANOVA) con la prueba post-hoc de Tukey. Las condiciones evaluadas fueron (n=4): Control, no activada ni pretratada con extractos de frutos; TNF- α , activada con TNF- α ; MA/TNF- α , pretratada con extracto de maqui y activada con TNF- α ; CA/TNF- α , pretratada con extracto de calafate y activada con TNF- α ; AR/TNF- α , pretratada con extracto de arándano y activada con TNF- α .

No se detectaron cambios significativos en la expresión génica y secreción proteica de Adiponectina al comparar la condición activada versus la condición control no activada, o versus las condiciones bajo pre-tratamiento con los extractos (**Figuras 15A-B**).

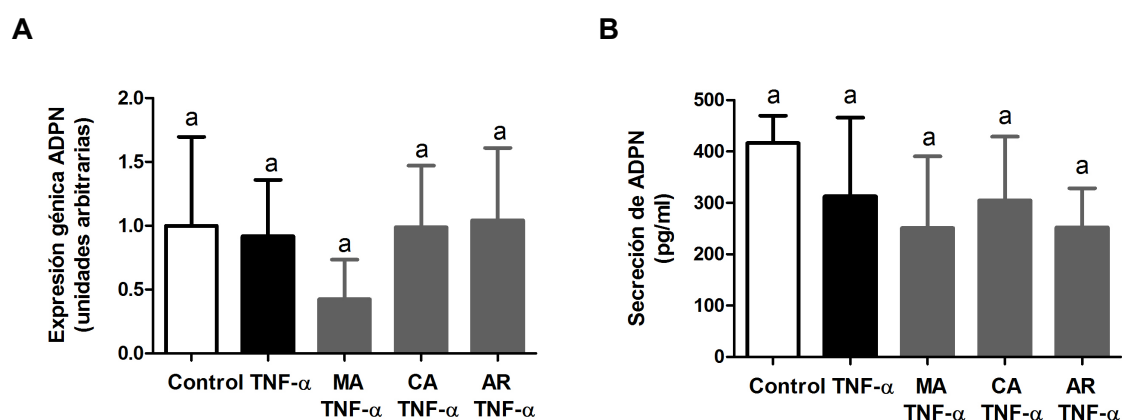


Figura 15. Expresión génica y secreción de Adiponectina en adipocitos. (A) Expresión génica de ADPN normalizada por la expresión del gen endógeno β -Actina. **(B)** Secreción de ADPN al medio de cultivo (pg/ml). Los resultados corresponden al promedio \pm DE de cada tratamiento y las letras sobre las barras indican las diferencias significativas al menos $p < 0.05$ entre ellos. Los datos fueron analizados mediante el análisis de la varianza (ANOVA) con el test post-hoc de Tukey. Las condiciones evaluadas fueron (n=4): Control, no activada ni pretratada con extractos de frutos; TNF- α , activada con TNF- α ; MA/TNF- α , pretratada con extracto de maqui y activada con TNF- α ; CA/TNF- α , pretratada con extracto de calafate y activada con TNF- α ; AR/TNF- α , pretratada con extracto de arándano y activada con TNF- α .

5.3.3. Efecto sobre marcadores fosforilados de cascadas de señalización proinflamatoria.

Los adipocitos activados con TNF- α no presentaron cambios significativos en el porcentaje de p-JNK, p-p38 y p-p65 en comparación con la condición control. Al pre-tratar con MA o CA no se observaron cambios en los niveles de p-JNK, respecto a la condición activada, sin embargo, en presencia de AR hubo un aumento significativo (**Figura 16A**). En el caso de p-38 MAPK, no presentó variaciones significativas al pre-tratar con los extractos versus la condición activada (**Figura 16B**). Y por último, el porcentaje de la

subunidad p65 de NF- κ B fosforilada no mostró cambios significativos al pre-tratar con MA versus la condición activada, pero sí se observó un aumento bajo el pre-tratamiento de CA y AR versus dicha condición (**Figura 16C**).

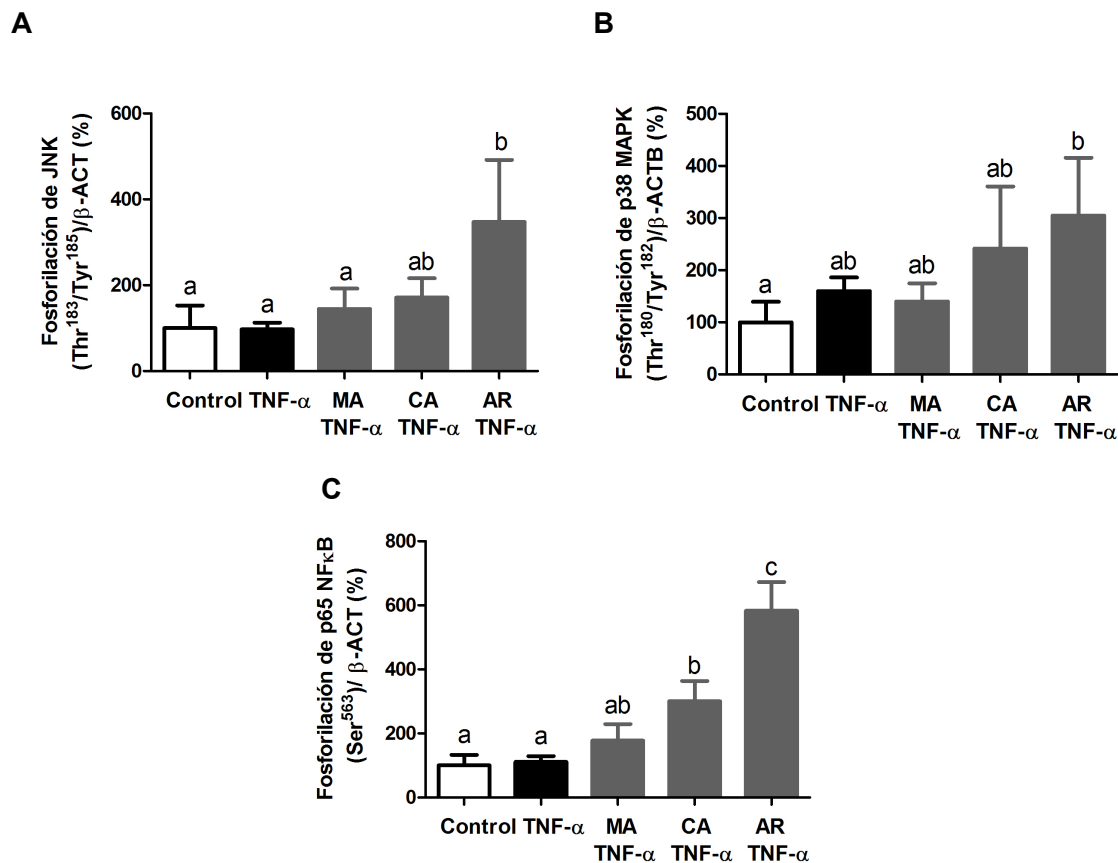


Figura 16. Marcadores fosforilados de cascadas de señalización proinflamatoria en adipocitos. (A) Porcentaje de fosforilación de JNK (Thr¹⁸³/Tyr¹⁸⁵) normalizada por los niveles de β -Actina. **(B)** Porcentaje de fosforilación de p38 MAPK (Thr¹⁸⁰/Tyr¹⁸²) normalizada por los niveles de β -Actina. **(C)** Porcentaje de fosforilación de p65 NF- κ B (Ser⁵⁶³) normalizada por los niveles de β -Actina. Los resultados corresponden al promedio \pm DE de cada tratamiento y las letras sobre las barras indican las diferencias significativas al menos $p < 0.05$ entre ellos. Los datos fueron analizados mediante el análisis de la varianza (ANOVA) con el test post-hoc de Tukey. Las condiciones evaluadas fueron (n=4): Control, no activada ni pretratada con extractos de frutos; TNF- α , activada con TNF- α ; MA/TNF- α , pretratada con extracto de maqui y activada con TNF- α ; CA/TNF- α , pretratada con extracto de calafate y activada con TNF- α ; AR/TNF- α , pretratada con extracto de arándano y activada con TNF- α .

5.4. Efecto antioxidante de los extractos de maqui y calafate sobre adipocitos humanos activados con TNF- α *in vitro*.

5.4.1. Efecto sobre el glutatión oxidado, glutatión reducido y la razón glutatión oxidado/glutatión reducido.

Se observó un aumento significativo en los niveles de GSSG en la condición activada respecto al control, y al pre-tratar con los extractos no hubo cambios significativos respecto a la condición activada (**Figura 17A**). Los niveles de GSH no muestran variaciones significativas entre la condición activada y el control, y en presencia de los extractos, no se observan cambios versus la condición activada, pero sí un aumento versus el control (**Figura 17B**). Además, la razón GSSG/GSH disminuye en la condición con TNF- α y con los extractos respecto al control (**Figura 17C**).

