



“Búsqueda de productos de la metabolización de los polifenoles del fruto del Calafate (*Berberis microphylla*) con propiedades termogénicas sobre adipocitos *in vitro*”

TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE MAGÍSTER EN NUTRICIÓN Y ALIMENTOS, MENCIÓN NUTRICIÓN HUMANA

Tesista: Juan Francisco Orellana Cornejo

Director de Tesis: Diego García Díaz

Enero de 2023
Santiago – Chile

AUTORIZACIÓN

El siguiente documento presentado como Tesis por el estudiante Juan Francisco Orellana Cornejo ha sido revisado y aprobado por mí como Director de Tesis para la presentación formal ante la Comisión Evaluadora que designará el Comité Académico del Magíster en Nutrición y Alimentos.



Prof. Diego García Díaz

Santiago de Chile, 19 de Enero de 2023



Comisión de Tesis

Comisión Evaluadora

Dr. Adriano Costa De Camargo

Dr. Omar Porras Espinoza

Dra. Paulina Ormazábal Leiva

Coordinador del Programa de Magíster

Fernando Pizarro Aguirre

*A mi madre, hermanos y Eduardo,
razones por la cual soy quien soy.*

*A mi suegra y Luis
por vuestro apoyo en momentos de luz y oscuridad.*

*A Negra Ester, Chloé y Emilia
por sus presencias silentes, mimosas y eternas.*

*Y a Paz,
por tu compañía, ternura y amor que completa mi alma.*

Agradecimientos

Agradezco a mi director de tesis, Diego García Díaz, por creer y confiar en mis capacidades y darme un espacio en la ciencia desde mis inicios en pregrado hasta el día de hoy, así como por compartir sus vivencias, conocimiento, consejos y orientación sobre como avanzar y crecer en el ámbito de la academia e investigación.

Hago agradecimiento al apoyo del Dr. Miguel Arredondo, ya que, en momentos de incertidumbre, su laboratorio fue un espacio para el inicio y desarrollo de esta tesis.

Me permito agradecer a Karla Vásquez, Lisette Duarte y Greys Lagos quienes me entregaron conocimiento y me enseñaron técnicas y complejidades presentes en la vida de laboratorio y a Karen Basfi-fer por su apoyo incondicional. También, agradezco a la comisión revisora de tesis, Dr. Adriano Costa de Camargo, Dr. Omar Porras Espinoza y Dra. Paulina Ormazábal Leiva, que con sus comentarios y observaciones enriquecieron esta tesis y escrito, así como al coordinador del programa del magíster, profesor Fernando Pizarro, que con su disposición a la resolución de dudas facilitó este proceso.

Finalmente, hago agradecimiento a la Agencia Nacional de Investigación y Desarrollo por la Beca Magister Nacional adjudicada por mí el año 2020 (ANID N° 2201130) y a la Universidad de Chile por el financiamiento a través de Proyectos de Enlace con Concurso FONDECYT Regular, VID 2020 (ENL15/20), proyecto donde mi tesis se encuentra comprendida.

Índice de Contenidos

LISTA DE ABREVIATURAS	IX
RESUMEN EN CASTELLANO.....	12
RESUMEN EN INGLÉS	14
INTRODUCCIÓN.....	16
EL PROBLEMA MULTIFACTORIAL DE LA OBESIDAD.....	16
TIPOS DE TEJIDO ADIPOSO	16
ACTIVACIÓN TERMOGÉNICA DEL TEJIDO ADIPOSO PARDO.....	17
PARDEAMIENTO DEL TEJIDO ADIPOSO BLANCO	18
BERRIES Y POLIFENOLES	19
CALAFATE Y SU USO EN ADIPOSIDAD	20
HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS	23
HIPÓTESIS	23
OBJETIVOS.....	23
<i>General</i>.....	23
<i>Específicos</i>	23
METODOLOGÍA	24
DEFINICIÓN DE VARIABLES	25
PROCEDIMIENTOS Y TÉCNICAS.....	25
<i>Cultivo celular</i>.....	25
<i>Niveles de transcripción de genes termogénicos</i>	26
<i>Niveles de proteínas de moléculas termogénicas</i>.....	27
ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	28
RESULTADOS	29



DISCUSIÓN.....	37
CONCLUSIONES.....	46
BIBLIOGRAFÍA.....	47
ANEXOS.....	56

Índice de Tablas

ANEXO 3. CONCENTRACIÓN DE LOS PRINCIPALES COMPONENTES PRESENTES EN EL CALAFATE (BERBERIS MICROPHYLLA)	59
ANEXO 4. EFECTOS DEL USO DE EXTRACTOS DE CALAFATE EN MODELOS IN VITRO E IN VIVO SOBRE ADIPOSIDAD Y TERMOGÉNESIS.....	60
ANEXO 6. SUBMETABOLITOS PRESENTES EN EL CALAFATE CON EFECTOS TERMOGÉNICOS Y/O EN ADIPOSIDAD.....	63

Índice de Figuras

FIGURA 1. EXPRESIÓN GÉNICA RELATIVA DE UCP-1 EN ADIPOCITOS MADUROS PROVENIENTES DE CÉLULAS 3T3-L1 DE RATÓN, ESTIMULADOS POR 24 H CON SUBMETABOLITOS DERIVADOS DEL CONSUMO DEL CALAFATE CON UNA CONCENTRACIÓN DE 20, 100, 500 Y 1000 MM POR 24 H.....	31
FIGURA 2. EXPRESIÓN GÉNICA RELATIVA DE UCP-1 EN ADIPOCITOS MADUROS PROVENIENTES DE CÉLULAS 3T3-L1 DE RATÓN, ESTIMULADOS CON 20 MM DE AS, 4-HBA, 3-HPAA Y PAA, Y EGCG CON 20 Y 100 MM, TODOS POR 24 H.....	32
FIGURA 3. EXPRESIÓN GÉNICA RELATIVA DEL PGC-1A EN ADIPOCITOS MADUROS PROVENIENTES DE CÉLULAS 3T3-L1 DE RATÓN, ESTIMULADOS CON 20 MM DE AS, 4-HBA, 3-HPAA Y PAA, Y EGCG CON 20 Y 100 MM, TODOS POR 24 H.....	33
FIGURA 4. EXPRESIÓN GÉNICA RELATIVA DE SIRT1 EN ADIPOCITOS MADUROS PROVENIENTES DE CÉLULAS 3T3-L1 DE RATÓN, ESTIMULADOS CON 20 MM DE AS, 4-HBA, 3-HPAA Y PAA, Y EGCG CON 20 Y 100 MM, TODOS POR 24 H.....	34
FIGURA 5. EXPRESIÓN GÉNICA RELATIVA DE PRDM16 EN ADIPOCITOS MADUROS PROVENIENTES DE CÉLULAS 3T3-L1 DE RATÓN, ESTIMULADOS CON 20 MM DE AS, 4-HBA, 3-HPAA Y PAA, Y EGCG CON 20 Y 100 MM, TODOS POR 24 H.....	35
FIGURA 6. EXPRESIÓN PROTEICA RELATIVA DE UCP-1 (A), PGC-1A (B) Y Hsp70 (C) EN ADIPOCITOS MADUROS PROVENIENTES DE CÉLULAS 3T3-L1 DE RATÓN, ESTIMULADOS CON 20 MM DE PAA Y 100 MM DE EGCG, AMBOS POR 24 H.....	36
FIGURA 7. MECANISMOS PROPUESTOS DE INDUCCIÓN DE TERMOGÉNESIS DEL ÁCIDO FENILACÉTICO EN ADIPOCITOS MADUROS DERIVADOS DE 3T3-L1.	43
ANEXO 1. MECANISMOS DE INDUCCIÓN DE TERMOGÉNESIS EN TEJIDO ADIPOSO PARDO.	56
ANEXO 2. MECANISMOS DE PARDEAMIENTO DE TEJIDO ADIPOSO BLANCO Y SUS PRINCIPALES FACTORES REGULADORES.	58

ANEXO 5. ÁCIDOS HIDROXICINÁMICOS PARENTALES Y SUS SUBMETABOLITOS DERIVADOS PRESENTES EN EL CALAFATE (*BERBERIS MICROPHYLLA*) POSTERIOR A PROCESOS ASOCIADOS A ACTIVIDAD DE LA MICROBIOTA INTESTINAL Y ENZIMÁTICA HEPÁTICA. 62

ANEXO 7. VIABILIDAD CELULAR EN PORCENTAJE (%) CON RESPECTO A CÉLULAS CONTROL (SIN ESTÍMULO DE SUBMETABOLITOS). 67

Lista de Abreviaturas

- 1,4-HBZ:** Ácido 1,4 dihidroxibenceno
3,4-HCA: 3,4-ácido dihidroxicinámico
4-HBA: Ácido 4-hidroxibenzoico
3-HPAA: Ácido 3-hidroxifenilacético
4-HPAA: Ácido 3-(4-hidroxifenil)propiónico
Ac: Grupo acilo
AC: Adenilato ciclasa
ACC: Acetil-CoA carboxilasa.
AKT: Gen de proteína kinasa B
AMPK: Proteína quinasa activada por AMP
ARN: Ácido ribonucleico
ARNm: Ácido ribonucleico mensajero
ASO: Oligonucleótido antisentido específico
ATGL: Triglicérido adiposo lipasa
ATF2: Factor de transcripción activador 2
ATP: Adenosín trifosfato
AG: Ácidos grasos
AS: Ácido siríngico
ADNc: ADN complementario
c/EBP α : Proteína CEBPA (del inglés: CCAAT/enhancer-binding protein alpha)
AMPc: Adenosín monofosfato monocíclico
CaMKII/Ca $^{+2}$: Proteína quinasa II dependiente de calmodulina
CTP1: Carnitina plamitotransferasa 1
DAG: Dieta alta en grasa
DIO2: Yodotironina deiodinasa tipo II
ECNT: Enfermedades crónicas no transmisibles

EGCC: Epigallocatequin galato

Gs: Subunidad de proteína G

G3P: Glicerol-3-fosfato.

HCA: Ácido hidroxícítrico

HDL: Lipoproteínas de alta densidad

HSL: Lipasa sensible a hormona.

Hsp70: Proteína de shock térmico de 70 kDa

LDH: Lactato deshidrogenasa

LPS: Lipopolisacaridos

MC: Medio condicionado

NO: Óxido nítrico

NE: Norepinefrina

PC: Piruvato carboxilasa.

PAA: Ácido fenilacético

PCA: Ácido 3,4-dihidroxibenzoico

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PKA: Proteína quinasa A

Pol III: Polimerasa III

PGC-1 α : Coactivador 1-alfa del receptor gamma activado por proliferador de peroxisomas

PPA: Ácido 3-fenilpropiónico

PPAR γ : Receptor γ activado por el proliferador de peroxisomas

Ppia: Peptidilprolil isomerasa A

PRDM16: Dominio PR que contiene 16.

RXR: Receptor de retinoides X

SIRT1: Sirtuina 1

SD: Sprague-Dawley

TA: Tejido adiposo

TAP: Tejido adiposo pardo

TAB: Tejido adiposo blanco

TG: Triglicéridos

TNF α : Factor de necrosis tumoral alfa

TRPV1: Miembro 1 de la subfamilia V del canal catiónico potencial del receptor transitorio

TR4: Receptor testicular 4

UA: Unidades Arbitrarias

UCP-1: Proteína desacoplante 1

UPC-2: Proteína desacoplante 2

ZDF: Zucker Diabetic

β 3-AR: Receptor adrenérgico β 3

Resumen en Castellano

La obesidad provoca un aumento sostenido de enfermedades crónicas no transmisibles (ECNT) y del gasto en salud. Los tipos de tejido adiposo (TA) abren una posibilidad de tratamiento contra la obesidad mediante el pardeamiento del tejido adiposo blanco (TAB), proceso regulado por distintas vías, principalmente asociadas a proteína desacoplante 1 (UCP-1). Algunos alimentos tendrían un efecto pardeante, como los berries, que se caracterizan por sus altas cantidades de polifenoles, factor asociado a pardeamiento. El calafate (*Berberis microphylla*) es un berry rico en polifenoles que ha sido probado en ensayos como tratamiento contra la obesidad en distintos modelos. Su efecto podría asociarse a la sinergia de sus componentes o de una fracción específica. La literatura muestra que submetabolitos presentes en el calafate tienen efecto sobre la adiposidad. El objetivo de este trabajo es determinar que al menos uno de los submetabolitos derivados del consumo de calafate (*Berberis microphylla*) presenta actividad termogénica y de pardeamiento sobre adipocitos maduros derivados de células 3T3-L1.

En una primera fase, preadipocitos 3T3-L1 diferenciados a adipocitos maduros con un cóctel hormonal fueron expuestos a un set de diferentes submetabolitos derivados de polifenoles de calafate descritos por Bustamante et. al., 2018 en concentraciones de 20, 100, 500 y 1000 μM por 24 horas. Luego, se evaluaron los niveles de expresión génica de UCP-1. Se seleccionaron los tratamientos con mejores resultados llevándolos a una segunda fase de ensayos. Se ejecutaron más repeticiones técnicas utilizando: ácido siríngico (AS), ácido 4-hidroxibenzoico (4-HBA), ácido fenilacético (PAA) y ácido 3-hidroxifenilacético (3-HPAA) en una concentración de 20 μM y epigallocatequina galato (EGCG) en concentraciones de 20 μM y 100 μM por 24 horas.