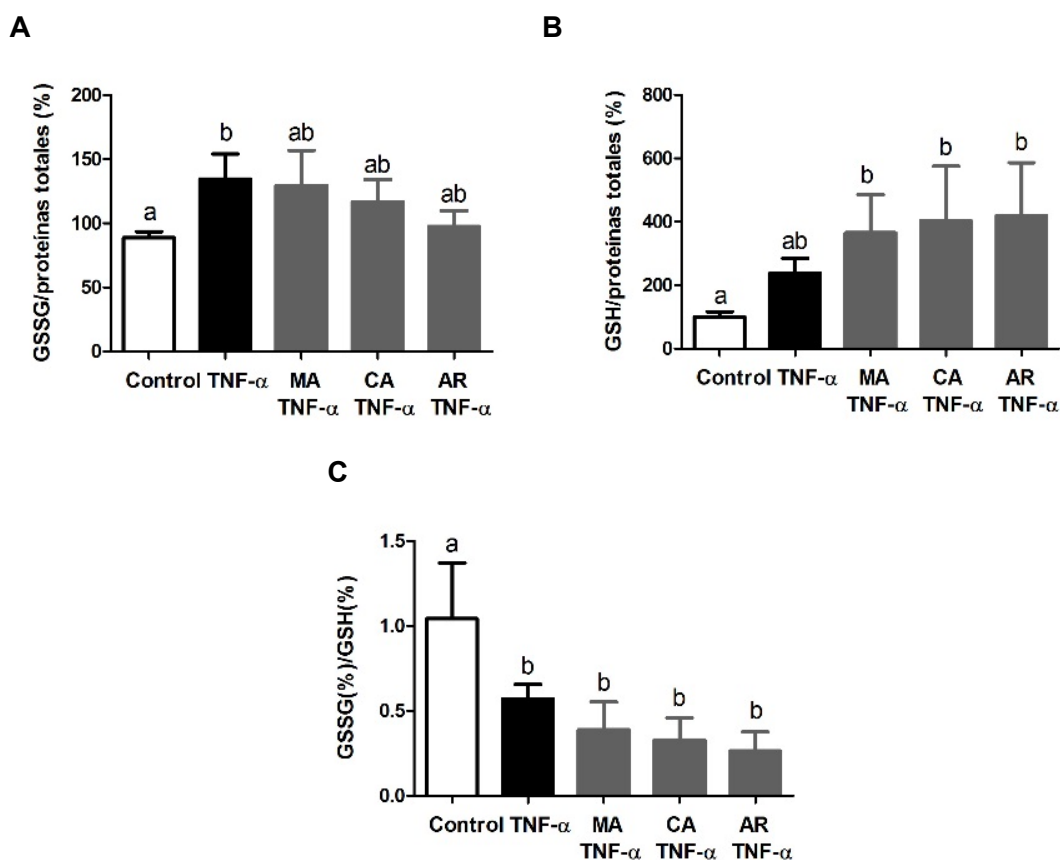


Figura 17. Nivel de glutatión oxidado y reducido, y la razón entre glutatión oxidado/reducido en adipocitos. (A) Nivel de glutatión oxidado (GSSG) (%), (B) Nivel de glutatión reducido (%) y (C) Razón GSSG(%) / GSH(%) indicadora de estrés oxidativo. Los resultados corresponden al promedio \pm DE de cada tratamiento y las letras sobre las barras indican las diferencias significativas al menos $p < 0.05$ entre ellos. Los datos de viabilidad celular fueron analizados mediante el análisis de la varianza (ANOVA) con el test post-hoc de Tukey. Las condiciones evaluadas fueron (n=4): Control, no activada ni pretratada con extractos de frutos; TNF- α , activada con TNF- α ; MA/TNF- α , pretratada con extracto de maqui y activada con TNF- α ; CA/TNF- α , pretratada con extracto de calafate y activada con TNF- α ; AR/TNF- α , pretratada con extracto de arándano y activada con TNF- α .

5.4.2. Efecto sobre la actividad de enzimas antioxidantes.

No se observó diferencia significativa en la actividad de la enzima SOD al estimular con TNF- α versus el control, asimismo, no hubo variaciones al pre-tratar con los extractos en comparación a la condición activada. Sin embargo, al pre-tratar con MA hay un aumento en la actividad de SOD versus el control, lo cual se traduce en un efecto antioxidante (**Figura 18A**). Por otra parte, la actividad de la enzima CAT no presentó variaciones al comparar la condición activada con el control, pero sí con los extractos, presentando disminución de forma significativa respecto a la condición activada y control (**Figura 18B**).

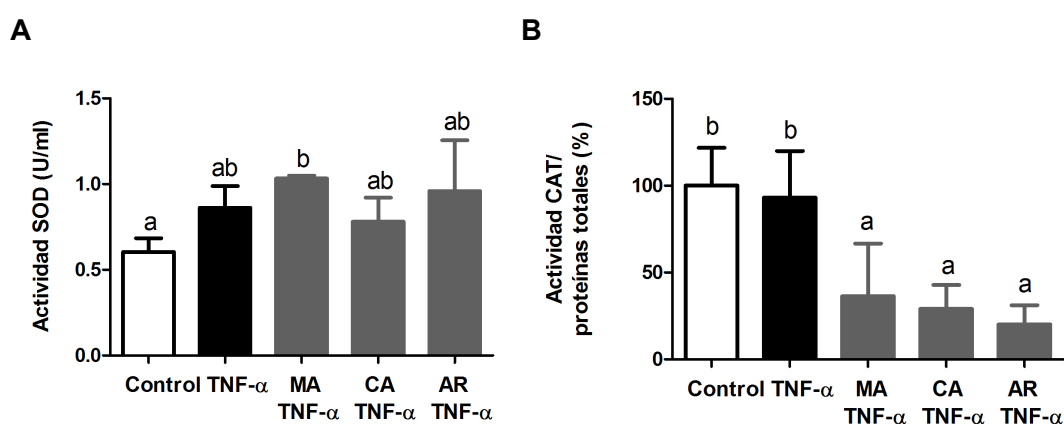


Figura 18. Actividad de enzimas antioxidantes en adipocitos. (A) Actividad de la enzima superóxido dismutasa (U/ml). **(B)** Actividad de la enzima catalasa (nmol/min/ml). Los resultados corresponden al promedio \pm DE de cada tratamiento y las letras sobre las barras indican las diferencias significativas al menos $p < 0.05$ entre ellos. Los datos fueron analizados mediante el análisis de la varianza (ANOVA) con el test post-hoc de Tukey. Las condiciones evaluadas fueron ($n=4$): Control, no activada ni pretratada con extractos de frutos; TNF- α , activada con TNF- α ; MA/TNF- α , pretratada con extracto de maqui y activada con TNF- α ; CA/TNF- α , pretratada con extracto de calafate y activada con TNF- α ; AR/TNF- α , pretratada con extracto de arándano y activada con TNF- α .

5.5. Efecto insulinosensibilizador de los extractos de maqui y calafate sobre adipocitos humanos resistentes a insulina inducidos por inflamación in vitro.

5.5.1. Efecto sobre la captación de glucosa.

No se observaron cambios significativos en la captación de glucosa al comparar la condición con TNF- α e INS, respecto a la condición con INS o respecto a la condición con tratamiento de CA, ni al pre-tratar con los extractos versus dichas condiciones. La única

variación significativa observada en la captación fue un aumento al tratar con MA respecto al pre-tratamiento con AR (**Figura 19**).

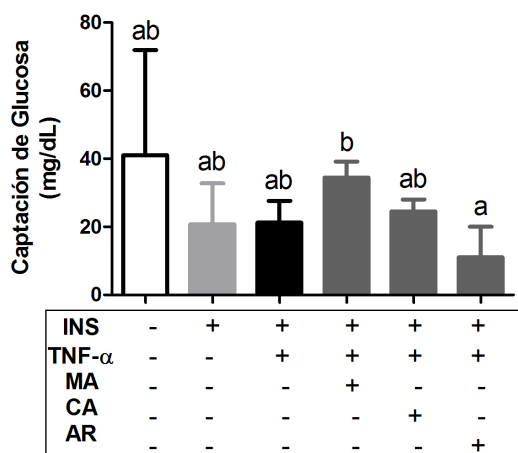


Figura 19. Captación de glucosa en adipocitos con insulino-resistencia inducida por inflamación. Niveles de glucosa captada por los adipocitos (mg/dL). Los resultados corresponden al promedio \pm DE de cada tratamiento y las letras sobre las barras indican las diferencias significativas al menos $p < 0.05$ entre ellos. Los datos fueron analizados mediante el análisis de Kruskal-Wallis con el test post-hoc de Dunn. Las condiciones evaluadas fueron ($n=4$): Control, no activada ni tratada con extractos de frutos ni insulina; INS, no activada y tratada con insulina; TNF- α /INS, activada con TNF- α y tratada con insulina; TNF- α / MA/INS, activada con TNF- α y tratada con extracto de maqui e insulina; CA/TNF- α /INS, activada con TNF- α y tratada con extracto de calafate e insulina; AR/TNF- α /INS, activada con TNF- α y tratada con extracto de Arándano e insulina.

5.5.2. Efecto sobre la viabilidad celular.

No se detectaron cambios significativos en el porcentaje de viabilidad celular al comparar las diferentes condiciones (**Figura 20**).