Se evaluó la expresión génica de UCP-1, PGC-1 α , SIRT1 y PRDM16, así como la expresión proteica de UCP-1, PGC-1 α y Hsp70. Se utilizó ANOVA de una vía con posthoc de Dunnet para analizar diferencias entre los tratamientos. Se consideró un nivel de significancia de $p < 0,05$.

El tratamiento con PAA indujo un aumento significativo en la expresión relativa de UCP-1, equivalente a 3,5 veces mayor respecto al control ($p = 0,001$) en adipocitos maduros. Mientras que, en la expresión proteica, no existieron diferencias con respecto al control. Por lo tanto, el tratamiento con 20 μM de PAA posee un efecto termogénico sobre adipocitos maduros. Estos resultados permitirían nuevos estudios que evalúen la temporalidad y concentración del tratamiento con PAA, y sus vías termogénicas asociadas para comprender acabadamente su efecto.

Resumen en Inglés

Obesity leads to a sustained increase in chronic non-communicable diseases (NCDs) and health expenditure. Adipose tissue (AT) types open a possibility of treatment for obesity through the browning of white adipose tissue (WAT), a process regulated by different pathways, mainly associated with uncoupling protein 1 (UCP-1). Some foods have a browning effect, such as berries, which are characterized by their high amounts of polyphenols, a factor associated with browning. The calafate (*Berberis microphylla*) is a polyphenol-rich berry that has been used in trials as a treatment for obesity in different models. Its effect could be associated to the synergy of its components or a specific fraction. The evidence shows that submetabolites present in calafate have an effect on adiposity. The aim of this work is to determine that at least one of the submetabolites derived from the consumption of calafate (*Berberis microphylla*) has thermogenic and browning activity on mature adipocytes derived from 3T3-L1 cells.

In a first phase, 3T3-L1 preadipocytes differentiated to mature adipocytes with a hormonal cocktail were exposed to a set of different submetabolites derived from calafate polyphenols described by Bustamante et. al., 2018 at concentrations of 20, 100, 500 and 1000 μM for 24 hours. Then, UCP-1 gene expression levels were evaluated. Best performing treatments were selected by taking them to a second phase of assays. Additional technical replicates were performed using: syringic acid (AS), 4-hydroxybenzoic acid (4-HBA), phenylacetic acid (PAA) and 3-hydroxyphenylacetic acid (3-HPAA) in a concentration of 20 μM and epigallocatechin gallate (EGCG) in concentrations of 20 μM and 100 μM for 24 hours.

Gene expression of UCP-1, PGC-1 α , SIRT1 and PRDM16, as well as protein expression of UCP-1, PGC-1 α and Hsp70 were evaluated. One-way ANOVA with

Dunnet's posthoc was performed to analyze differences between treatments. A significance level of $p < 0.05$ was considered.

PAA treatment induced a significant increase in relative expression of UCP-1, equivalent to 3.5-fold higher than control ($p = 0.001$) in mature adipocytes. While, in protein expression, there were no differences compared to control. Thus, treatment with 20 μM PAA has a thermogenic effect on mature adipocytes. These results will allow further studies to evaluate the temporality and concentration of PAA treatment and its associated thermogenic pathways in order to fully understand its effect.

Introducción

El Problema Multifactorial de la Obesidad

La obesidad corresponde a la acumulación excesiva de grasa y que es perjudicial para la salud (1). Los adultos afectados con esta condición corresponde a un 13% de la población mundial (1), en Chile, un 31,2 % es obesa manteniéndose en alza este indicador (2). Esta condición corresponde al factores más importante para el desarrollo de enfermedades crónicas no transmisibles (ECNT) y responsables del 70% de las muertes prematuras (3). Distintos países han estimado costos asociados a la obesidad en sus sistemas de salud. Una revisión sistemática indicó que éstos varían entre 0,7% y 2,8% del presupuesto asignado en salud (4). En Chile, los costos representan más del 2% del gasto en salud (5).

El manejo de la obesidad es complejo por su carácter multifactorial. Su causa principal es un desbalance energético positivo crónico influenciado por factores como la ingesta alimentaria, el metabolismo y la actividad física (6). El resultado de esto lleva a la acumulación de energía en forma de triglicéridos en el tejido adiposo (TA) (7). El TA se compone de preadipocitos, fibroblastos, células endoteliales, del sistema inmune y adipocitos (8). Estos últimos poseen el rol de almacenamiento de triglicéridos (TG) y liberación de ácidos grasos (AG) condicionados al estado energético (8). El TA regula la circulación de productos metabólicos de AG, evitando la acumulación ectópica y con ello, la inflamación crónica de bajo grado (9).

Tipos de Tejido Adiposo

Existen distintos depósitos de TA, sin embargo, se pueden destacar dos principales: visceral y subcutáneo (11). La distribución de éste varía por factores como edad,

sexo y genética (12). En relación con la morfología del TA, es posible catalogarlos en dos tipos: tejido adiposo blanco (TAB) y pardo (TAP), quienes difieren en morfología y función (13). El TAB funciona como almacenamiento de energía y como órgano endocrino. Sus adipocitos se caracterizan por una única gota lipídica y mitocondrias delgadas y alargadas. Mientras que el TAP tiene como función la producción de calor mediante la disipación de energía. Sus adipocitos destacan por pequeñas gotas lipídicas y abundantes mitocondrias (13).

El TAP ha sido descrito principalmente en infantes, sin embargo, también está presente en adultos, el cual varía según edad y masa corporal (11). Una característica del TAP es la expresión de la proteína desacoplante 1 (UCP-1), que corresponde a un transportador de protones ubicado en la membrana mitocondrial interna que permite la traslocación de protones desde el espacio intermembrana a la matriz mitocondrial, logrando disipar la energía en forma de calor, a expensas de la producción de ATP (14). En general, el TA mantiene UCP-1 en un estado inactivo, sin embargo, es posible una activación fisiológica a través de factores como el frío, fármacos o factores nutricionales (15). Los adipocitos de TAP también expresan genes termogénicos para la enzima yodotironina deiodinasa tipo II (DIO2), el coactivador y receptor activado por proliferador de peroxisomas 1- α (PGC-1 α) y del co-regulador transcripcional Dominio PR que contiene 16 (PRDM16) (15).

Activación Termogénica del Tejido Adiposo Pardo

Existe la posibilidad de activar proteínas asociadas a termogénesis en TAB por condiciones fisiológicas o farmacológicas, asimilándolo al TAP, proceso denominado pardeamiento y que origina adipocitos beige. Diversos factores se han asociado al pardeamiento del TAB, principalmente por activación de UCP-1 (16). Estos procesos ocurren mediante estímulos simpáticos y de la interacción de

norepinefrina (NE) con el receptor adrenérgico β_3 (β_3 -AR). Esto logra una cascada de transducción de señales que genera la sobreexpresión de UCP-1 y otras proteínas termogénicas por distintas vías (17). Entre los mecanismos de pardeamiento del TAB, se han descrito algunos vía PGC-1 α , PPAR γ , PRDM16, entre otros, siendo estos los principales reguladores del proceso (18).

En general, la activación del TAP ocurre vía estímulo de frío y mediada por el sistema nervioso que depende de procesos asociados a cAMP/PKA, ya que la interacción de NE-AR- β_3 activa la proteína G que, vía intermediarios, activa proteína quinasa A (PKA) (19). Independiente de la vía principal de activación del TAP, existen factores nutricionales (polifenoles, resveratrol, curcumina, etc.) que podrían activar vías alternativas a través del miembro 1 de la subfamilia V del canal catiónico potencial del receptor transitorio (TRPV1) o en la fosforilación de la proteína quinasa activada por AMP (AMPK), provocando cascadas de activación que llevan como resultado a un aumento de la actividad y/o expresión de genes termogénicos (15), siendo la sirtuina 1 (SIRT1) quien amplifica la respuesta termogénica (Anexo 1) (20).

Pardeamiento del Tejido Adiposo Blanco

En relación al pardeamiento del TAB, ocurre mediante la regulación de UCP-1, a través de mecanismos como el complejo PGC-1 α -PPAR, vía PRDM16 y por el eje AMPK-SIRT1-PGC-1 α . PGC-1 α es un gen que impulsa la biogénesis mitocondrial, siendo la proteína reguladora más importante en la termogénesis (21). Por otro lado, la actividad del complejo PGC-1 α -PPAR puede ser modulada por PRDM16, el cual suprime el perfil de expresión génica usual de TAB y estimula la transcripción de proteínas termogénicas (PGC-1 α , UCP-1 y DIO2), siendo esencial en el desarrollo de adipocitos beige (Anexo 2) (22). Finalmente, con respecto al eje AMPK-SIRT1-

PGC-1 α , SIRT1 produce la desacetilación de PPAR γ , que corresponde a un mecanismo de inducción de pardeamiento (23). Por lo tanto, la modulación de las vías moleculares descritas podría potenciar la activación termogénica de TAP y generación de pardeamiento de TAB (Anexo 2). Los procesos de activación de TAP y de pardeamiento permitirían un mayor reclutamiento de adipocitos pardos y beige. Estos poseen un rol significativo en la homeostasis energética, aumentando el gasto energético y mejorando el metabolismo de la glucosa (24). Además, estos procesos de activación provocan eventos celulares que estimulan la hidrolización y movilización de TG intracelulares en TAB, lo cual estimula la utilización de estos para su oxidación (25). Es por lo que, mediante la estimulación de la actividad de UCP-1 es posible contribuir hacia un balance energético negativo, lo que es necesario para contribuir en el tratamiento contra la obesidad.

Berries y Polifenoles

En la literatura están descritos distintos compuestos nutricionales con potencial efecto pardeante (15). Dentro de estos destacan los polifenoles que corresponden a un grupo de sistemas fenólicos caracterizados por al menos dos grupos fenilo y uno o más sustituyentes hidroxilos (26). Algunos de ellos son: los flavonoles, flavonas, flavanonas, flavanoles, antocianinas, ácidos fenólicos, entre otros (27). Dentro de este gran grupo, los flavonoides y ácidos fenólicos son los que se encuentran en altas concentraciones en los berries (28). Se ha demostrado en la literatura el efecto positivo del uso de berries para el tratamiento y prevención de condiciones asociadas a trastornos metabólicos relacionados con obesidad en distintos modelos experimentales (29). En Chile, se han descrito efectos beneficiosos para distintos berries nativos, principalmente por sus altas concentraciones de antocianinas (30). Dentro de estos es posible destacar al maqui (*Aristotelia chilensis*), la murta (*Ugni molinae T.*) y al calafate (*Berberis microphylla*)

(31). El calafate corresponde a un arbusto espinoso de la familia de *Berberidaceae*, nativo de la Patagonia, cuyo fruto es comestible y rico en polifenoles (32). Sus polifenoles más abundantes son los flavonoides, clasificados en flavonoles, flavonas, isoflavonas, flavanonas, flavanoles y antocianinas (33). Este último grupo se encuentra presente en altas concentraciones (32). La composición de polifenoles del extracto del calafate está descrita en el Anexo 3 (34).

Calafate y su uso en Adiposidad

Por su importancia como alimento rico en antocianinas, es que un grupo del Departamento de Nutrición de la Universidad de Chile ha conducido experimentos utilizando extractos de calafate en modelos *in vitro* e *in vivo*. Los resultados de estos demuestran efectos sobre obesidad y adiposidad en distintos modelos (Anexo 4) (32, 35, 36, 37, 38, 39). Lo anterior evidencia un claro beneficio y una potencial vía de tratamiento contra la obesidad, sin embargo, el efecto biológico de este fruto podría asociarse a la matriz alimentaria, una fracción o un componente específico del calafate. En esta disyuntiva la literatura presenta resultados dispares en el uso de berries o de antocianinas purificadas en modelos animales sometidos a dietas alta en grasa, suplementados con extractos de berries o antocianinas purificadas (40, 41, 42). Sin embargo, las metodologías son diferentes, por lo que, no es posible establecer una comparación concluyente entre estos estudios.

En esta línea, un estudio logró caracterizar las concentraciones de submetabolitos en plasma de jerbo luego de la administración por sonda de 300 mg/kg de extracto de calafate (34). Estos submetabolitos son derivados de la familia de ácidos hidroxicinámicos, provenientes del ácido clorogénico (ácido 5-O-cafeoilquínico) (43), los cuales, a su vez pueden derivar desde las antocianinas (44). Los ácidos hidroxicinámicos son una gran familia de ésteres formados entre el ácido quínico y

uno o más derivados del ácido trans-hidroxicinámico, siendo los más comunes: el ácido cafeico, ácido-p-cumárico y ácido ferúlico (45). Estos se encuentran en una gran variedad de alimentos como peras, alcachofa (ácido clorogénico) (43); café, berries, manzana (ácido cafeico); espinacas (ácido p-cumárico), jugos de cítricos, fibra de betarraga (ácido ferúlico), entre otros (45).