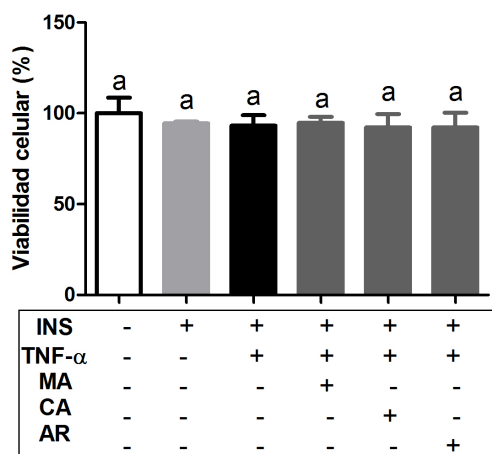


Figura 20. Viabilidad celular de adipocitos con insulino-resistencia inducida por inflamación. Los resultados corresponden al promedio \pm DE de cada tratamiento y las letras sobre las barras indican las diferencias significativas al menos $p < 0.05$ entre ellos. Los datos fueron analizados mediante el análisis de la varianza (ANOVA) con el test post-hoc de Tukey. Las condiciones evaluadas fueron ($n=4$): Control, no activada ni tratada con extractos de frutos ni insulina; INS, no activada y tratada con insulina; TNF- α /INS, activada con TNF- α y tratada con insulina; TNF- α / MA/INS, activada con TNF- α y tratada con extracto de maqui e insulina; CA/TNF- α /INS, activada con TNF- α y tratada con extracto de calafate e insulina; AR/TNF- α /INS, activada con TNF- α y tratada con extracto de Arándano e insulina.

5.5.3. Efecto sobre un marcador fosforilado de la cascada de señalización de la insulina.

No se observaron cambios significativos sobre el porcentaje de p-PI3K en la condición con TNF α e INS, respecto a la condición con INS. Los tratamientos con los extractos no provocaron variaciones significativas en el porcentaje de p-PI3K, en comparación a la condición con TNF α e INS, sin embargo, en presencia de MA se detectó un aumento de este mediador de la señalización de la insulina al comparar con las condiciones con y sin INS (**Figura 21**).

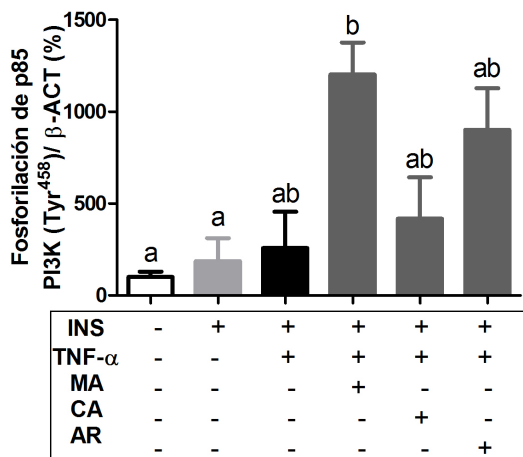


Figura 21. Fosforilación de PI3K en adipocitos con insulino-resistencia inducida por inflamación. Porcentaje de fosforilación de PI3K normalizada por los niveles de β -Actina. Los resultados corresponden al promedio \pm DE de cada tratamiento y las letras sobre las barras indican las diferencias significativas al menos $p < 0.05$ entre ellos. Los datos fueron analizados mediante el análisis de Kruskal-Wallis con el test post-hoc de Dunn. Las condiciones evaluadas fueron (n=4): Control, no activada ni tratada con extractos de frutos ni insulina; INS, no activada y tratada con insulina; TNF- α /INS, activada con TNF- α y tratada con insulina; TNF- α / MA/INS, activada con TNF- α y tratada con extracto de maqui e insulina; CA/TNF- α /INS, activada con TNF- α y tratada con extracto de calafate e insulina; AR/TNF- α /INS, activada con TNF- α y tratada con extracto de Arándano e insulina.

6. DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en base a los ensayos realizados en el modelo de inflamación en macrófagos humanos *in vitro* y en los modelos de diferenciación, inflamación e insulino-resistencia por inflamación crónica en adipocitos humanos *in vitro*, fueron discutidos para determinar si los extractos presentaron efectos anti-inflamatorios, antioxidantes, adipogénicos, antilipolíticos e insulino-sensibilizadores, y en base a ello, determinar si son candidatos para la generación de estrategias terapéuticas que permitan contrarrestar el estado inflamatorio asociado a obesidad y sus comorbilidades.

6.1. Efecto anti-inflamatorio de los extractos de maqui y calafate sobre macrófagos humanos activados con LPS *in vitro*.

Los macrófagos son capaces de adquirir distintos fenotipos de polarización con un determinado patrón de expresión de citoquinas, marcadores de superficie y enzimas metabólicas, dependiendo del estímulo ambiental que los active³³. Se ha observado que el tejido adiposo sano contiene macrófagos de tipo M2, por lo que secreta citoquinas anti-inflamatorias, tales como IL-10³². Por otro lado, se ha descrito que al aumentar la acumulación lipídica³⁴, hecho que ocurre en tejidos adiposos inflamados de obesos, los macrófagos cambian su polarización desde el tipo M2 hacia un tipo M1, secretando citoquinas pro-inflamatorias, tales como TNF- α e IL-6, y produciendo ROS, como por ejemplo, NO mediante la activación de iNOS³³. Asimismo, se ha reportado que existe una relación entre los procesos de activación de los macrófagos y la modulación de los procesos apoptóticos. La activación de la iNOS, y así, la liberación de NO ha sido correlacionada con la consecuente inducción de apoptosis en los macrófagos¹³⁰⁻¹³².

Los resultados obtenidos, muestran inducción de la secreción de NO por LPS respecto al control (**Figura 3**), de forma significativa, la cual es inhibida por los extractos (**Figura 4**). Se observan los mismos efectos anti-inflamatorios de los extractos, obtenidos en estudios realizados en nuestro laboratorio, previamente, con macrófagos RAW264.7 murinos estimulados con LPS, con medio condicionado de adipocitos 3T3-L1 de ratón y con co-cultivo con dichos adipocitos *in vitro*¹⁰⁷. Los niveles de NO muestran una correlación lineal negativa con la viabilidad celular ($r = -0,879^{**}$, $p = 3,5 \times 10^{-10}$) y una correlación lineal

positiva con los niveles de apoptosis medidos ($r= 0,656^{**}$, $\rho= 0,0002$) (datos no presentados en sección de “Resultados”). De la misma forma, existe una correlación lineal negativa entre la viabilidad celular y apoptosis ($r= -0,652^{**}$, $\rho= 0,0002$) (**Figura 5C**). Por esto, se puede suponer la pérdida de viabilidad celular mediante apoptosis inducida por niveles elevados de NO, lo cual se ve contrarrestado en presencia de los extractos (**Figura 5A-B**).

Respecto a las citoquinas analizadas, la expresión génica de TNF- α no presentó variaciones significativas al comparar el control o los pre-tratamientos con la condición activada con LPS. No obstante, en presencia de CA o AR se observó un aumento en su expresión al comparar con el control (**Figura 6A**), pero hay gran dispersión de los datos que los torna poco confiables para este análisis. Al contrario, la secreción de TNF- α disminuye con LPS de forma significativa, respecto al control, y con los extractos no hay cambios significativos versus la condición activada (**Figura 6B**). Se piensa que TNF- α podría ser regulado a nivel post-transcripcional¹³³ como mecanismo compensatorio de endotoxemia¹³⁴, lo que debe ser mejor estudiado.

No se observaron cambios en los niveles de transcrito de IL-6, y los datos de las condiciones pretratadas con extractos presentan gran dispersión (**Figura 7A**), por lo que le restan confiabilidad al análisis de su nulo efecto. Por otro lado, a nivel de secreción, se indujo un aumento de IL-6 al tratar con LPS, lo cual fue contrarrestado en presencia de CA (**Figura 7B**), demostrando una respuesta anti-inflamatoria.

En relación a IL-10, si se considera el perfil de secreción de los macrófagos M1, se esperaría una disminución de esta citoquina, debido a su acción predominantemente antiinflamatoria. Sin embargo, los resultados arrojados determinaron un aumento significativo en la expresión de IL-10 inducida por LPS, lo cual fue contrarrestado en presencia de MA (**Figura 9**). De acuerdo con esto, se ha reportado un efecto inflamatorio de IL-10¹³⁵ inducido por endotoxemia en humanos¹³⁶ y un cambio de polarización de macrófagos inducido por inflamación asociada a una dieta alta en grasa en ratones¹³⁷. Dicha polarización se refiere a una de tipo M2b inflamatoria, diferente a la activación clásica de tipo M1, la cual presenta alta secreción de IL-10¹³⁸. Por ello, nuestros resultados podrían ser explicados como el cambio de polarización de macrófagos hacia

un tipo M2b, que secreta IL-10 pro-inflamatoria. Según esto, el efecto de los extractos se traduciría a un efecto anti-inflamatorio frente a la condición con LPS.

Por otro lado, no hubo relación entre la secreción de NO y la expresión génica de iNOS, la enzima encargada de su síntesis. Existe evidencia de que dosis moderadas de NO pueden tener un rol más bien protector que inductor de la apoptosis en este tipo celular^{139,140}. Por lo que la disminución del transcrito de iNOS (**Figura 8**), podría ser un mecanismo compensatorio de los macrófagos para disminuir los niveles de NO aumentados en las primeras fases del experimento, y que se encuentra en el medio de cultivo, para así evitar la exacerbada muerte celular que impediría mantener el estado inflamatorio. Tanto al tratar con LPS como con CA se observaron niveles menores de transcrito de iNOS que el control (**Figura 8**). Esto sugiere que hay compensación inducida por apoptosis debido al efecto citoprotector de los extractos que disminuyen la liberación de NO y la apoptosis, manteniendo niveles de viabilidad celular similares a la condición control. Dichos resultados, además, se correlacionan con los niveles de secreción de TNF- α ($r = -0,542^{**}$, $p = 0,003$) (datos no presentados en sección de “Resultados”), por lo que se piensa que hubo una modulación de iNOS mediada por TNF- α como bien se ha reportado en la literatura¹⁴¹.