El calafate posee en su composición química derivados de la familia de ácidos hidroxicinámicos, siendo el ácido 5-O-cafeoilquínico quien posee mayor concentración. Este da origen a los submetabolitos identificados a través de distintas reacciones como deshidroxilación, metoxilación, β -oxidación y reducción (34) (Anexo 5). Los compuestos que evidencian un efecto positivo sobre adiposidad en la literatura corresponden al ácido fenilacético (PAA), ácido 4-hidroxifenilacético (4-HPAA), ácido hidroxicítrico (HCA) y ácido siríngico (AS) (Anexo 6) (46, 47, 48, 49, 50, 51, 52).

Por lo tanto, es interesante esclarecer que submetabolitos provenientes del calafate podrían tener efectos termogénicos y sobre adiposidad. Esto con la finalidad de caracterizar los subproductos de este alimento y así hacer más eficiente el uso de la materia prima mediante extractos que posean los compuestos que tengan un efecto termogénico y, de esta forma, buscar nuevas e innovadoras formas de tratamiento contra la obesidad.

Debido a lo anteriormente expuesto, es que en la presente tesis se evaluará el efecto en pardeamiento y/o termogénesis mediante un modelo *in vitro* de células 3T3-L1 de ratón, diferenciadas a adipocitos maduros en conjunto con submetabolitos fenólicos derivados del consumo de calafate. Esto con el fin de demostrar el efecto de los submetabolitos de calafate sobre el pardeamiento de estos adipocitos. Al finalizar el tratamiento, se analizarán marcadores de actividad



termogénica (UCP-1) y de pardeamiento (PGC-1 α , SIRT1 y PRDM16) a través de la medición de expresión génica y proteica.

Hipótesis de Trabajo y Objetivos

Hipótesis

Submetabolitos derivados del consumo de calafate (*Berberis microphylla*) sobre adipocitos maduros derivados de células 3T3-L1 provocan un aumento en la expresión de marcadores asociados a actividad termogénica y de pardeamiento.

Objetivos

General

1. Determinar que al menos uno de los submetabolitos derivados del consumo de calafate (*Berberis microphylla*) presenta actividad termogénica y de pardeamiento sobre adipocitos maduros derivados de células 3T3-L1.

Específicos

1. Cuantificar la expresión génica de UCP-1, PGC-1 α , SIRT1 y PRDM16 y en adipocitos maduros derivados de células 3T3-L1 expuestas a submetabolitos derivados del consumo de calafate (*Berberis microphylla*)
2. Cuantificar la expresión de proteínas termogénicas (PGC-1 α , UCP-1 y Hsp70) en adipocitos maduros derivados de células 3T3-L1 expuestas a submetabolitos derivados del consumo de calafate (*Berberis microphylla*)

Metodología

La muestra usada para el modelo *in vitro* correspondió a fibroblastos multipotenciales 3T3-L1, los cuales son ampliamente utilizados para el estudio de la biología y función de los adipocitos. Este modelo ha sido fundamental para comprender aspectos como la adipogénesis, el metabolismo de los lípidos y las acciones hormonales. Estas células se aislaron y expandieron a partir de células Swiss 3T3 basado en su capacidad para acumular lípidos (53).

En una fase preliminar se efectuó un *screening* de los submetabolitos derivados de consumo de calafate descritos por Bustamante et. al., 2018 (34), donde se evaluó su expresión génica de UCP-1. Los submetabolitos evaluados correspondieron: 3,4-ácido dihidroxicinámico (3,4-HCA), ácido 3,4-dihidroxibenzoico (PCA), ácido siringico (AS), ácido 3-fenilpropiónico (PPA), ácido 4-hidroxibenzoico (4-HBA), ácido fenilacético (PAA), ácido 3-(4-hidroxifenil)propiónico (4-HPPA), ácido 3-hidroxifenilacético (3-HPAA), ácido 1,4 dihidroxibenceno (1,4-HBZ) y como control positivo, epigallocatequina galato (EGCG). Cada uno de ellos fue testeado con concentraciones de 20, 100, 500 y 1000 μM por 24 horas. Posteriormente, luego de determinar los niveles de expresión génica de UCP-1 de cada uno de los submetabolitos, se seleccionaron aquellos con mejor perfil de expresión de UCP-1 para proseguir a una segunda fase. En esta, cada uno de ellos fue testeado con concentraciones de 20 μM por 24 horas, utilizando EGCG como control positivo, el cual fue testeado con 20 y 100 μM por 24 horas.

Definición de Variables

VARIABLES ANALIZADAS EN ADIPOCITOS DE RATÓN PROVENIENTES DE CÉLULAS 3T3-L1.

VARIABLES	Tipo de Variable	Medida	Método	Referencia
Concentración submetabolitos del Calafate	Independiente Continua	μM	-	-
Expresión Génica	Dependiente Continua	Unidades Arbitrarias	PCR en tiempo real	(54)
Expresión Proteica	Dependiente Continua	Unidades Arbitrarias	Western Blot	(55)

Procedimientos y Técnicas

Cultivo celular

Los preadipocitos de ratón 3T3-L1 (Departamento de Nutrición, U. de Chile) se mantuvieron a 37° C en una atmósfera humidificada con CO₂ al 5%. Las células fueron cultivadas en DMEM que contiene 4,5 g/L de glucosa y suero de ternera (BCS) al 10%. Dos días después de la confluencia total, las células se diferenciaron mediante incubación con isobutilmetilxantina 0,5 mM, dexametasona 1 μM , insulina 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en DMEM de glucosa de 4,5 g/L suplementado con suero bovino fetal (FBS) al 10% durante 2 días y en los siguientes 2 días con 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de insulina en 4,5 g/L de glucosa DMEM suplementado con FBS al 10%. Posteriormente, las células se mantuvieron y realimentaron cada 2 días con medio sin hormonas hasta

alcanzar un fenotipo completamente diferenciado (10 días). Luego de obtener adipocitos diferenciados, en la fase preliminar se testearon los submetabolitos derivados de consumo de calafate descritos por Bustamante et. al. 2018 (34). Estos correspondieron a 3,4-ácido dihidroxicinámico (3,4-HCA) (SID 29770154, Sigma Aldrich); ácido 3,4-dihidroxibenzoico (PCA) (SID 329748656, Sigma Aldrich); ácido siringico (AS) (SID 24899724, Sigma Aldrich); ácido 3-fenilpropiónico (PPA) (SID 29768742, Sigma Aldrich), ácido 4- hidroxibenzoico (4-HBA) (SID 329823078, Sigma Aldrich), ácido fenilacético (PAA) (SID 24898234, Sigma Aldrich); ácido 3-(4-hidroxifenil)propiónico (4-HPPA) (SID 24895664, Sigma Aldrich), ácido 3-hidroxifenilacético (3-HPAA) (SID 329770079, Sigma Aldrich), ácido 1,4 dihidroxibenceno (1,4-HBZ) (SID 329823399, Sigma Aldrich) y como control positivo, epigallocatequin galato (EGCG) (SID 329770285, Sigma Aldrich). Todos los compuestos son hidrosolubles. Los tratamientos fueron testeados con concentraciones de 20, 100, 500 y 1000 μM por 24 horas. Posteriormente, en una segunda fase, se seleccionaron aquellos con un mejor perfil de expresión génica de UCP-1 desde la fase preliminar. Cada uno fue testeadado con concentraciones de 20 μM por 24 horas, utilizando EGCG como control positivo, el cual fue testeadado con concentraciones de 20 y 100 μM . La viabilidad celular se controló mediante un ensayo de MTT con el fin de determinar la citotoxicidad de las concentraciones de los submetabolitos utilizados (56).

Niveles de transcripción de genes termogénicos

Los niveles de transcritos relacionados con termogénesis (UCP-1, PGC-1 α , SIRT1 y PRDM16) fueron evaluados mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real de acuerdo con metodología descrita anteriormente (57). En resumen, el ARN total fue aislado de las muestras utilizando Trizol (Invitrogen). El ARN purificado fue tratado con DNasa (Ambion) y se utilizó para generar ADNc de primera hebra con un kit de transcripción inversa de ADNc de alta capacidad

(Applied Biosystems). El ADNc resultante fue amplificado con las sondas específicas (Applied Biosystems) descritas anteriormente. La PCR en tiempo real se realizará en un sistema Stratagene Mx3000P (Agilent Technologies) siguiendo las instrucciones del fabricante (Applied Biosystems). Todos los niveles de expresión de los genes diana estudiados fueron normalizados mediante la expresión de peptidilprolil isomerasa A (Ppia) como control interno (Applied Biosystems). La expresión génica fue calculada mediante el método $2^{-(\text{DDCt})}$.

Niveles de proteínas de moléculas termogénicas

Se efectuó un Western Blot para realizar un análisis de proteínas involucradas en termogénesis. La extracción de proteínas fue realizada siguiendo el proceso con Trizol (Invitrogen), con cócteles inhibidores de proteasa y fosfatasa (Sigma-Aldrich). Luego, las muestras fueron procesadas para obtener proteínas totales en sobrenadantes. La concentración de proteína en esta fracción fue determinada mediante el kit de ensayo de proteínas Pierce BCA (Thermo Scientific). El extracto de proteína preparado en tampón de carga fue sometido a electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturizante al 10% (SDS-PAGE) en condiciones reductoras y fue transferido a membranas de PVDF (Bio-Rad). Las membranas fueron bloqueadas y se incubaron con anticuerpo primario durante la noche a 4°C (UCP-1, PGC-1 α y Hsp70). Después de los lavados en TBST, las membranas fueron incubadas con anticuerpo secundario conjugado a HRP durante 1 hora a temperatura ambiente y luego se lavaron nuevamente en TBST. Las bandas que muestran la expresión de la proteína de interés fueron visualizadas mediante quimioluminiscencia (kit Super Signal West Femto Maximum Sensitivity; Pierce) y se analizaron mediante densitometría utilizando el software Quantity One (Bio-Rad). La expresión relativa de cada proteína evaluada fue normalizada a la expresión de β -actina (Santa Cruz Biotechnology).

Análisis Estadístico

Para el análisis de la comparación de medias de los grupos independientes de tratamientos con submetabolitos se utilizó ANOVA de una vía con post-hoc Dunnet. Los resultados se presentan como media \pm desviación estándar (DE) para las variables dependientes. Los resultados fueron manejados y analizados utilizando el software GraphPad Prism 6.0. La significancia aceptada corresponde a un $p < 0,05$ para cada prueba realizada

Resultados

Los resultados de esta tesis permitieron determinar que uno de los submetabolitos derivados de consumo de calafate presenta actividad termogénica y de pardeamiento significativas sobre adipocitos maduros derivados de células 3T3-L1. Esto se debe a que el ácido fenilacético (PAA), logró una expresión génica 3,5 veces mayor al control, utilizando una concentración de 20 μM . Esto superó al epigallocatequin galato (control positivo) cuya concentración era mayor a la utilizada con PAA, correspondiente a 100 μM , el cual aumentó su expresión 3,5 veces más que el control.

En la fase preliminar del estudio, se efectuó un *screening* de los submetabolitos derivados de consumo de calafate descritos por Bustamante et. al. 2018, evaluando su expresión génica de UCP-1. Estos correspondieron a 3,4- ácido dihidroxicinámico (3,4-HCA), ácido 3,4-dihydroxibenzoico (PCA), ácido siríngico (AS), ácido 3-fenilpropiónico (PPA), ácido 4-hidroxibenzoico (4-HBA), ácido fenilacético (PAA); ácido 3-(4-hidroxifenil)propiónico (4-HPPA), ácido 3-hidroxifenilacético (3-HPAA), ácido 1,4 dihidroxibenceno (1,4-HBZ) y como control positivo, epigallocatequin galato (EGCG). Cada uno de ellos fue testado en un triplicado único ($n = 1$) con concentraciones de 20, 100, 500 y 1000 μM por 24 horas en adipocitos maduros derivados de células 3T3-L1. Los resultados de estos ensayos fueron variados, sin embargo, se seleccionaron cuatro submetabolitos para seguir a la siguiente fase de acuerdo con su nivel de expresión génica relativa de UCP-1. Estos correspondieron a AS, 4-HBA, 3-HPAA y PAA, junto a EGCG como control positivo (Figura 1).

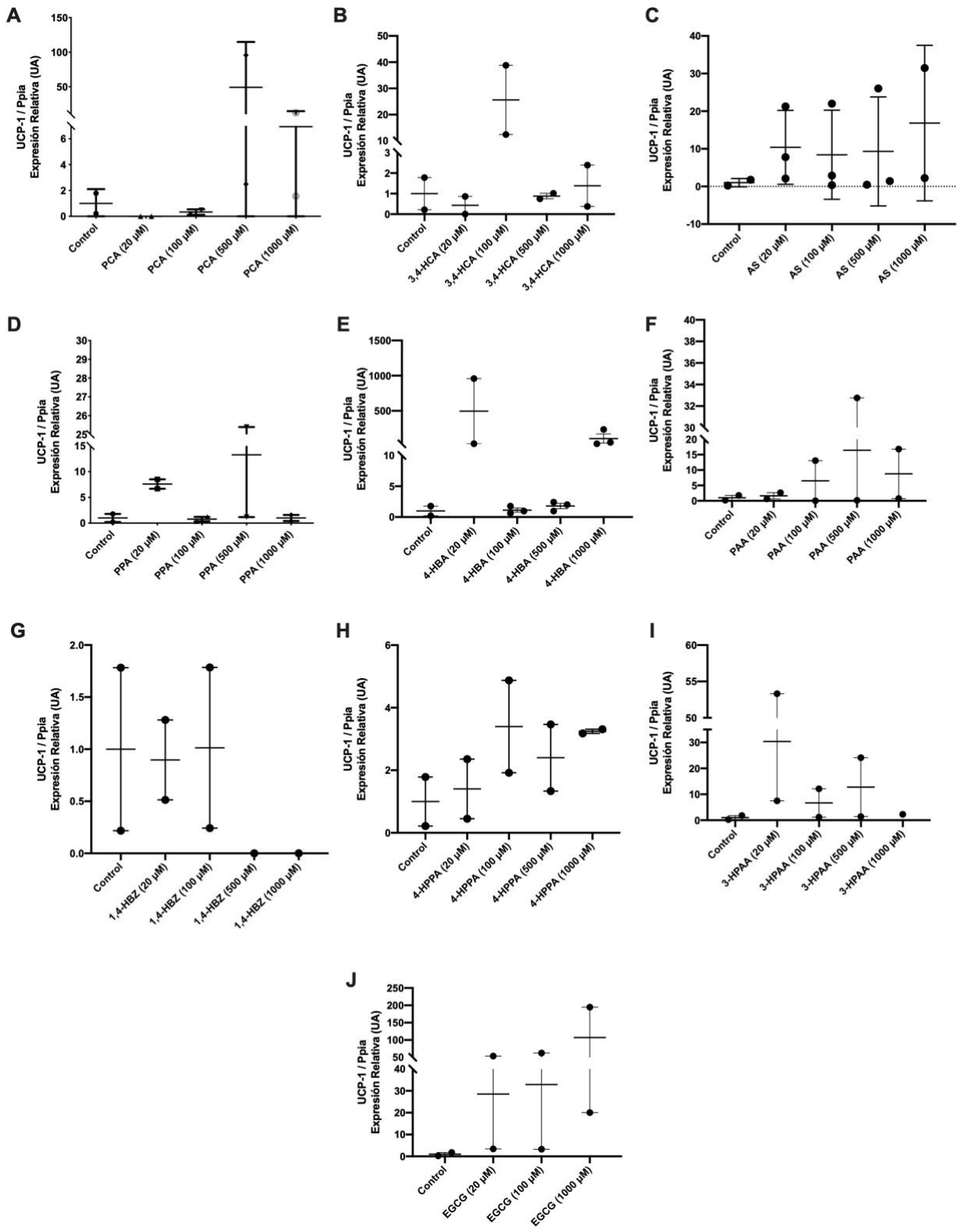


Figura 1. Expresión génica relativa de UCP-1 en adipocitos maduros provenientes de células 3T3-L1 de ratón, estimulados por 24 h con submetabolitos derivados del consumo del calafate con una concentración de 20, 100, 500 y 1000 μM por 24 h correspondientes a ácido 3,4-dihidroxibenzoico (PCA) (A), 3,4-ácido dihidroxicinámico (3,4-HCA) (B), ácido siríngico (AS) (C), ácido 3-fenilpropiónico (PPA) (D), ácido 4-hidroxibenzoico (4-HBA) (E), ácido fenilacético (PAA) (F), ácido 1,4 dihidroxibenceno (1,4-HBZ) (G), ácido 3-(4-hidroxifenil)propiónico (4-HPAA) (H), ácido 3-hidroxifenilacético (3-HPAA) (I) y epigallocatequina galato (EGCG) (J). $n=1$. Se muestra la desviación intramuestral con media y desviación estándar. UCP-1: proteína desacoplante 1. Ppia: peptidilprolil isomerasa A. UA: Unidades Arbitrarias

Entre de los submetabolitos derivados de consumo de calafate seleccionados desde el screening, la expresión génica de UCP-1 de PAA, con una concentración de 20 μM fue de $3,5 \pm 1,22$ UA, observándose una diferencia significativa con respecto al control ($p = 0,001$). De la misma forma, EGCG con una concentración de 100 μM mostró una expresión génica de $2,7 \pm 0,56$ UA ($p = 0,033$) veces más en relación con el control. Mientras tanto, EGCG (20 μM), AS (20 μM), 4-HBA (20 μM) y 3-HPAA (20 μM) mostraron un nivel de expresión génica de $2,05 \pm 0,4$ UA, $2,2 \pm 0,77$ UA, $2,35 \pm 0,92$ UA y $1,35 \pm 0,28$ UA, respectivamente, con respecto al control. Sin embargo, ninguno de estos logró una diferencia significativa con respecto al control (Figura 2).

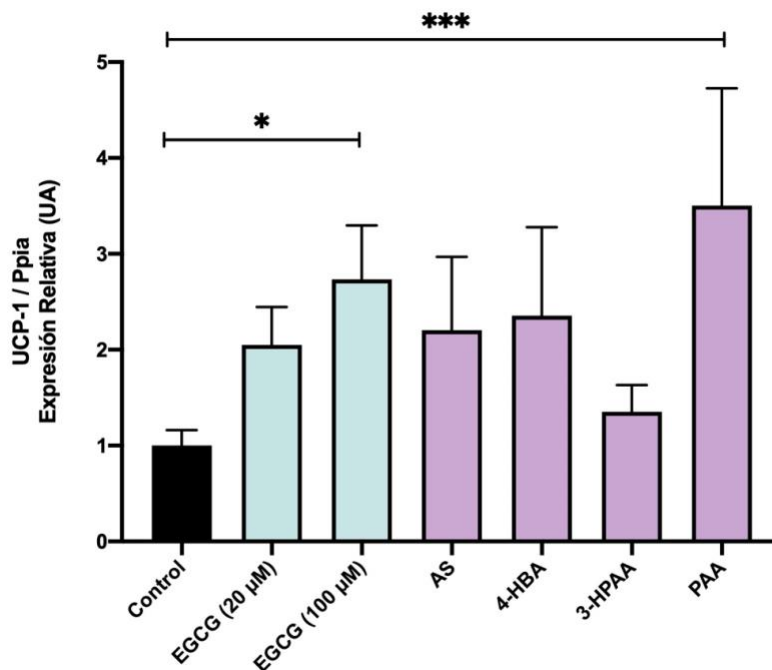


Figura 2. Expresión génica relativa de UCP-1 en adipocitos maduros provenientes de células 3T3-L1 de ratón, estimulados con 20 µM de AS, 4-HBA, 3-HPAA y PAA, y EGCG con 20 y 100 µM, todos por 24 h.

Se utilizó ANOVA de una vía con posthoc de Dunnet para analizar diferencias entre los tratamientos con respecto al control. Se consideró un nivel de significancia de $p < 0,05$. (*) $p < 0,05$; (***) $p = 0,001$. $n = 3-4$. AS: ácido siríngico, 4-HBA: ácido 4-hidroxibenzoico, PAA: ácido fenilacético, 3-HPAA: ácido 3-hidroxifenilacético, EGCG: epigallocatequin galato. UCP-1: proteína desacoplante 1. Ppia: peptidilprolil isomerasa A. UA: Unidades Arbitrarias

Con respecto a la expresión génica de PGC-1 α , el único compuesto que mostró diferencias significativas con respecto al control fue el EGCG (100 µM) con $5,99 \pm 2,62$ UA ($p = 0,001$). Mientras que en EGCG (20 µM), AS (20 µM), 4-HBA (20 µM), 3-HPAA (20 µM) y PAA (20 µM) fue posible observar un nivel de expresión génica de $1,23 \pm 0,52$ UA, $1,39 \pm 1,0$ UA, $1,16 \pm 0,68$ UA, $1,04 \pm 0,7$ UA y $0,7 \pm 0,83$ UA,

respectivamente, con respecto al control. Sin embargo, ninguno de estos logró una diferencia significativa con respecto al control (Figura 3).

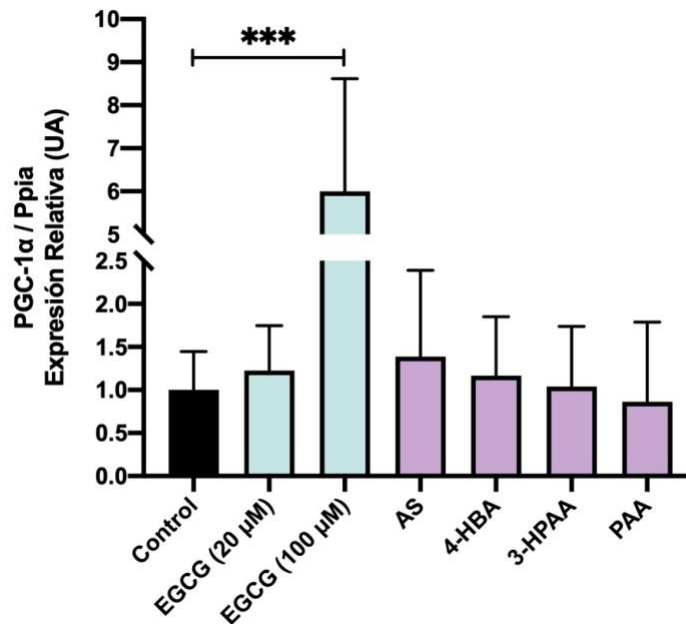


Figura 3. Expresión génica relativa del PGC-1 α en adipocitos maduros provenientes de células 3T3-L1 de ratón, estimulados con 20 μ M de AS, 4-HBA, 3-HPAA y PAA, y EGCG con 20 y 100 μ M, todos por 24 h.

Se utilizó ANOVA de una vía con posthoc de Dunnet para analizar diferencias entre los tratamientos con respecto al control. Se consideró un nivel de significancia de $p < 0,05$. (***) $p = 0,001$. $n = 3$. AS: ácido sirínico, 4-HBA: ácido 4-hidroxibenzoico, PAA: ácido fenilacético, 3-HPAA: ácido 3-hidroxifenilacético, EGCG: epigallocatequin galato. PGC-1 α : coactivador del receptor gamma 1-alfa activado por el proliferador de peroxisomas. Ppia: peptidilprolil isomerasa A. UA: Unidades Arbitrarias

Sobre la expresión génica de SIRT1, nuevamente el único compuesto que mostró diferencias significativas con respecto al control fue EGCG (100 μ M) con $2,28 \pm 0,77$

UA ($p = 0,014$). Mientras que los niveles de expresión génica de EGCG (20 μ M), AS (20 μ M), 4-HBA (20 μ M), 3-HPAA (20 μ M) y PAA (20 μ M) correspondieron a $1,23 \pm 0,07$ UA, $0,74 \pm 0,19$ UA, $0,89 \pm 0,63$ UA, $0,79 \pm 0,16$ UA y $0,78 \pm 0,36$ UA, respectivamente, con respecto al control. Sin embargo, ninguno de estos logró una diferencia significativa con respecto al control (Figura 4).

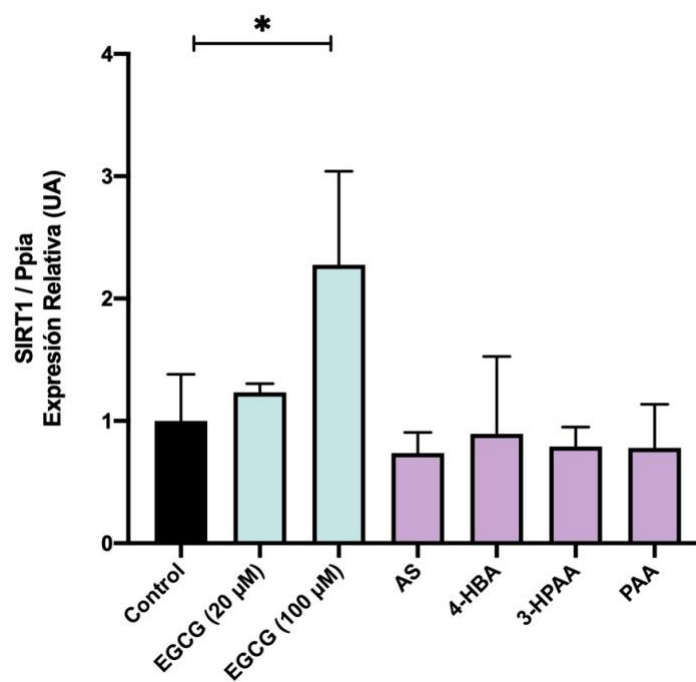


Figura 4. Expresión génica relativa de SIRT1 en adipocitos maduros provenientes de células 3T3-L1 de ratón, estimulados con 20 μ M de AS, 4-HBA, 3-HPAA y PAA, y EGCG con 20 y 100 μ M, todos por 24 h.