En este sentido, los resultados indican el predominio de un fenotipo inflamatorio inducido por LPS y un efecto anti-inflamatorio mediado por MA y CA, respecto a viabilidad y muerte celular, MA en relación a la liberación de NO y expresión de IL-10, y CA en relación a la secreción de IL-6.

6.2. Efecto antilipolítico y adipogénico de los extractos de maqui y calafate sobre adipocitos humanos activados con TNF- α *in vitro*.

El desbalance energético positivo en la obesidad, ya sea por la ingesta de una dieta alta en grasa y/o por falta de actividad física, conduce a la expansión de TAB y a una acumulación ectópica de lípidos, lo cual induce a un aumento en la tasa de lipólisis. Junto con esto, hay una inhibición de la adipogénesis, lo cual se relaciona con el desarrollo de insulino-resistencia. La distribución de la misma cantidad de grasa en los adipocitos hipertróficos, sería mejor distribuida entre un número mayor de células dado por la

adipogénesis, lo cual disminuiría ciertos mediadores de inflamación (Ej. TNF- α) que inducen la infiltración de adipocitos⁴⁹, y así, el riesgo de IR y comorbilidades.

Los resultados asociados a adipogénesis, informaron una diferenciación significativa de los preadipocitos viscerales humanos tratados con el medio de diferenciación entregado por el proveedor, respecto al control no diferenciado (**Figura 10A**). Esto indica que los posteriores experimentos se realizaron con adipocitos óptimamente diferenciados. No obstante, al realizar el tratamiento con los extractos, no se observaron efectos anti- ni pro-adipogénicos significativos al medir el porcentaje de triglicéridos (**Figura 10B**).

Por otra parte, los resultados indican que no hubo diferencia significativa en la lipólisis inducida por TNF- α respecto a la condición control o al pre-tratamiento con los extractos, pero se observó un efecto antilipolítico de CA en comparación al control (**Figura 11**).

Es síntesis, los extractos no presentaron un efecto adipogénico, pero sí se observó un efecto antilipolítico, en el caso del extracto de Calafate.

6.3. Efecto anti-inflamatorio de los extractos de maqui y calafate sobre adipocitos humanos activados con TNF- α *in vitro*.

Se ha reportado que a medida que se desencadena la hipertrofia adipocitaria en obesidad, aumenta el estrés metabólico y hay inducción de apoptosis, junto con la liberación de diversos mediadores de inflamación, tales como MCP-1 e IL-6, y disminución de otros, tal como Adiponectina, lo cual estimula la infiltración de macrófagos al tejido³⁹. Esto exacerba la respuesta inflamatoria, ya sea mediante vías dependientes y/o independientes (vía MAPK) de NF- κ B^{17,40}.

Un estudio donde se estimularon preadipocitos y adipocitos humanos con TNF- α a distintas concentraciones hasta un máximo de 24 horas, presentó aumento en los niveles de apoptosis (5-25%), respecto a un control no activado (0 y 2,3%)¹⁴². De esta forma, se esperaría disminución en la viabilidad celular y un aumento de apoptosis en nuestros ensayos. Sin embargo, los resultados de viabilidad celular no presentaron cambios significativos al activar con TNF- α respecto a los pre-tratamientos con los extractos o el

control (**Figura 12A**), sugiriendo que no hay muerte celular mediante el estímulo de TNF- α ni activación de mecanismos de supervivencia con los extractos. Sin embargo, hay gran dispersión de los datos de la condición con TNF- α , lo que torna poco confiable el análisis comparativo. Por otro lado, respecto a los niveles de apoptosis, se observa una inducción con TNF- α , la cual es revertida en presencia de los extractos (**Figura 12B**) y tiene relación con lo descrito en la literatura¹⁴².

Los resultados arrojados para MCP-1, muestran un aumento significativo en su expresión y secreción al estimular con TNF- α , y a nivel de secreción fue contrarrestado en presencia CA (**Figura 13A-B**). Además, la expresión y secreción de IL-6 fue inducida por TNF- α de forma significativa, y en el caso de secreción, disminuyó al pre-tratar con todos los extractos (**Figura 14A-B**). Por último, la expresión y secreción de Adiponectina, no presentó variaciones entre la condición con estímulo de TNF- α respecto al control, ni respecto a las condiciones en presencia de los extractos (**Figura 15A-B**).

También se midieron los niveles de marcadores fosforilados que participan en vías proinflamatorias, con el fin de descifrar qué mediadores desencadenan las respuestas inflamatorias en obesidad, y por ende, cuáles son las rutas que podrían estar inhibiendo los extractos para ejercer su efecto anti-inflamatorio. Respecto al porcentaje de p-JNK y p-38 MAPK, no hubo cambios significativos al comparar la condición activada con el control o con los pre-tratamientos de MA o CA (**Figura 16A-B**). Adicionalmente, al medir p-p65 NF-kB, no hubo cambios en los niveles de fosforilación al tratar con TNF- α en comparación al control, y con los extractos se observó un aumento al pre-tratar con CA respecto a la condición activada (**Figura 16C**). Estos datos indicarían que el mecanismo inflamatorio no se desencadena por vías mediadas por p-JNK, p-p38 MAPK o p-p65 NF-kB, ya que no presentaron cambios al ser activados.

Los resultados en relación a las adipoquinas y mediadores fosforilados, se pueden contrastar con un estudio realizado donde se comparó la expresión de MKP-1 con los marcadores de inflamación propuestos a distintos tiempos de progresión de hipertrofia de adipocitos 3T3-L1 (8, 15 y 21 días)²⁴. Esto sugiere que la expresión y secreción de Adiponectina no presentó cambios debido a que el tiempo de inducción de hipertrofia con el estímulo inflamatorio, fue insuficiente (10 días) para detectarlos, y por tanto, no se debe

a que TNF- α no participe en su modulación, necesariamente. En dicho estudio indican una disminución significativa en la expresión de Adiponectina luego de 15-21 días de hipertrofia inducida y en la secreción, luego de 8-15 días²⁴, lo cual se correlaciona con la inhibición de MKP-1. O por otro lado, según resultados previos obtenidos en nuestro laboratorio en un modelo de co-cultivo con RAW264.7 y 3T3-L1, la hipertrofia puede ser inducida por menos tiempo para observar un descenso en la expresión de Adiponectina respecto al control, pero debe ser en presencia de más estímulos que induzcan inflamación¹⁰⁷. Los datos graficados son de gran dispersión, lo que tendría relación con la prematura medición, pues aún no se presentarían patrones de expresión y secreción bien definidos para Adiponectina.

Considerando los niveles de marcadores fosforilados, en este artículo no se obtuvo aumento significativo de p-JNK en los tiempos medidos, al igual que nuestros resultados, sugiriendo la activación de una vía inflamatoria independiente de p-JNK. Respecto a p-p38 MAPK, se observa un aumento significativo entre 15-21 días de hipertrofia, por lo que sí podría ser una ruta inflamatoria factible de análisis respecto al tratamiento con los extractos, pero a tiempos de medición más prolongados. Junto con esto, en el artículo se reportó un aumento de p-ERK entre el día 15-21, del mismo modo que de p-p38 MAPK y que la inhibición de MKP-1, por lo que podría ser objeto de estudio, pues podrían ser vías que se activan al disminuir MKP-1 y que actúan sinérgicamente, siendo un blanco de acción para el efecto de los extractos.

Estos resultados indicaron que MA y CA tuvieron un efecto anti-inflamatorio en relación a la apoptosis y la secreción de IL-6, y CA en relación a la secreción de MCP-1.

6.4. Efecto antioxidante de los extractos de maqui y calafate sobre adipocitos humanos activados con TNF- α *in vitro*.

Se ha descrito que la defensa antioxidante (SOD, CAT y GPx) es menor en obesos que en pacientes con sobrepeso o en pacientes sanos⁶⁰⁻⁶³. En relación a esto, se midió la actividad de SOD y CAT, y los niveles de GSH, GSSG y la razón GSSG/GSH. Los resultados indican que no hubo un aumento en la actividad enzimática de CAT inducido por TNF- α y que los extractos disminuyeron su actividad (**Figura 18B**). Por otro lado, la

actividad de SOD no mostró diferencias significativas al pre-tratar con los extractos respecto a la condición activada, pero al comparar la condición con pre-tratamiento de MA versus el control, se observó un aumento (**Figura 18A**). Junto con esto, el nivel de GSSG aumentó al estimular con TNF- α , lo cual no tuvo cambios significativos al pre-tratar con los extractos, pero mostró tendencia a su reversión (**Figura 17A**). El nivel de GSH no mostró variaciones significativas respecto al estímulo con TNF- α , no obstante, al comparar los pre-tratamientos con los extractos versus el control, se observó un aumento en su porcentaje (**Figura 17B**). Además, se observó una baja en la razón GSSG/GSH con TNF- α y los extractos respecto al control (**Figura 17C**). Los valores dados por la razón GSSG/GSH indican bajos niveles de estrés oxidativo, y mayor proporción de GSH disponible para la reducción de peróxido de hidrógeno y de lipoperóxidos, como acción del sistema antioxidante GPx/GRd. En este sentido, los extractos están realizando un efecto antioxidante, pues en presencia de éstos, los niveles de GSH aumentan, así como los de la actividad enzimática de SOD. Por otro lado, los bajos niveles en la actividad enzimática de CAT se explican, debido a que el sistema GPx/GRd no actúa en paralelo con el sistema SOD/CAT. Se ha reportado que CAT interviene como defensa antioxidante, en presencia de altas concentraciones de H₂O₂, y por otro lado, a bajas concentraciones interviene GPx. Es decir, se relacionan inversamente respecto a la concentración de H₂O₂¹⁴³.