Se utilizó ANOVA de una vía con posthoc de Dunnet para analizar diferencias entre los tratamientos con respecto al control. Se consideró un nivel de significancia de $p < 0,05$. (*) $p < 0,05$. $n = 3$. AS: ácido sirínigico, 4-HBA: ácido 4-hidroxibenzoico, PAA: ácido fenilacético, 3-HPAA: ácido 3-hidroxifenilacético, EGCG: epigallocatequin galato. SIRT1: sirtuina 1. Ppia: peptidilprolil isomerasa A. UA: Unidades Arbitrarias

Finalmente, en la expresión génica del PRDM16, el único compuesto que mostró diferencias significativas con respecto al control fue EGCG (100 μ M) con $2,33 \pm 0,88$ UA ($p = 0,033$). Mientras que los niveles de expresión génica de PRDM16 para EGCG (20 μ M), AS (20 μ M), 4-HBA (20 μ M), 3-HPAA (20 μ M) y PAA (20 μ M) fueron de $0,25 \pm 0,14$ UA, $0,59 \pm 0,57$ UA, $1,01 \pm 0,21$ UA, $0,53 \pm 0,63$ UA y $0,42 \pm 0,35$ UA, respectivamente, con respecto al control. Sin embargo, ninguno de estos logró una diferencia significativa con respecto al control (Figura 5).

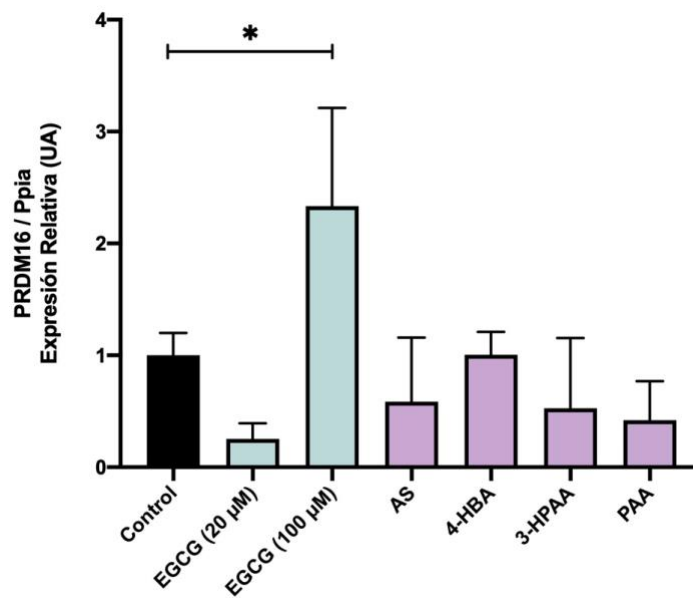


Figura 5. Expresión génica relativa de PRDM16 en adipocitos maduros provenientes de células 3T3-L1 de ratón, estimulados con 20 μ M de AS, 4-HBA, 3-HPAA y PAA, y EGCG con 20 y 100 μ M, todos por 24 h.

Se utilizó ANOVA de una vía con posthoc de Dunnet para analizar diferencias entre los tratamientos con respecto al control. Se consideró un nivel de significancia de $p < 0,05$. (*) $p < 0,05$. $n = 3$. AS: ácido siríngico, 4-HBA: ácido 4-hidroxibenzoico, PAA: ácido fenilacético, 3-HPAA: ácido 3-hidroxifenilacético, EGCG: epigallocatequina

galato. PRDM16: Dominio PR que contiene 16. Ppia: peptidilprolil isomerasa A. UA: Unidades Arbitrarias

Con respecto a la expresión proteica de UCP-1, PGC-1 α y la proteína de shock térmico de 70 kDa (Hsp70), ningún compuesto mostró una diferencia significativa con respecto al control (Figura 6).

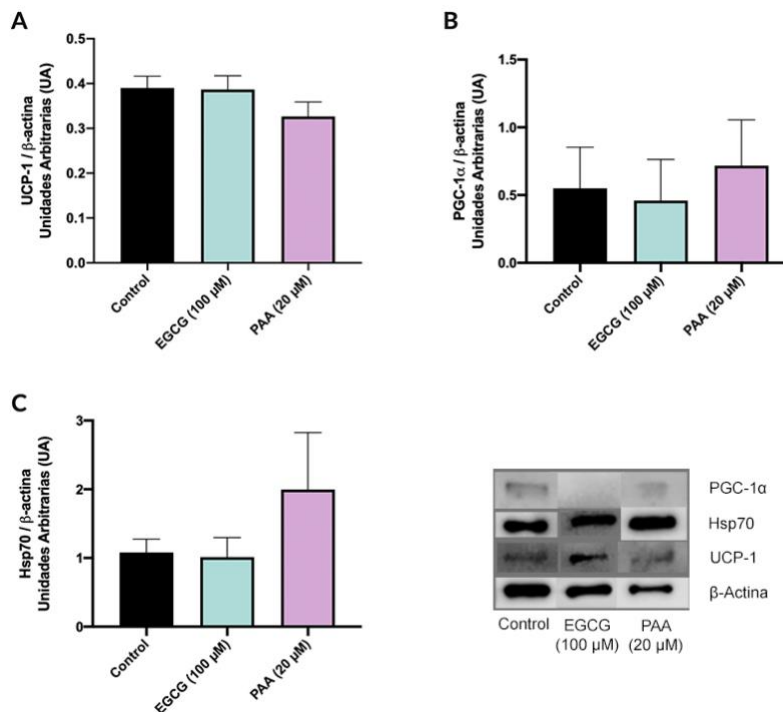


Figura 6. Expresión proteica relativa de UCP-1 (A), PGC-1 α (B) y Hsp70 (C) en adipocitos maduros provenientes de células 3T3-L1 de ratón, estimulados con 20 μ M de PAA y 100 μ M de EGCG, ambos por 24 h.

Se utilizó ANOVA de una vía con posthoc de Dunnet para analizar diferencias entre los tratamientos con respecto al control. Se consideró un nivel de significancia de $p < 0,05$. (*) $p < 0,05$. $n = 3$. PAA: ácido fenilacético, EGCG: epigallocatequin galato. UCP-1: proteína desacoplante 1. PGC-1 α : coactivador del receptor gamma 1-alfa activado por el proliferador de peroxisomas. Hsp70: proteína de shock térmico de 70 kDa. UA: Unidades Arbitrarias.

Discusión

La existencia de alimentos y/o compuestos nutricionales que logren modificar el equilibrio energético a través de procesos termogénicos en tejido adiposo blanco forma parte de un interés genuino como tratamiento contra la obesidad. En esta tesis, se ha evaluado el efecto termogénico y de pardeamiento del uso de submetabolitos provenientes de la digestión del calafate sobre adipocitos maduros.

El origen de estos submetabolitos es complejo debido a que la mayoría de los compuestos parentales se encuentra formando una matriz unida a fibra dietaria, provocando que la mayoría llegue al colon. Por lo tanto, la biodisponibilidad de estos requiere de actividad enzimática intestinal y de la microbiota del hospedero (58, 59). La capacidad de liberar los ácidos hidroxicinámicos de su conjugación sería posible a través de hidrólisis mediante la función de esterasas. Esto permitiría que sean absorbidos a través de la barrera gastrointestinal, llegando a circulación (59). Además de lo anterior, la microbiota intestinal efectuaría biotransformaciones de hidrólisis (O-desglicosilaciones, hidrólisis de ésteres), escisiones (escisión del anillo C, desmetilación) y reducciones (deshidroxilación e hidrogenación) sobre estos compuestos a nivel colónico (60).

Es posible que estos ácidos fenólicos sean percibidos como sustancias xenobióticas, lo que llevaría a que el metabolismo facilite su remoción del organismo. El metabolismo xenobiótico corresponde a un proceso multiorgánico que involucra el sistema digestivo (intestino delgado y grueso, e hígado) y tejidos periféricos (riñón o tejido adiposo) (61). La función enzimática del hígado es fundamental para el metabolismo xenobiótico, ya que transforma compuestos agregando o removiendo grupos hidroxilos y conjugándolos con otras moléculas, correspondiente a las fases I y II, respectivamente. Esto da origen a compuestos

que posean una mayor solubilidad en agua, y así, promover su excreción (62, 63). Además de lo anterior, la circulación enterohepática posee un rol importante en la mantención de la concentración de submetabolitos en el plasma (64, 65), indicando un rol en la formación de submetabolitos post-colónicos (66).

Por lo tanto, en el esquema descrito por Bustamante et. al., 2018 (34), la microbiota y la actividad enzimática hepática jugarían un rol fundamental para obtener la variedad de submetabolitos derivados del consumo de calafate. La circulación enterohepática explicaría la aparición y desaparición de submetabolitos en plasma de jerbo, asociado a las reacciones de deshidroxilación, metoxilación, β -oxidación y reducción, las cuales generarían la diversidad de moléculas presentes en circulación (Anexo 5).

Ahora bien, con respecto a la capacidad termogénica y pardeante de estas moléculas, en la literatura no existen estudios que evalúen los genes termogénicos mostrados en la presente tesis (UCP-1, PGC-1 α , SIRT1 o PRDM16) en adipocitos maduros provenientes de 3T3-L1 y estimulados con PAA. A pesar de lo anterior, existe un estudio en el cual se utilizó PAA como un inhibidor de piruvato carboxilasa (PC), cuyo resultado fue un impedimento de la síntesis de ácidos grasos en adipocitos maduros diferenciados desde células 3T3-L1 con sobreexpresión de receptor testicular 4 (TR4) (52). TR4 posee una función como regulador clave de la homeostasis energética mediante la regulación de distintos genes relacionados en el metabolismo de la glucosa y los lípidos (67). Es más, evidencia demuestra que la pérdida de TR4 en ratones dio como resultado una reducción en el almacenamiento de lípidos, tanto en hígado como en tejido adiposo blanco (68). Por lo tanto, el estudio anteriormente descrito, corresponde, hasta hoy, el único que ha utilizado el PAA en adipocitos maduros provenientes de 3T3-L1 con un fin relacionado a adiposidad.

De acuerdo con Park et. al., 2014, su investigación tenía como objetivo investigar el papel de TR4 en la síntesis de ácidos grasos en adipocitos que tenían sobreexpresión o silenciamiento del gen TR4 (52). El PAA se utilizó como inhibidor específico de PC ya que es conocido el efecto inhibitorio sobre esta enzima (69). La adición de 2,5 mM en los adipocitos maduros con sobreexpresión de TR4, al 6 día redujo significativamente los niveles de glicerol y oxaloacetato, asociado a una reducción concomitante de la actividad de PC (52). Sin embargo, PAA no afectó la expresión de genes lipogénicos como piruvato carboxilasa (PC), ácido graso sintasa (FAS), acetil-CoA carboxilasa (ACC) y fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (PEPCK-C) en los adipocitos. Esto indicaría que este compuesto reduciría la síntesis de ácidos grasos y los niveles de glicerol por inhibición de la actividad de PC, y no necesariamente estaría relacionado a la expresión de los genes enunciados (52).

Los resultados de Park et. al., 2014 son distintos a los logrados en esta tesis, ya que ésta evaluó genes termogénicos, mientras que el estudio anterior lo hizo con genes lipogénicos. Sin embargo, el efecto de PAA, tanto en esta tesis como los resultados de Park et. al., 2014 se relacionan con la adiposidad en adipocitos maduros derivados de 3T3-L1. Ahora bien, los resultados de la presente tesis corresponderían al primer reporte de cambios en los niveles de expresión génica de UCP-1 y evaluación de genes termogénicos (PGC-1 α , SIRT1 y PRDM16) con uso de PAA como tratamiento en adipocitos maduros diferenciados desde 3T3-L1.

Buscando la relación del aumento de los niveles de expresión génica de UCP-1 y la actividad de PC, se efectuó una búsqueda con respecto a los efectos asociados a la inhibición de la actividad de PC y como ello afecta en su rol en el metabolismo de la glucosa y los lípidos. Kumashiro et. al., 2013, evaluó el efecto de inhibir la PC a través de la inyección de un oligonucleótido antisentido específico (ASO) en ratas

Sprague-Dawley (SD) y Zucker Diabetic (ZDF); y ratones C57/BL6 tratados con dieta estándar y dieta alta en grasa (DAG). Como resultado obtuvo que, aquellos ratones tratados con ASO y DAG fueron protegidos del aumento de peso y logró reducir las concentraciones de ácidos grasos en plasma de las ratas control y DAG (70). Como conclusión, los autores indicaron que los roedores alimentados con DAG y tratados con ASO y que, por lo tanto, disminuyeron la expresión de PC en hígado y tejido adiposo fueron protegidos contra la esteatosis hepática y la adiposidad sin afectar la masa magra, la ingesta de alimento y sin generar cambios asociados al gasto energético (70). En consecuencia, este estudio mostró que una menor actividad de PC genera efectos sobre la adiposidad en roedores, específicamente, disminuyendo el almacenamiento de triglicéridos en hígado y tejido adiposo (70).

De acuerdo con los resultados descritos por Kumashiro et. al., 2013, estos coinciden con Park et. al., 2014, en relación con la evidencia del rol de PC con la glicerolneogénesis. Este proceso es esencial para la producción de glicerol-3-fosfato, compuesto fundamental para la esterificación y almacenamiento de ácidos grasos como triglicéridos en hígado y tejido adiposo (71). Por lo tanto, la reducción de la actividad del proceso de glicerolneogénesis podría ser el principal mecanismo que explica la reducción del almacenamiento de ácidos grasos en los roedores alimentados con dieta rica alta en grasas en el estudio de Park et. al., 2014 (52).

En búsqueda de la asociación entre PAA, la glicerolneogénesis y UCP-1, se hace necesario conocer y entender como UCP-1 logra generar el flujo de protones y, por lo tanto, el proceso de termogénesis. En la literatura se describe que la función de flujo de protones mediada por UCP-1 es dependiente de ácidos grasos. La presencia de ácidos grasos provocaría un aumento en la permeabilidad de la membrana mitocondrial interna para los protones, lo que traería como consecuencia que las mitocondrias de grasa parda produzcan calor en lugar de ATP (75). Por lo

tanto, los ácidos grasos corresponderían a un sustrato fundamental para la activación del transporte y fuga de protones (75).

Lo anterior permitiría comprender y teorizar el efecto que PAA generaría sobre la termogénesis en los adipocitos maduros asociado al aumento de los niveles de UCP-1. La presencia de PAA generaría una reducción de la actividad de PC, enzima fundamental en el proceso de glicerolneogénesis. Como ésta disminuiría su actividad, provocaría que los ácidos grasos no puedan esterificarse, manteniéndose como ácidos grasos libres en los adipocitos. Esto provocaría que ellos se encuentren disponibles libres en el citoplasma de los adipocitos para que puedan ser movilizados hacia las mitocondrias y que sean utilizados como el sustrato necesario para que la proteína UCP-1 permita generar el flujo de protones. De esta forma, las mitocondrias tendrían una mayor exigencia de actividad, llevando a un aumento en la transcripción y traducción, trayendo como consecuencia, un aumento en la termogénesis (Figura 7).

La teorización anterior podría coincidir con la potencial alza de los niveles proteicos de Hsp70 evidenciados en esta tesis. Se ha demostrado que esta proteína, en situaciones de estrés inducidas por calor, posee un rol esencial mediando el daño celular causado por estrés térmico manteniendo la integridad de las proteínas celulares y replegando las proteínas a sus estados nativos. Esto genera un efecto citoprotector eliminando la posible acumulación de agregados proteicos, y con ello, un estímulo asociado a muerte celular (76, 77, 78). Por lo tanto, la potencial alza de la expresión proteica de Hsp70 podría indicar un aumento de estrés inducido por calor asociado a PAA, sin embargo, debido a la falta de significancia estadística, esta asociación requiere de confirmación mediante nuevas mediciones experimentales.

Observando los resultados entregados por esta tesis es posible plantear la interrogante de cuál es el mecanismo de activación de termogénesis de los compuestos que provocaron un aumento significativo, de manera distinta, en los niveles de expresión de genes y proteínas termogénicas. En esta tesis, PAA sólo logró aumentar los niveles de UCP-1, sin embargo, el control positivo, específicamente EGCG 100 μ M, logró aumentar significativamente los niveles de UCP-1, PGC-1 α , SIRT1 y PRDM16. No así la expresión proteica, la cual no mostró cambios estadísticamente significativos en los niveles de expresión. Estas diferencias podrían estar relacionadas con las vías asociadas a la estimulación del pardeamiento, el tiempo de exposición y la concentración utilizada de cada compuesto.

El aumento de los niveles de UCP-1 con la estimulación de PAA y no de los otros genes termogénicos podría evidenciar una vía distinta a la descrita en por Concha et. al., 2019 (15). El efecto de las antocianinas asociado a un efecto pardeante en TAB es conocido (79), y se ha descrito su relación con la fosforilación de AMPK (80). Es más, las antocianinas pueden transformarse a ácidos fenólicos como el ácido gálico, siríngico, p-cumárico, entre otros (44), los cuales son parentales de los submetabolitos utilizados en esta tesis.

Por lo que PAA podría estimular la fosforilación de AMPK, lo que provocaría un aumento en la actividad termogénica mediante la promoción de la lipólisis intracelular mediante fosforilación de la lipasa sensible a hormona (HSL) y triglicérido adiposo lipasa (ATGL); que en conjunto con la modulación sobre la inhibición de la carnitina plamitotransferasa 1 (CPT1) por la acetil-CoA carboxilasa (ACC), llevaría como resultado un mayor transporte de ácidos grasos hacia la mitocondria, lo que finalmente generaría un aumento del sustrato necesario para UCP-1 y, por lo tanto, aumentaría la producción de calor (81). Además, una posible vía asociada a genes termogénicos tendría relación

la fosforilación de AMPK que llevaría a la activación de SIRT1, quien a su vez provocaría la desacetilación de PGC-1 α y PPAR γ , generando que ambos en conjunto con PRDM16 y c/EBP α se activen, inicien y promuevan el proceso de transcripción para UCP-1. En base a este mecanismo, PAA podría ejercer su rol sobre el receptor TRPV1, el cual genera una cascada de reacciones que activaría a proteína quinasa II dependiente de calmodulina (CaMKII), y este a su vez generaría la fosforilación de AMPK (Figura 7).

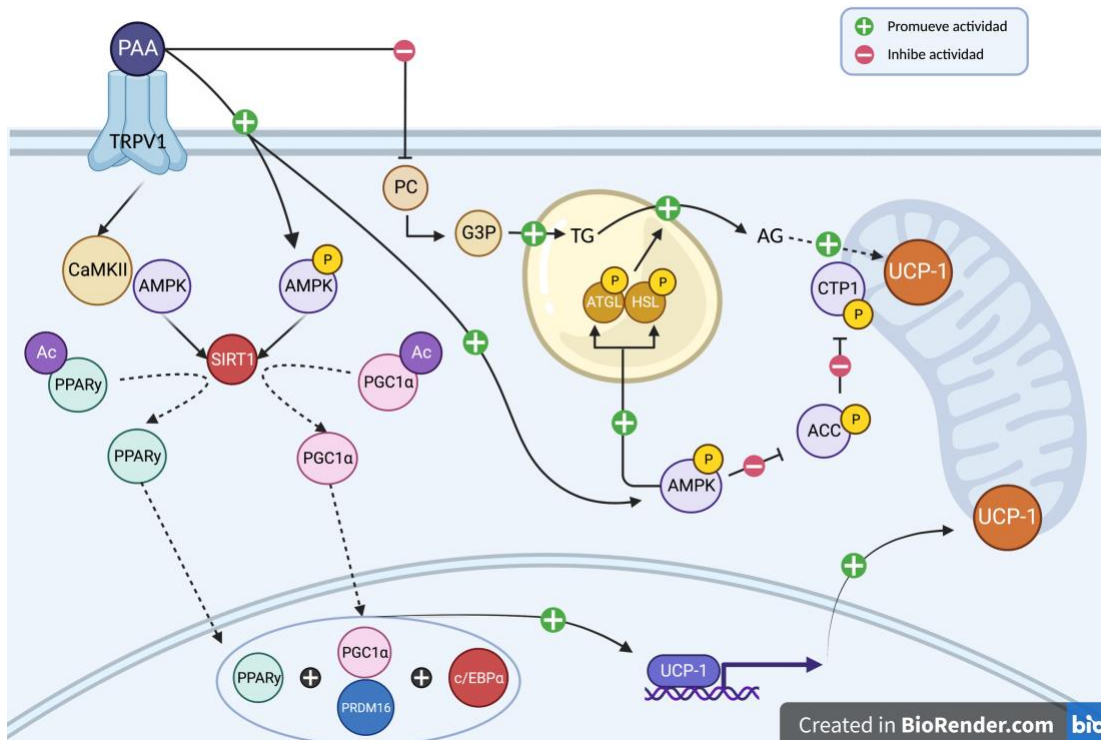


Figura 7. Mecanismos propuestos de inducción de termogénesis del ácido fenilacético en adipocitos maduros derivados de 3T3-L1.

Ac: Grupo acilo. AG: Ácidos grasos. ACC: Acetil-CoA carboxilasa. AMPK: Proteína quinasa activada por AMP. ATGL: Triglicérido adiposo lipasa. CaMKII/Ca²⁺: Proteína quinasa II dependiente de calmodulina. c/EBP α : Proteína c/EBP α (del inglés:

CCAAT/enhancer-binding protein alpha). CTP1: Carnitina plamitotransferasa 1. G3P: Glicerol-3-fosfato. HSL: lipasa sensible a hormona. PC: Piruvato carboxilasa. PGC-1 α : Coactivador 1-alfa del receptor gamma activado por proliferador de peroxisomas. PRDM16: Dominio PR que contiene 16. PPAR γ : Receptor γ activado por el proliferador de peroxisomas. SIRT1: sirtuina 1. TRPV1: Miembro 1 de la subfamilia V del canal catiónico potencial del receptor transitorio. UCP-1: Proteína desacoplante 1. TG: triglicéridos.

Con respecto al tiempo y concentración de exposición de los submetabolitos, Lee et. al., 2016, utilizó una concentración de 10 μ M de EGCG sobre adipocitos maduros derivados de 3T3-L1 por 40 h. Este estímulo evidenció un aumento de los niveles de expresión génica cercana a 2 veces más de PGC-1 α en relación al control (82). En el presente trabajo, la estimulación con una concentración 10 veces mayor de EGCG (100 μ M) y en un menor tiempo (24 h) provocó un aumento en los niveles de expresión de PGC-1 α 7,5 veces más que el control. Además de lo anterior, el tratamiento con una concentración menor de EGCG (20 μ M) mostró valores similares de niveles de expresión de PGC-1 α en relación con el control, ocurriendo algo similar con los otros submetabolitos utilizados (AS, 4-HBA, PAA y 3-HPAA), los cuales se estimularon con 20 μ M. Una revisión realizada por Wang et. al., 2014, recopiló distintos estudios realizados en modelos *in vitro*, *in vivo* y humanos. Este trabajo evidenció que los tratamientos con EGCG utilizando concentraciones entre 50 y 200 μ M, provocaban como resultado la inhibición de la acumulación de triglicéridos celulares en adipocitos de forma dependiente de la dosis y el tiempo (83). Lee et. al., 2009, mostró un aumento dosis-dependiente en los niveles de mRNA de UCP-2, estimulando adipocitos maduros derivados de 3T3-L1 con concentraciones entre 0 a 10 μ M de EGCG (84).

Por lo tanto, de acuerdo con los resultados de esta tesis y los presentados en la discusión, es posible pensar que en concentraciones menores se requeriría de un mayor tiempo de exposición del tratamiento con submetabolitos para lograr efectos sobre la acumulación de triglicéridos y el aumento de la expresión de genes y proteínas termogénicas.

Conclusiones

En este trabajo fue posible evidenciar que un tratamiento con 20 μM de ácido fenilacético (PAA) logró inducir un aumento en los niveles de expresión génica de UCP-1 en adipocitos maduros derivados de 3T3-L1 con respecto al control. El tratamiento con PAA no logró aumentar los niveles de expresión génica de PGC-1 α , SIRT1 y PRDM16, lo cual si hizo el epigallocatequin galato 100 μM (EGCG 100 μM). En relación con la expresión proteica, este trabajo no mostró diferencias significativas en los niveles de expresión de UCP-1, PGC-1 α y Hsp70 con respecto al control.

Existe evidencia previa de efectos inhibitorios del PAA sobre la síntesis de ácidos grasos en adipocitos maduros, sin embargo, este trabajo corresponde al primero que evidencia efectos sobre los niveles de expresión de genes termogénicos en adipocitos maduros tratados con PAA. Las diferencias de los perfiles de expresión de genes termogénicos entre el PAA y EGCG podría estar relacionado a que las vías de termogénesis podrían ser diferentes. Sin embargo, es importante considerar el tiempo y la concentración del tratamiento con el submetabolito, ya que esto podría afectar la transcripción y traducción de genes y proteínas termogénicas, respectivamente.

Por lo tanto, existe la necesidad de nuevos estudios que evalúen la temporalidad y concentración del tratamiento con PAA en adipocitos maduros para esclarecer si existen vías de estimulación de termogénesis diferentes. Así como también, evaluar los receptores y vías que podrían estar asociadas a la generación de la cascada de transcripción que lleva a un aumento en los niveles de UCP-1 en los adipocitos maduros tratados con PAA.