6.5. Efecto insulinosensibilizador de los extractos de maqui y calafate sobre adipocitos humanos resistentes a insulina inducidos por inflamación *in vitro*.

En la captación de glucosa no se presentaron variaciones, a excepción de la condición pretratada con MA, la cual exhibió tendencia de aumento (**Figura 19**), sugiriendo un efecto insulino-sensibilizador como indica la literatura¹²⁰, lo que podría ser esclarecido con nuevos experimentos. Asimismo, los resultados obtenidos respecto a viabilidad celular no presentaron cambios bajo ningún tratamiento (**Figura 20**), lo cual puede estar relacionado con un efecto citoprotector inducido por la insulina que fue parte del tratamiento. Se ha descrito que la insulina es capaz de bloquear la apoptosis, disminuyendo el estrés oxidativo celular mediante la activación de vías de señalización dependientes de ERK y PI3K en células HepG2¹⁴⁴.

Respecto a p-PI3K, marcador perteneciente a la vía de señalización de la insulina, no presentó cambios significativos entre la condición con TNF- α e INS y los pre-tratamientos con los extractos, pero sí se observó un aumento al tratar con MA respecto a la condición con INS (**Figura 21**). De esta forma, a pesar de que no se observó la instauración del modelo de insulino-resistencia en adipocitos como se esperaba, MA muestra señales de potenciales propiedades insulino-sensibilizadoras.

7. CONCLUSIONES

- 7.1. Los extractos de maqui y calafate promueven *in vitro* la viabilidad celular en correlación a la inhibición apoptosis, el extracto de maqui inhibe la secreción de NO e IL-10, y el extracto de calafate, la secreción de IL-6 en macrófagos humanos activados.
- 7.2. Los extractos de maqui y calafate no mostraron efecto adipogénico *in vitro*. Sin embargo, el extracto de calafate inhibe la lipólisis en adipocitos humanos activados.
- 7.3. Los extractos de maqui y calafate inhiben *in vitro* la apoptosis y la secreción de IL-6, y el extracto de calafate inhibe la secreción de MCP-1 en adipocitos humanos activados.
- 7.4. Los extractos de maqui y calafate aumentan *in vitro* los niveles de GSH, y el extracto de maqui promueve la actividad de SOD en adipocitos humanos activados.
- 7.5. El extracto de maqui promueve *in vitro* la captación de glucosa y aumenta los niveles de fosforilación de PI3K en adipocitos humanos activados de forma crónica.

En resumen, ambos extractos presentan efectos anti-inflamatorios y antioxidantes. El extracto de calafate presenta efecto antilipolítico y el extracto de maqui presenta efecto insulino-sensibilizador. Ninguno presenta efecto adipogénico.

En conclusión, los extractos de *Aristotelia chilensis* y *Berberis microphylla* inhiben la respuesta inflamatoria de adipocitos y macrófagos humanos en los modelos de inflamación *in vitro* propuestos, por lo que podrían ser considerados como una herramienta útil para combatir las comorbilidades desencadenadas por inflamación asociada a obesidad e IR.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. WHO. Overweight and obesity [sitio web]. Geneva, Switzerland: World Health Organization, 2010. Disponible en: <http://www.who.int/topics/obesity/es/>.
2. Griera JL, Manzanares JM, Barbany M, Contreras J, Amigó P, Salas-Salvadó J. Physical activity, energy balance and obesity. *Public Health Nutr.* 2007;10(10A):1194-1199. doi:10.1017/S1368980007000705.
3. Hernández-Jiménez S. Fisiopatología de la obesidad. *Gac Med Mex.* 2004;140(2):27-32.
4. Martínez JA. Body-weight regulation: causes of obesity. *Proc Nutr Soc.* 2007;59(03):337-345. doi:10.1017/S0029665100000380.
5. Low S, Chin MC, Deurenberg-yap M. Review on Epidemic of Obesity. *Ann Acad Med Singapore.* 2009;38(1):57-65.
6. Ortiz-hernández L, Hernández-briones, Ana Delgado-sánchez G. Cambios en factores relacionados con la transición alimentaria y nutricional en México. *Gac Med Mex.* 2006;142(3):181-193.
7. Eckel RH, York D a, Rössner S, et al. Prevention Conference VII: Obesity, a worldwide epidemic related to heart disease and stroke: executive summary. *Circulation.* 2004;110(18):2968-2975. doi:10.1161/01.CIR.0000140086.88453.9A.
8. [MINSAL] Ministerio de Salud. Encuesta nacional de salud 2009-2010. 2010.
9. Atalah E. Epidemiología de la obesidad en Chile. *Rev Med Clin Condes.* 2012;23(2):117-123.
10. [MINSAL] Ministerio de Salud. Encuesta Nacional de Salud 2003. (2004).
11. [OCDE] Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico. *OECD Factbook 2014.*; 2014:246-247.
12. Recasens M, Ricart W, Fernández-Real J. Obesidad e inflamación. *Rev Med Univ Navarra.* 2004;48(2):49-54.
13. Reyes M. Características biológicas del tejido adiposo: el adipocito como célula endocrina. *Rev Med Clin Condes.* 2012;23(2):136-144.
14. Ferris WF, Crowther NJ. Once fat was fat and that was that: our changing perspectives on adipose tissue. *Cardiovasc J Afr.* 2011;22(3):147-154.

15. Harmelen V Van, Dicker A, Ryde M, Hauner H, Lo F, Arner P. Increased Lipolysis and Decreased Leptin Production by Human Omental as Compared With Subcutaneous. *Diabetes*. 2002;51(19):2029-2036.
16. Tran TT, Kahn CR. Transplantation of adipose tissue and stem cells: role in metabolism and disease. *Nat Rev Endocrinol*. 2010;6(4):195-213. <http://dx.doi.org/10.1038/nrendo.2010.20>.
17. Suganami T, Ogawa Y. Adipose tissue macrophages: their role in adipose tissue remodeling. *J Leukoc Biol*. 2010;88(1):33-39. doi:10.1189/jlb.0210072.
18. Lee M-J, Wu Y, Fried SK. Adipose tissue remodeling in pathophysiology of obesity. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2010;13(4):371-376. doi:10.1097/MCO.0b013e32833aabef.Adipose.
19. Cinti S, Mitchell G, Barbatelli G, et al. Adipocyte death defines macrophage localization and function in adipose tissue of obese mice and humans. *J Lipid Res*. 2005;46(11):2347-2355. doi:10.1194/jlr.M500294-JLR200.
20. Halberg N, Khan T, Trujillo ME, et al. Hypoxia-inducible factor 1alpha induces fibrosis and insulin resistance in white adipose tissue. *Mol Cell Biol*. 2009;29(16):4467-4483. doi:10.1128/MCB.00192-09.
21. Pasarica M, Sereda OR, Redman LM, et al. Reduced adipose tissue oxygenation in human obesity: evidence for rarefaction, macrophage chemotaxis, and inflammation without an angiogenic response. *Diabetes*. 2009;58(3):718-725. doi:10.2337/db08-1098.
22. Blancas-Flores G, Almanza-Pérez JC, López-Roa RI, Alarcón-Aguilar FJ, García-Macedo R, Cruz M. La obesidad como un proceso inflamatorio. *Bol Med Hosp Infant Mex*. 2010;67:3-12. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S1665-11462010000200002&script=sci_arttext. Accessed September 26, 2014.
23. Yu R, Kim C-S, Kwon B-S, Kawada T. Mesenteric adipose tissue-derived monocyte chemoattractant protein-1 plays a crucial role in adipose tissue macrophage migration and activation in obese mice. *Obesity*. 2006;14(8):1353-1362. doi:10.1038/oby.2006.153.
24. Ito A, Suganami T, Miyamoto Y, et al. Role of MAPK phosphatase-1 in the induction of monocyte chemoattractant protein-1 during the course of adipocyte hypertrophy. *J Biol Chem*. 2007;282(35):25445-25452. doi:10.1074/jbc.M701549200.
25. Johnson GL, Lapadat R. Mitogen-Activated Protein Kinase Pathways Mediated by ERK , JNK , and p38 Protein Kinases The Protein Kinase Complement of the Human Genome. *Science (80-)*. 2002;298(December):1911-1912.