Bibliografía

1. Organización Mundial de la Salud. Obesity and overweight. 2016. [Disponible en: <https://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>]
2. Ministerio de Salud. Encuesta Nacional de Salud 2016-2017. 2017. [Disponible en: https://www.minsal.cl/wp-content/uploads/2017/11/ENS-2016-17_PRIMEROS-RESULTADOS.pdf]
3. Fontaine KR, Redden DT, Wang C, Westfall AO, Allison DB. Years of life lost due to obesity. JAMA. 2003;289(2):187-93.
4. Withrow D, Alter DA. The economic burden of obesity worldwide: a systematic review of the direct costs of obesity. Obes Rev. 2011;12(2):131-41.
5. Cuadrado C, Lenz R. Medición de la carga económica actual de la obesidad en Chile y proyección al año 2030: propuesta de un modelo de análisis validado para la realidad del país. Disponible en: <http://repositorio.conicyt.cl/bitstream/handle/10533/214537/SA14ID0176.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
6. Sharma AM, Padwal R. Obesity is a sign - over-eating is a symptom: an aetiological framework for the assessment and management of obesity. Obes Rev. 2010;11(5):362-70.
7. Hotamisligil GS. Inflammation and metabolic disorders. Nature. 2006;444(7121):860-7.
8. Matafome P, Seiça R. Function and Dysfunction of Adipose Tissue. Adv Neurobiol. 2017;19:3-31.
9. Ferrara D, Montecucco F, Dallegri F, Carbone F. Impact of different ectopic fat depots on cardiovascular and metabolic diseases. J Cell Physiol. 2019;234(12):21630-41.

10. Carobbio S, Pellegrinelli V, Vidal-Puig A. Adipose Tissue Function and Expandability as Determinants of Lipotoxicity and the Metabolic Syndrome. *Adv Exp Med Biol.* 2017;960:161-96.
11. Schoettl T, Fischer IP, Ussar S. Heterogeneity of adipose tissue in development and metabolic function. *J Exp Biol.* 2018;221(Pt Suppl 1).
12. Jensen MD. Role of body fat distribution and the metabolic complications of obesity. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008;93(11 Suppl 1):S57-63.
13. Saely CH, Geiger K, Drexel H. Brown versus white adipose tissue: a mini-review. *Gerontology.* 2012;58(1):15-23.
14. Nedergaard J, Cannon B. Brown adipose tissue as a heat-producing thermoeffector. *Handb Clin Neurol.* 2018;156:137-52.
15. Concha F, Prado G, Quezada J, Ramirez A, Bravo N, Flores C, et al. Nutritional and non-nutritional agents that stimulate white adipose tissue browning. *Rev Endocr Metab Disord.* 2019;20(2):161-71.
16. Herz CT, Kiefer FW. Adipose tissue browning in mice and humans. *J Endocrinol.* 2019;241(3):R97-R109.
17. Montanari T, Pošćić N, Colitti M. Factors involved in white-to-brown adipose tissue conversion and in thermogenesis: a review. *Obes Rev.* 2017;18(5):495-513.
18. Lo KA, Sun L. Turning WAT into BAT: a review on regulators controlling the browning of white adipocytes. *Biosci Rep.* 2013;33(5).
19. Cao W, Daniel KW, Robidoux J, Puigserver P, Medvedev AV, Bai X, et al. p38 mitogen-activated protein kinase is the central regulator of cyclic AMP-dependent transcription of the brown fat uncoupling protein 1 gene. *Mol Cell Biol.* 2004;24(7):3057-67.
20. Boutant M, Joffraud M, Kulkarni SS, García-Casarrubios E, García-Roves PM, Ratajczak J, et al. SIRT1 enhances glucose tolerance by potentiating brown adipose tissue function. *Mol Metab.* 2015;4(2):118-31.

21. Puigserver P, Wu Z, Park CW, Graves R, Wright M, Spiegelman BM. A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis. *Cell*. 1998;92(6):829-39.
22. Kajimura S, Seale P, Spiegelman BM. Transcriptional control of brown fat development. *Cell Metab*. 2010;11(4):257-62.
23. Qiang L, Wang L, Kon N, Zhao W, Lee S, Zhang Y, et al. Brown remodeling of white adipose tissue by SirT1-dependent deacetylation of Pparg. *Cell*. 2012;150(3):620-32.
24. Shimizu Y, Nikami H, Saito M. Sympathetic activation of glucose utilization in brown adipose tissue in rats. *J Biochem*. 1991;110(5):688-92.
25. Inokuma K, Ogura-Okamatsu Y, Toda C, Kimura K, Yamashita H, Saito M. Uncoupling protein 1 is necessary for norepinephrine-induced glucose utilization in brown adipose tissue. *Diabetes*. 2005;54(5):1385-91.
26. Singla RK, Dubey AK, Garg A, Sharma RK, Fiorino M, Ameen SM, et al. Natural Polyphenols: Chemical Classification, Definition of Classes, Subcategories, and Structures. *Journal of AOAC INTERNATIONAL*. 2019;102(5):1397-400.
27. Cardona F, Andrés-Lacueva C, Tulipani S, Tinahones FJ, Queipo-Ortuño MI. Benefits of polyphenols on gut microbiota and implications in human health. *J Nutr Biochem*. 2013;24(8):1415-22.
28. Silvester AJ, Aseer KR, Yun JW. Dietary polyphenols and their roles in fat browning. *J Nutr Biochem*. 2019;64:1-12.
29. Tsuda T. Dietary anthocyanin-rich plants: biochemical basis and recent progress in health benefits studies. *Mol Nutr Food Res*. 2012;56(1):159-70.
30. Seeram NP. Berry fruits: compositional elements, biochemical activities, and the impact of their intake on human health, performance, and disease. *J Agric Food Chem*. 2008;56(3):627-9.

31. Garcia-Diaz DF, Jimenez P, Reyes-Farias M, Soto-Covasich J, Costa AGV. A Review of the Potential of Chilean Native Berries in the Treatment of Obesity and its Related Features. *Plant Foods Hum Nutr.* 2019;74(3):277-86.
32. Reyes-Farias M, Vasquez K, Ovalle-Marin A, Fuentes F, Parra C, Quitral V, et al. Chilean native fruit extracts inhibit inflammation linked to the pathogenic interaction between adipocytes and macrophages. *J Med Food.* 2015;18(5):601-8.
33. Quiñones M, Miguel M, Aleixandre A. [The polyphenols, naturally occurring compounds with beneficial effects on cardiovascular disease]. *Nutr Hosp.* 2012;27(1):76-89.
34. Bustamante L, Pastene E, Duran-Sandoval D, Vergara C, Von Baer D, Mardones C. Pharmacokinetics of low molecular weight phenolic compounds in gerbil plasma after the consumption of calafate berry (*Berberis microphylla*) extract. *Food Chem.* 2018;268:347-54.
35. Reyes-Farias M, K.Fuentes, FOvalle-Marin, AParra-Ruiz, CZamora, OPino, M. TQuitral, VJimenez, PGarcia, LGarcia-Diaz, D. F. Extracts of Chilean native fruits inhibit oxidative stress, inflammation and insulin-resistance linked to the pathogenic interaction between adipocytes and macrophages. *Journal of Functional Foods: Journal of Functional Foods*; 2016.
36. Duarte L, Ramirez L, Quezada J, Poblete C, Concha F, Rivas F, et al. A *Berberis Microphylla* Extract Prevents Obesity, Modulates Inflammation and Promotes Thermogenesis in Mice Fed on a High Fat Diet. *Dietary Bioactive Components*; 2019.
37. Soto-Covasich J, Reyes-Farias M, Torres R, Vasquez K, Duarte L, Quezada J, et al. A polyphenol-rich Calafate (*Berberis microphylla*) extract rescues glucose tolerance in mice fed with cafeteria diet. *Journal of Functional Foods*; 2020.
38. Duarte L, Quezada J, Ramirez L, Vasquez K, Orellana J, Villanueva V, et al. The treatment with an extract from Calafate (*Berberis microphylla*) induces transcript and protein expression of molecules involved in thermogenesis and adipocyte

browning in adipose tissue from obese mice. *Journal of Berry Research* 2022. p. 267-77.

39. Ramirez LA, Quezada J, Duarte L, Concha F, Escobillana L, Rincon-Cervera MA, et al. The administration of an extract from *Berberis microphylla* stimulates energy expenditure, thermogenesis and mitochondrial dynamics in mice brown adipose tissue. *Food Bioscience*. 2021;41:100988.

40. Prior RL, Wu X, Gu L, Hager TJ, Hager A, Howard LR. Whole berries versus berry anthocyanins: interactions with dietary fat levels in the C57BL/6J mouse model of obesity. *J Agric Food Chem*. 2008;56(3):647-53.

41. Prior RL, Wilkes S, Rogers T, Khanal RC, Wu X, Hager TJ, et al. Dietary black raspberry anthocyanins do not alter development of obesity in mice fed an obesogenic high-fat diet. *J Agric Food Chem*. 2010;58(7):3977-83.

42. Prior RL, E Wilkes S, R Rogers T, Khanal RC, Wu X, Howard LR. Purified blueberry anthocyanins and blueberry juice alter development of obesity in mice fed an obesogenic high-fat diet. *J Agric Food Chem*. 2010;58(7):3970-6.

43. Santana-Gálvez J, Cisneros-Zevallos L, Jacobo-Velázquez DA. Chlorogenic Acid: Recent Advances on Its Dual Role as a Food Additive and a Nutraceutical against Metabolic Syndrome. *Molecules*. 2017;22(3).

44. Pojer E, Mattivi F, Johnson D, Stockley CS. The Case for Anthocyanin Consumption to Promote Human Health: A Review. *Compr Rev Food Sci Food Saf*. 2013;12(5):483-508.

45. Clifford MN. Anthocyanins – nature, occurrence and dietary burden. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2000;80(7):1063-72.

46. Shechter Y, Sakal E, Cohen R, Cohen-Chapnik N, Gertler A. Hydroxyphenyl acetate derivatives inhibit protein tyrosine kinase activity and proliferation in Nb2 rat lymphoma cells and insulin-induced lipogenesis in rat adipocytes. *Mol Cell Endocrinol*. 1991;80(1-3):183-92.

47. Roy S, Rink C, Khanna S, Phillips C, Bagchi D, Bagchi M, et al. Body weight and abdominal fat gene expression profile in response to a novel hydroxycitric acid-based dietary supplement. *Gene Expr.* 2004;11(5-6):251-62.
48. Greenwood MR, Cleary MP, Gruen R, Blase D, Stern JS, Triscari J, et al. Effect of (-)-hydroxycitrate on development of obesity in the Zucker obese rat. *Am J Physiol.* 1981;240(1):E72-8.
49. Sung YY, Kim DS, Kim SH, Kim HK. Aqueous and ethanolic extracts of welsh onion, *Allium fistulosum*, attenuate high-fat diet-induced obesity. *BMC Complement Altern Med.* 2018;18(1):105.
50. John CM, Arockiasamy S. Syringic acid (4-hydroxy-3,5-dimethoxybenzoic acid) inhibits adipogenesis and promotes lipolysis in 3T3-L1 adipocytes. *Nat Prod Res.* 2020;34(23):3432-6.
51. Ham JR, Lee HI, Choi RY, Sim MO, Seo KI, Lee MK. Anti-steatotic and anti-inflammatory roles of syringic acid in high-fat diet-induced obese mice. *Food Funct.* 2016;7(2):689-97.
52. Park SS, Kim SJ, Choi H, Chang C, Kim E. TR4 promotes fatty acid synthesis in 3T3-L1 adipocytes by activation of pyruvate carboxylase expression. *FEBS Lett.* 2014;588(21):3947-53.
53. Green H, Meuth M. An established pre-adipose cell line and its differentiation in culture. *Cell.* 1974;3(2):127-33.
54. 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):402-8.
55. Thermofisher.com. Chemiluminescence western blotting technical guide and protocols. [Disponible en: <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/BID/Application-Notes/TR0067-Chemi-Western-guide.pdf>]
56. Abcam. MTT assay protocol [Available from: <https://www.abcam.com/kits/mtt-assay-protocol>].

57. Nolan T, Hands RE, Bustin SA. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nat Protoc.* 2006;1(3):1559-82.
58. Andreasen MF, Kroon PA, Williamson G, Garcia-Conesa MT. Esterase activity able to hydrolyze dietary antioxidant hydroxycinnamates is distributed along the intestine of mammals. *J Agric Food Chem.* 2001;49(11):5679-84.
59. Andreasen MF, Kroon PA, Williamson G, Garcia-Conesa M-T. Intestinal release and uptake of phenolic antioxidant diferulic acids. *Free Radical Biology and Medicine.* 2001;31(3):304-14.
60. Espín JC, González-Sarrías A, Tomás-Barberán FA. The gut microbiota: A key factor in the therapeutic effects of (poly)phenols. *Biochem Pharmacol.* 2017;139:82-93.
61. Bento-Silva A, Koistinen VM, Mena P, Bronze MR, Hanhineva K, Sahlstrøm S, et al. Factors affecting intake, metabolism and health benefits of phenolic acids: do we understand individual variability? *Eur J Nutr.* 2020;59(4):1275-93.
62. Koistinen VM, Hanhineva K. Microbial and endogenous metabolic conversions of rye phytochemicals. *Mol Nutr Food Res.* 2017;61(7).
63. Rondini L, Peyrat-Maillard MN, Marsset-Baglieri A, Berset C. Sulfated ferulic acid is the main in vivo metabolite found after short-term ingestion of free ferulic acid in rats. *J Agric Food Chem.* 2002;50(10):3037-41.
64. Roberts MS, Magnusson BM, Burczynski FJ, Weiss M. Enterohepatic circulation: physiological, pharmacokinetic and clinical implications. *Clin Pharmacokinet.* 2002;41(10):751-90.
65. Rodriguez-Mateos A, Vauzour D, Krueger CG, Shanmuganayagam D, Reed J, Calani L, et al. Bioavailability, bioactivity and impact on health of dietary flavonoids and related compounds: an update. *Arch Toxicol.* 2014;88(10):1803-53.
66. Vetrani C, Rivellese AA, Annuzzi G, Adiels M, Borén J, Mattila I, et al. Metabolic transformations of dietary polyphenols: comparison between in vitro

colonic and hepatic models and in vivo urinary metabolites. *J Nutr Biochem.* 2016;33:111-8.