26. Kosteli A, Sgaru E, Haemmerle G, et al. Weight loss and lipolysis promote a dynamic immune response in murine adipose tissue. *J Clin Invest.* 2010;120(10):3466-3479. doi:10.1172/JCI42845.3466.
27. Shi H, Kokoeva M V, Inouye K, Tzameli I, Yin H, Flier JS. TLR4 links innate immunity and fatty acid – induced insulin resistance. *J Clin Invest.* 2006;116(11):3015-3025. doi:10.1172/JCI28898.TLRs.
28. Wang Y, Rangan GK, Goodwin B, Tay Y-Ch, Wang Y, Harris DC. Lipopolysaccharide-induced MCP-1 gene expression in rat tubular epithelial cells is nuclear factor- B dependent. *Kidney Int.* 2011;57(2000):2011-2022.
29. Suganami T, Tanimoto-Koyama K, Nishida J, et al. Role of the Toll-like receptor 4/NF-kappaB pathway in saturated fatty acid-induced inflammatory changes in the interaction between adipocytes and macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007;27(1):84-91. doi:10.1161/01.ATV.0000251608.09329.9a.
30. Stout RD, Jiang C, Matta B, Tietzel I, Watkins SK, Suttles J. Macrophages Sequentially Change Their Functional Phenotype in Response to Changes in Microenvironmental Influences. *J Immunol.* 2005;175(1):342-349. doi:10.4049/jimmunol.175.1.342.
31. Mantovani A, Sozzani S, Locati M, Allavena P, Sica A. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends Immunol.* 2002;23(11):549-555. doi:10.1016/S1471-4906(02)02302-5.
32. Sica A, Mantovani A. Science in medicine Macrophage plasticity and polarization : in vivo veritas. *J Clin Invest.* 2012;122(3):787-795. doi:10.1172/JCI59643DS1.
33. Lumeng CN, Bodzin JL, Saltiel AR. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *J Clin Invest.* 2007;117(1):175-184. doi:10.1172/JCI29881.
34. Prieur X, Mok CYL, Velagapudi VR, et al. Differential lipid partitioning between adipocytes and tissue macrophages modulates macrophage lipotoxicity and M2/M1 polarization in obese mice. *Diabetes.* 2011;60(3):797-809. doi:10.2337/db10-0705.
35. Hortelano S. Inflamación y macrófagos : amigos o enemigos. *SEBBM.* 2014;(1):1-2.
36. Xu H, Barnes GT, Yang Q, et al. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J Clin Invest.* 2003;112(12):1821-1830. doi:10.1172/JCI19451.tivity.
37. Weisberg SP, Mccann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW. Obesity is associated with macrophage accumulation. *J Clin Invest.* 2003;112(12):1796-1808. doi:10.1172/JCI19246.Obesity.

38. Haegeman G. Inhibition of signal transduction pathways involved in inflammation. *Eur Respir J.* 2003;22(Supplement 44):16s - 19s. doi:10.1183/09031936.03.00000503a.
39. Suganami T, Nishida J, Ogawa Y. A paracrine loop between adipocytes and macrophages aggravates inflammatory changes: role of free fatty acids and tumor necrosis factor alpha. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005;25(10):2062-2068. doi:10.1161/01.ATV.0000183883.72263.13.
40. Gómez-Ambrosi J, Rodríguez A, Catalán V, Frühbleck G. Papel del tejido adiposo en la inflamación asociada a la obesidad. *Rev Española Obes.* 2008;6(9):264-279.
41. Manzur F, Alvear C, Alayón AN. Adipocitos, obesidad visceral, inflamación y enfermedad cardiovascular. *Rev Colomb Cardiol.* 2010;17(5):207-213. doi:10.1016/S0120-5633(10)70243-6.
42. Fantuzzi G. Adipose tissue, adipokines, and inflammation. *J Allergy Clin Immunol.* 2005;115(5):911-919. doi:10.1016/j.jaci.2005.02.023.
43. Fernández-Sánchez A, Madrigal-Santillán E, Bautista M, et al. Inflammation, oxidative stress, and obesity. *Int J Mol Sci.* 2011;12(5):3117-3132. doi:10.3390/ijms12053117.
44. Shoelson SE, Herrero L, Naaz A. Obesity, inflammation, and insulin resistance. *Gastroenterology.* 2007;132(6):2169-2180. doi:10.1053/j.gastro.2007.03.059.
45. Ajuwon KM, Spurlock ME. Adiponectin inhibits LPS-induced NF-kappaB activation and IL-6 production and increases PPARgamma2 expression in adipocytes. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2005;288(5):R1220-R1225. doi:10.1152/ajpregu.00397.2004.
46. Cachofeiro V, Miana M, Martín-fernández B, de las Heras N, Lahera V. Obesidad , inflamación y disfunción endotelial. *Rev Española Obes.* 2006;4(4):195-204.
47. Hastly AH, Surmi BK. NIH Public Access. *Futur Lipidol.* 2008;3(5):545-556. doi:10.2217/17460875.3.5.545.Macrophage.
48. Ruan H, Hacohen N, Golub TR, Van Parijs L, Lodish HF. Tumor Necrosis Factor- α Suppresses Adipocyte-Specific Genes and Activates Expression of Preadipocyte Genes in 3T3-L1 Adipocytes. *Diabetes.* 2002;51(21):1319-1336.
49. Ros M, Medina-Gómez G. Obesity, adipogenesis and insulin resistance. *Endocrinol Nutr.* 2011;58(7):360-369. doi:10.1016/j.endonu.2011.05.008.
50. Berg AH, Scherer PE. Adipose tissue, inflammation, and cardiovascular disease. *Circ Res.* 2005;96(9):939-949. doi:10.1161/01.RES.0000163635.62927.34.

51. Canello R, Henegar C, Viguerie N, et al. Reduction of Macrophage Infiltration and Chemoattractant Gene Expression Changes in White Adipose Tissue of Morbidly Obese Subjects After. *Diabetes*. 2005;54(August):2277-2286.
52. Clément K, Viguerie N, Poitou C, et al. Weight loss regulates inflammation-related genes in white adipose tissue of obese subjects. *FASEB J*. 2004;18(14):1657-1669. doi:10.1096/fj.04-2204com.
53. Canello R, Clément K. Is obesity an inflammatory illness? Role of low-grade inflammation and macrophage infiltration in human white adipose tissue. *BJOG*. 2006;113(10):1141-1147. doi:10.1111/j.1471-0528.2006.01004.x.
54. Furukawa S, Fujita T, Shimabukuro M, et al. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J Clin Invest*. 2004;114(12):1752-1761. doi:10.1172/JCI21625.Research.
55. Hosogai N, Fukuhara A, Oshima K, et al. Adipose tissue hypoxia in obesity and its impact on adipocytokine dysregulation. *Diabetes*. 2007;56(4):901-911. doi:10.2337/db06-0911.
56. Campión J, Milagro FI, Martínez A. Weight Gain Induced by High-Fat Feeding Involves Increased Liver Oxidative Stress. *Obesity*. 2006;14(7):1118-1123.
57. Vincent HK, Taylor a G. Biomarkers and potential mechanisms of obesity-induced oxidant stress in humans. *Int J Obes (Lond)*. 2006;30(3):400-418. doi:10.1038/sj.ijo.0803177.
58. Gutiérrez-ruiz J, Velázquez-paniagua M, Prieto-gómez B. El tejido adiposo como órgano maestro en el metabolismo. *Rev Endocrinología y Nutr*. 2011;19(4):154-162.
59. Han CY, Umemoto T, Omer M, et al. NADPH oxidase-derived reactive oxygen species increases expression of monocyte chemotactic factor genes in cultured adipocytes. *J Biol Chem*. 2012;287(13):10379-10393. doi:10.1074/jbc.M111.304998.
60. Albuali WH. Evaluation of oxidant-antioxidant status in overweight and morbidly obese Saudi children. *World J Clin Pediatr*. 2014;3(1):6-13. doi:10.5409/wjcp.v3.i1.6.
61. Boşnak M, Kelekçi S, Yel S, Koçyiğit Y, Şen V, Ece A. Oxidative Stress in Marasmic Children: Relationships with Leptin. *Eur J Gen Med*. 2010:1-8.
62. Amirkhizi F, Siassi F, Minaie S, Djalali M, Rahimi A, Chamari M. Is obesity associated with increased plasma lipid peroxidation and oxidative stress in women? 2007;2(4):189-192.

63. Viroonudomphol D, Pongpaew P, Tungtrongchitr R, et al. Erythrocyte antioxidant enzymes and blood pressure in relation to overweight and obese Thai in Bangkok. *Southeast Asian J Trop Med Public Heal*. 2000;31(2):325-334.
64. Arteagal A. El sobrepeso y la obesidad como un problema de salud. *Rev Med Clin Condes*. 2012;23(2):145-153.
65. King LK, March L, Anandacoomarasamy A. Obesity & osteoarthritis. *Indian J Med Res*. 2013;63(August):185-193.
66. Valencia-flores M, González VR, Tejeda AO, Castaño-meneses A, García-ramos G, González-barranco J. Apnea del sueño en el paciente obeso. *Rev Endocrinología y Nutr*. 2001;9(2):97-102.
67. Alkhoury N, Gornicka A, Berk MP, et al. Adipocyte apoptosis, a link between obesity, insulin resistance, and hepatic steatosis. *J Biol Chem*. 2010;285(5):3428-3438. doi:10.1074/jbc.M109.074252.
68. Aguilar Cordero MJ, González Jiménez E, García López AP, et al. Obesidad y su implicación en el cáncer de mama. *Nutr Hosp*. 2011;26(4):899-903. doi:10.3305/nh.2011.26.4.5260.
69. Hano García OM, Wood Rodríguez L, Villa Jiménez OM. Obesidad y riesgo de cáncer colorrectal. *Rev Cuba Investig Biomédicas*. 2011;30(2):251-259.
70. Prior RL. Fruits and vegetables in the prevention of cellular oxidative damage. *Am J Clin Nutr*. 2003;78(3 Suppl):570S - 578S. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12936951>.
71. Araya H, Clavijo C, Herrera C. Capacidad antioxidante de frutas y verduras cultivados en Chile *. *Arch Latinoam Nutr*. 2006;56:361-365.
72. Vladimir-kneževi S, Blažekovi B, Bival Stefan M, Babac M. Plant Polyphenols as Antioxidants Influencing the Human Health. In: *Phytochemicals as Nutraceuticals - Global Approaches to Their Role in Nutrition and Health*.; 2012:155-180.
73. Tomás-Barberán FA. Los polifenoles de los alimentos y la salud. *Alim Nutr Salud*. 2003;10(2):41-53.
74. Jochmann N, Lorenz M, Krosigk A Von, et al. The efficacy of black tea in ameliorating endothelial function is equivalent to that of green tea. *Br J Nutr*. 2008;99(4):863-868. doi:10.1017/S0007114507838992.
75. Duffy SJ, Keaney JF, Holbrook M, et al. Short- and Long-Term Black Tea Consumption Reverses Coronary Artery Disease. *Circulation*. 2001;104:151-156.
76. Liu H-S, Chen Y-H, Hung P-F, Kao Y-H. Inhibitory effect of green tea (-)-epigallocatechin gallate on resistin gene expression in 3T3-L1 adipocytes depends

on the ERK pathway. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2006;290(2):E273-E281. doi:10.1152/ajpendo.00325.2005.

77. Hirai S, Takahashi N, Goto T, et al. Functional food targeting the regulation of obesity-induced inflammatory responses and pathologies. *Mediators Inflamm.* 2010;2010:367838. doi:10.1155/2010/367838.
78. Gonzales AM, Orlando R a. Curcumin and resveratrol inhibit nuclear factor-kappaB-mediated cytokine expression in adipocytes. *Nutr Metab (Lond).* 2008;5(17):1-13. doi:10.1186/1743-7075-5-17.
79. García-díaz DF, Reyes-Farías M, Ovalle-marín A. Compuestos bioactivos e inflamación ligada a obesidad. *Rev chil endocrinol diabetes.* 2014;7(1):21-24.
80. Blanco-Colio LM, Muñoz-García B, Martín-Ventura JL, et al. Ethanol beverages containing polyphenols decrease nuclear factor kappa-B activation in mononuclear cells and circulating MCP-1 concentrations in healthy volunteers during a fat-enriched diet. *Atherosclerosis.* 2007;192(2):335-341. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2006.07.035.
81. Pandey KB, Rizvi SI. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxid Med Cell Longev.* 2009;2(5):270-278. doi:10.4161/oxim.2.5.9498.
82. Jiménez JP, Serrano J, Tabernero M, et al. Effects of grape antioxidant dietary fiber in cardiovascular disease risk factors. *Nutrition.* 2008;24(7-8):646-653. doi:10.1016/j.nut.2008.03.012.
83. Siemann EH, Creasy LL. Concentration of the Phytoalexin Resveratrol in Wine. *Am J Enol Vitic.* 1992;43(1):49-52.
84. Soleas GJ, Diamandis EP, Goldberg DM. Resveratrol: A Molecule Whose Time Has Come? And Gone? *Clin Biochem.* 1997;30(2):91-113.
85. Kang L, Heng W, Yuan A, Baolin L, Fang H. Resveratrol modulates adipokine expression and improves insulin sensitivity in adipocytes: Relative to inhibition of inflammatory responses. *Biochimie.* 2010;92(7):789-796. doi:10.1016/j.biochi.2010.02.024.
86. Kim S, Jin Y, Choi Y, Park T. Resveratrol exerts anti-obesity effects via mechanisms involving down-regulation of adipogenic and inflammatory processes in mice. *Biochem Pharmacol.* 2011;81(11):1343-1351. doi:10.1016/j.bcp.2011.03.012.
87. Milne JC, Lambert PD, Schenk S, et al. Small molecule activators of SIRT1 as therapeutics for the treatment of type 2 diabetes. *Nature.* 2007;450(7170):712-716. doi:10.1038/nature06261.Small.
88. Chuang C, Martinez K, Xie G, et al. Quercetin is equally or more effective than resveratrol in attenuating tumor necrosis factor- α - mediated inflammation and

insulin resistance in primary human adipocytes. *Am J Clin Nutr.* 2010;92:1511-1521. doi:10.3945/ajcn.2010.29807.Obesity.

89. García-Lafuente A, Guillamón E, Villares A, Rostagno M a, Martínez JA. Flavonoids as anti-inflammatory agents: implications in cancer and cardiovascular disease. *Inflamm Res.* 2009;58(9):537-552. doi:10.1007/s00011-009-0037-3.
90. Knekt P, Kumpulainen J, Järvinen R, et al. Flavonoid intake and risk of chronic diseases. *Am J Clin Nutr.* 2002;76:560-568.
91. Kang J-H, Kim C-S, Han I-S, Kawada T, Yu R. Capsaicin, a spicy component of hot peppers, modulates adipokine gene expression and protein release from obese-mouse adipose tissues and isolated adipocytes, and suppresses the inflammatory responses of adipose tissue macrophages. *FEBS Lett.* 2007;581(23):4389-4396. doi:10.1016/j.febslet.2007.07.082.
92. Tsuda T. Regulation of Adipocyte Function by Anthocyanins; Possibility of Preventing the Metabolic Syndrome. *J Agric Food Chem.* 2008;56(3):642-646. doi:10.1021/jf073113b.
93. Qin B, Anderson R a. An extract of chokeberry attenuates weight gain and modulates insulin, adipogenic and inflammatory signalling pathways in epididymal adipose tissue of rats fed a fructose-rich diet. *Br J Nutr.* 2012;108(4):581-587. doi:10.1017/S000711451100599X.
94. Wang J, Mazza G. Inhibitory Effects of Anthocyanins and Other Phenolic Compounds on Nitric Oxide Production in LPS/IFN- γ -Activated RAW 264.7 Macrophages. *J Agric Food Chem.* 2002;50:850-857.
95. Aguilera Ortiz M, Reza Vargas M del C, Chew Madinaveitia RG, Meza Velázquez JA. Propiedades funcionales de las antocianinas. *Biotecnía.* 2011;XIII(2):16-22.
96. Wang SY, Jiao H. Scavenging Capacity of Berry Crops on Superoxide Radicals, Hydrogen Peroxide, Hydroxyl Radicals, and Singlet Oxygen. *J Agric Food Chem.* 2000;48(11):5677-5684. doi:10.1021/jf000766i.
97. Ghiselli A, Nardini M, Baldi A, et al. Antioxidant Activity of Different Phenolic Fractions Separated from an Italian Red Wine. *J Agric Food Chem.* 1998;46(2):361-367.
98. Shukitt-Hale B, Galli RL, Meterko V, et al. Dietary supplementation with fruit polyphenolics ameliorates age-related deficits in behavior and neuronal markers of inflammation and oxidative stress. *Age (Dordr).* 2005;27(1):49-57. doi:10.1007/s11357-005-4004-9.
99. Basu A, Rhone M, Lyons TJ. Berries: emerging impact on cardiovascular health. *Nutr Rev.* 2010;68(3):168-177. doi:10.1111/j.1753-4887.2010.00273.x.

100. Flis S, Jastrzebski Z, Namiesnik J, et al. Evaluation of inhibition of cancer cell proliferation in vitro with different berries and correlation with their antioxidant levels by advanced analytical methods. *J Pharm Biomed Anal.* 2012;62:68-78. doi:10.1016/j.jpba.2012.01.005.
101. Suwalsky M, Vargas P, Avello M, Villena F, Sotomayor CP. Human erythrocytes are affected in vitro by flavonoids of *Aristotelia chilensis* (Maqui) leaves. *Int J Pharm.* 2008;363(1-2):85-90. doi:10.1016/j.ijpharm.2008.07.005.
102. Neto CC. Cranberry and blueberry: evidence for protective effects against cancer and vascular diseases. *Mol Nutr Food Res.* 2007;51(6):652-664. doi:10.1002/mnfr.200600279.
103. Seeram NP. Recent trends and advances in berry health benefits research. *J Agric Food Chem.* 2010;58(7):3869-3870. doi:10.1021/jf902806j.
104. Alonso JR. Maqui (*Aristotelia chilensis*): un nutraceutico chileno de relevancia medicinal. *Rev Farm Chile.* 2012;5(2):95-100.
105. Fredes C. Antioxidantes en berries nativos chilenos. *BLACPMA.* 2009;8(6):469-478.
106. Speisky H, López-Alarcón C, Gómez M, Fuentes J, Sandoval-Acuña C. First web-based database on total phenolics and oxygen radical absorbance capacity (ORAC) of fruits produced and consumed within the south Andes region of South America. *J Agric Food Chem.* 2012;60(36):8851-8859. doi:10.1021/jf205167k.
107. Reyes-Farias M, Vasquez K, Ovalle-Marin A, et al. Chilean Native Fruit Extracts Inhibit Inflammation Linked to the Pathogenic Interaction Between Adipocytes and Macrophages. *J Med Food.* 2014:1-10. doi:10.1089/jmf.2014.0031.
108. Schreckinger ME, Wang J, Yousef G, Lila MA, Gonzalez de Mejia E. Antioxidant capacity and in vitro inhibition of adipogenesis and inflammation by phenolic extracts of *Vaccinium floribundum* and *Aristotelia chilensis*. *J Agric Food Chem.* 2010;58(16):8966-8976. doi:10.1021/jf100975m.
109. Benedetti S. *Información Tecnológica de Productos Forestales No Madereros Del Bosque Nativo En Chile. Monografía de MAQUI Aristotelia Chilensis (Mol.) Stuntzs.* (Benedetti S, ed.). Santiago, Chile,; Instituto Forestal Chile; 2012:6-51.
110. Ruiz A, Hermosín-Gutiérrez I, Mardones C, et al. Polyphenols and antioxidant activity of calafate (*Berberis microphylla*) fruits and other native berries from Southern Chile. *J Agric Food Chem.* 2010;58(10):6081-6089. doi:10.1021/jf100173x.
111. Defuria J, Bennett G, Strissel KJ, et al. Dietary Blueberry Attenuates Whole-Body Insulin Resistance in High Fat-Fed Mice by Reducing Adipocyte Death and Its Inflammatory Sequelae. *J Nutr.* 2009;139:1510-1516. doi:10.3945/jn.109.105155.Dietary.

112. Zafra-Stone S, Yasmin T, Bagchi M, Chatterjee A, Vinson J a, Bagchi D. Berry anthocyanins as novel antioxidants in human health and disease prevention. *Mol Nutr Food Res*. 2007;51(6):675-683. doi:10.1002/mnfr.200700002.
113. Ruiz A, Hermosín-Gutiérrez I, Mardones C, et al. Polyphenols and antioxidant activity of calafate (*Berberis microphylla*) fruits and other native berries from Southern Chile. *J Agric Food Chem*. 2010;58(10):6081-6089. doi:10.1021/jf100173x.
114. Escribano-Bailón MT, Alcalde-Eon C, Muñoz O, Rivas-Gonzalo JC, Santos-Buelga C. Anthocyanins in berries of Maqui [*Aristotelia chilensis* (Mol.) Stuntz]. *Phytochem Anal*. 2006;17(1):8-14. doi:10.1002/pca.872.
115. Miranda-Rottmann S, Aspillaga AA, Pérez DD, Vásquez L, Martínez AL., Leightn F. Juice and Phenolic Fractions of the Berry *Aristotelia chilensis* Inhibit LDL Oxidation in Vitro and Protect Human Endothelial Cells against Oxidative Stress. *J Agric Food Chem*. 2002;50:7542-7547.
116. Céspedes CL, Alarcon J, Ávila JG, EL-HAFIDI M. Anti-inflammatory , Antioedema and Gastroprotective Activities of *Aristotelia chilensis* Extracts , Part 2 ** . *BLACPMA*. 2010;9(6):432-439.
117. Céspedes CL, Alarcon J, Avila JG, Nieto A. Anti-inflammatory Activity of *Aristotelia chilensis* Mol . (Stuntz) (Elaeocarpaceae). *BLACPMA*. 2010;9(2):127-135.
118. Céspedes CL, El-Hafidi M, Pavon N, Alarcon J. Antioxidant and cardioprotective activities of phenolic extracts from fruits of Chilean blackberry *Aristotelia chilensis* (Elaeocarpaceae), Maqui. *Food Chem*. 2008;107(2):820-829. doi:10.1016/j.foodchem.2007.08.092.
119. Rubilar M, Jara C, Poo Y, et al. Extracts of Maqui (*Aristotelia chilensis*) and Murta (*Ugni molinae* Turcz.): Sources of Antioxidant Compounds and α -Glucosidase/ α -Amylase Inhibitors. *J Agric Food Chem*. 2011;59(5):1630-1637. doi:10.1021/jf103461k.
120. Rojo LE, Ribnicky D, Logendra S, et al. In vitro and in vivo anti-diabetic effects of anthocyanins from Maqui Berry (*Aristotelia chilensis*). *Food Chem*. 2011;131(2):387-396. doi:10.1016/j.foodchem.2011.08.066.
121. Jara E, Hidalgo J, Flores C, et al. Estudio de un extracto estandarizado de maqui rico en delfinidinas en el mantenimiento del balance de glucosa. *Rev Farm Chile*. 2012;5(2):27.
122. Albrecht C, Pellarin G, Rojas MJ, Albesa I, Eraso AJ. Beneficial effect of *Berberis buxifolia* lam, *Zizyphus mistol* griseb and *Prosopis alba* extracts on oxidative stress induced by chloramphenicol. *Medicina (B Aires)*. 2010;70(1):65-70.

123. Harrison LM, van den Hoogen C, van Haaften WC., Tesh VL. Chemokine Expression in the Monocytic Cell Line THP-1 in Response to Purified Shiga Toxin 1 and/or Lipopolysaccharides. *Infect Immun.* 2005;73(1):403-412. doi:10.1128/IAI.73.1.403.
124. Wang M, Chen Y, Zhang Y, Zhang L, Lu X, Chen Z. Mannan-binding lectin directly interacts with Toll-like receptor 4 and suppresses lipopolysaccharide-induced inflammatory cytokine secretion from THP-1 cells. *Cell Mol Immunol.* 2011;8(3):265-275. doi:10.1038/cmi.2011.1.
125. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 1987;162(1):156-159.
126. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods.* 2001;25(4):402-408. doi:10.1006/meth.2001.1262.
127. Omatsu-Kanbe M, Inoue K, Fujii Y, et al. Effect of ATP on preadipocyte migration and adipocyte differentiation by activating P2Y receptors in 3T3-L1 cells. *Biochem J.* 2006;393(Pt 1):171-180. doi:10.1042/BJ20051037.
128. Griffith OW. Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. *Anal Biochem.* 1980;106(1):207-212. doi:10.1016/0003-2697(80)90139-6.
129. Suzuki H, Robinson MK, Rounds JD, Gatzen C, Wilmore DW. Glutathione Deficiency Accentuates Hepatocellular Fluid Accumulation after Ischemia-Reperfusion. *J Surg Res.* 1994;57(5):632-639. doi:10.1006/jsre.1994.1193.
130. Messmer UK, Brüne B. Nitric oxide (NO) in apoptotic versus necrotic RAW 264.7 macrophage cell death: the role of NO-donor exposure, NAD⁺ content, and p53 accumulation. *Arch Biochem Biophys.* 1996;327(1):1-10. doi:10.1006/abbi.1996.0085.
131. Albina JE, Cui S, Mateo RB, Reichner JS. Nitric Oxide-Mediated Apoptosis in Murine Peritoneal Macrophages. *J Immunol.* 1993;150(11):5080-5085.
132. Sarih M, Souvannavong V, Adam A. Nitric oxide synthase induces macrophage death by apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun.* 1993;191(2):503-508.
133. Giambelluca M, Rollet-Labelle E, Bertheau-Mailhot G, Laflamme C, Pouliot M. Post-transcriptional regulation of tumour necrosis factor alpha biosynthesis: Relevance to the pathophysiology of rheumatoid arthritis. *OA Inflamm.* 2013;1(1):1-6. doi:10.13172/2052-787X-1-1-477.
134. Han J, Brown T, Beutler B. Endotoxin-responsive sequences control Cachectin/Tumor Necrosis Factor biosynthesis at the translational level. *J Exp Med.* 1990;171(February):465-475.

135. Mocellin S, Panelli MC, Wang E, Nagorsen D, Marincola FM. The dual role of IL-10. *Trends Immunol.* 2014;24(1):36-43. doi:10.1016/S1471-4906(02)00009-1.
136. Lauw FN, Pajkrt D, Hack CE, Kurimoto M, van Deventer SJH, van der Poll T. Proinflammatory Effects of IL-10 During Human Endotoxemia. *J Immunol.* 2000;165(5):2783-2789. doi:10.4049/jimmunol.165.5.2783.
137. Lefèvre L, Galès A, Olagnier D, et al. PPAR γ ligands switched high fat diet-induced macrophage M2b polarization toward M2a thereby improving intestinal Candida elimination. *PLoS One.* 2010;5(9):e12828. doi:10.1371/journal.pone.0012828.
138. Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol.* 2004;25(12):677-686. doi:10.1016/j.it.2004.09.015.
139. Brüne B, Gölkel C, Knethen A von. Cytokine and Low-Level Nitric Oxide Prestimulation Block p53 Accumulation and Apoptosis of Raw 264.7 Macrophages. *Biochem Biophys Res Commun.* 1996;229(2):396-401. doi:10.1006/bbrc.1996.1816.
140. Mangan DF, Wahl SM. Differential regulation of human monocyte programmed cell death (apoptosis) by chemotactic factors and pro-inflammatory cytokines. *J Immunol.* 1991;147(10):3408-3412.
141. Fonseca SG, Romão PRT, Figueiredo F, et al. TNF-alpha mediates the induction of nitric oxide synthase in macrophages but not in neutrophils in experimental cutaneous leishmaniasis. *Eur J Immunol.* 2003;33(8):2297-2306. doi:10.1002/eji.200320335.
142. Prins JB, Niesler CU, Winterford CM, et al. Tumor necrosis factor- α induces apoptosis of human adipose cells. *Diabetes.* 1997;46(12):1939-1944.
143. Cisneros P. La glutation reductasa y su importancia biomédica. *Rev Cuba Invest Biomed.* 1995;14(1).
144. Kang S, Song J, Kang H, Kim S, Lee Y, Park D. Insulin can block apoptosis by decreasing oxidative stress via phosphatidylinositol 3-kinase- and extracellular signal-regulated protein kinase-dependent signaling pathways in HepG2 cells. *Eur J Endocrinol.* 2003;148(1):147-155. doi:10.1530/eje.0.1480147.