67. Choi H, Kim SJ, Park SS, Chang C, Kim E. TR4 activates FATP1 gene expression to promote lipid accumulation in 3T3-L1 adipocytes. *FEBS Lett.* 2011;585(17):2763-7.

68. Kim E, Liu NC, Yu IC, Lin HY, Lee YF, Sparks JD, et al. Metformin inhibits nuclear receptor TR4-mediated hepatic stearyl-CoA desaturase 1 gene expression with altered insulin sensitivity. *Diabetes.* 2011;60(5):1493-503.

69. Bahl JJ, Matsuda M, DeFronzo RA, Bressler R. In vitro and in vivo suppression of gluconeogenesis by inhibition of pyruvate carboxylase. *Biochem Pharmacol.* 1997;53(1):67-74.

70. Kumashiro N, Beddow SA, Vatner DF, Majumdar SK, Cantley JL, Guebre-Egziabher F, et al. Targeting pyruvate carboxylase reduces gluconeogenesis and adiposity and improves insulin resistance. *Diabetes.* 2013;62(7):2183-94.

71. Bederman IR, Foy S, Chandramouli V, Alexander JC, Previs SF. Triglyceride synthesis in epididymal adipose tissue: contribution of glucose and non-glucose carbon sources. *J Biol Chem.* 2009;284(10):6101-8.

72. Feldman D, Hirst M. Glucocorticoids and regulation of phosphoenolpyruvate carboxykinase activity in rat brown adipose tissue. *Am J Physiol.* 1978;235(2):E197-202.

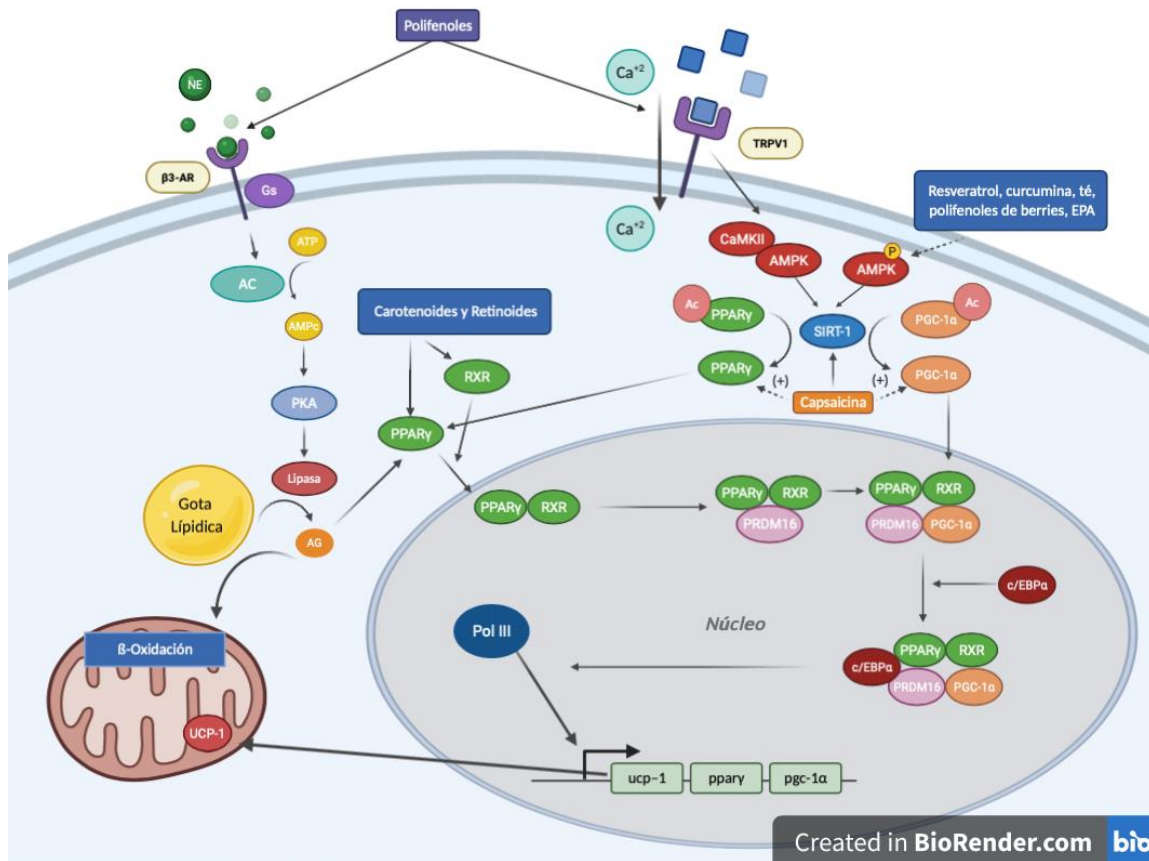
73. Beddow SA, Gattu AK, Vatner DF, Paoletta L, Alqarzaee A, Tashkandi N, et al. PEPCK1 Antisense Oligonucleotide Prevents Adiposity and Impairs Hepatic Glycogen Synthesis in High-Fat Male Fed Rats. *Endocrinology.* 2019;160(1):205-19.

74. Yang J, Kalhan SC, Hanson RW. What is the metabolic role of phosphoenolpyruvate carboxykinase? *J Biol Chem.* 2009;284(40):27025-9.

75. Bertholet AM, Kirichok Y. UCP1: A transporter for H. *Biochimie.* 2017;134:28-34.

76. Nollen EA, Brunsting JF, Roelofsen H, Weber LA, Kampinga HH. In vivo chaperone activity of heat shock protein 70 and thermotolerance. *Mol Cell Biol.* 1999;19(3):2069-79.
77. Mosser DD, Caron AW, Bourget L, Meriin AB, Sherman MY, Morimoto RI, et al. The chaperone function of hsp70 is required for protection against stress-induced apoptosis. *Mol Cell Biol.* 2000;20(19):7146-59.
78. Nava R, Zuhl MN. Heat acclimation-induced intracellular HSP70 in humans: a meta-analysis. *Cell Stress Chaperones.* 2020;25(1):35-45.
79. Kang HW, Lee SG, Otieno D, Ha K. Flavonoids, Potential Bioactive Compounds, and Non-Shivering Thermogenesis. *Nutrients.* 2018;10(9).
80. Lee YK, Lee WS, Kim GS, Park OJ. Anthocyanins are novel AMPK α 1 stimulators that suppress tumor growth by inhibiting mTOR phosphorylation. *Oncol Rep.* 2010;24(6):1471-7.
81. van Dam AD, Kooijman S, Schilperoort M, Rensen PC, Boon MR. Regulation of brown fat by AMP-activated protein kinase. *Trends Mol Med.* 2015;21(9):571-9.
82. Lee MS, Lee S, Doo M, Kim Y. Green Tea (-)-Epigallocatechin-3-Gallate Induces PGC-1 α Gene Expression in HepG2 Cells and 3T3-L1 Adipocytes. *Prev Nutr Food Sci.* 2016;21(1):62-7.
83. Wang S, Moustaid-Moussa N, Chen L, Mo H, Shastri A, Su R, et al. Novel insights of dietary polyphenols and obesity. *J Nutr Biochem.* 2014;25(1):1-18.
84. Lee MS, Kim Y. (-)-Epigallocatechin-3-gallate enhances uncoupling protein 2 gene expression in 3T3-L1 adipocytes. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2009;73(2):434-6.

Anexos

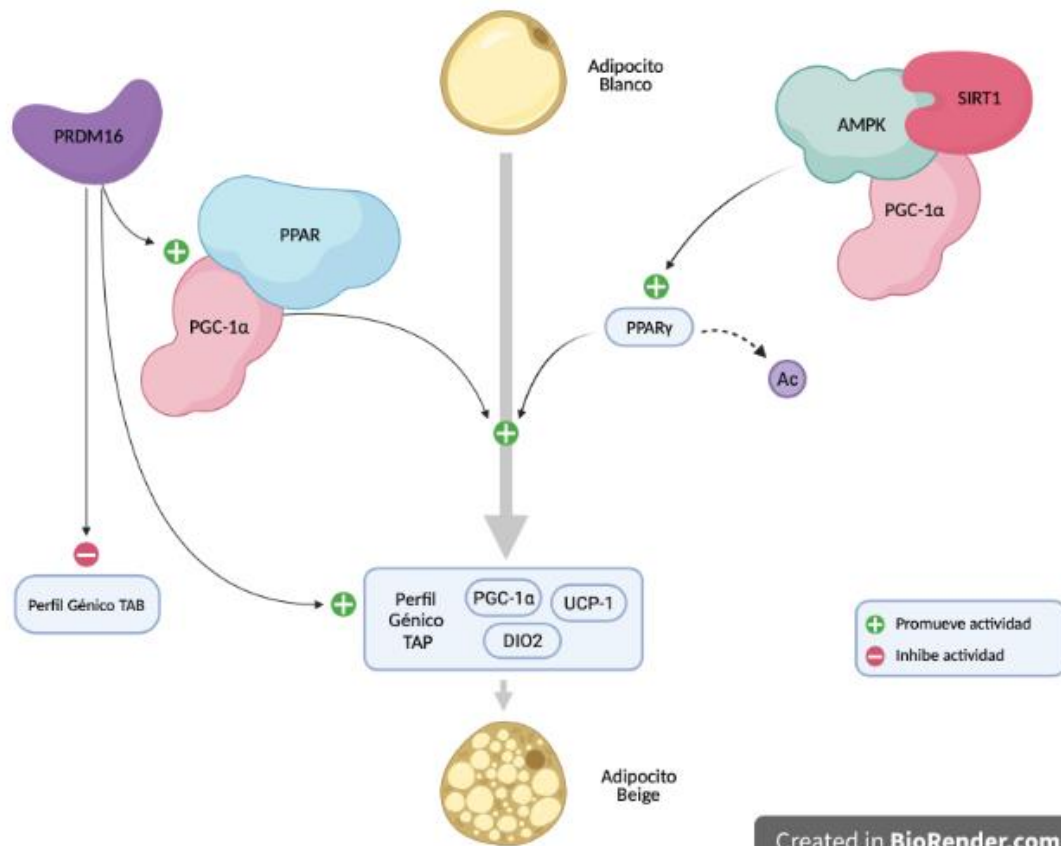


Anexo 1. Mecanismos de inducción de termogénesis en tejido adiposo pardo.

Figura modificada desde Concha et. al., 2019 (15). β3-AR: Receptor adrenérgico β3. AC: Adenilato ciclasa. Ac: Grupo acilo. AG: Ácidos grasos AMPc: Adenosín monofosfato monocíclico. AMPK: Proteína quinasa activada por AMP. ATP: Adenosín trifosfato. CaMKII/Ca²⁺: Proteína quinasa II dependiente de calmodulina. c/EBPA: Proteína CEBPA (del inglés: CCAAT/enhancer-binding protein alpha). Gs: Subunidad de proteína G. PGC-1α: Coactivador 1-alfa del receptor gamma activado por proliferador de peroxisomas. PRDM16: Dominio PR que contiene 16. PKA: Proteína quinasa A. PPARγ: Receptor y activado por el proliferador de peroxisomas.



RXR: Receptor de retinoides X. SIRT1: sirtuina 1. TRPV1: Miembro 1 de la subfamilia V del canal catiónico potencial del receptor transitorio. UCP-1: Proteína desacoplante 1.



Anexo 2. Mecanismos de pardeamiento de tejido adiposo blanco y sus principales factores reguladores.

Ac: Grupo acilo. AMPK: Proteína quinasa activada por AMP. DIO2: yodotironina deiodinasa tipo II. PGC-1 α : Coactivador 1-alfa del receptor gamma activado por proliferador de peroxisomas. PPAR γ : Receptor y activado por el proliferador de peroxisomas. PRDM16: Dominio PR que contiene 16. SIRT1: sirtuina 1. UCP-1: Proteína desacoplante 1. TAB: Tejido adiposo blanco. TAP: Tejido adiposo pardo.

Anexo 3. Concentración de los principales componentes presentes en el calafate (*Berberis microphylla*)

Tipo de Compuesto	Nombre	Concentración (µmol/g)
Antocianinas	Delfinidin-3-glucósido	79,83
	Petunidin-3-glucósido	44,78
	Malvidin-3-glucosido	29,40
Flavonoles y derivados de ácidos hidroxicinámicos	Quercetina-3-rutinósido	4,35
	Quercetina-3-ramnosido	3,31
	Ácido 5-O-cafeoilquínico	7,16
	3 o 4-trans-cafeoil-glucárico	4,42

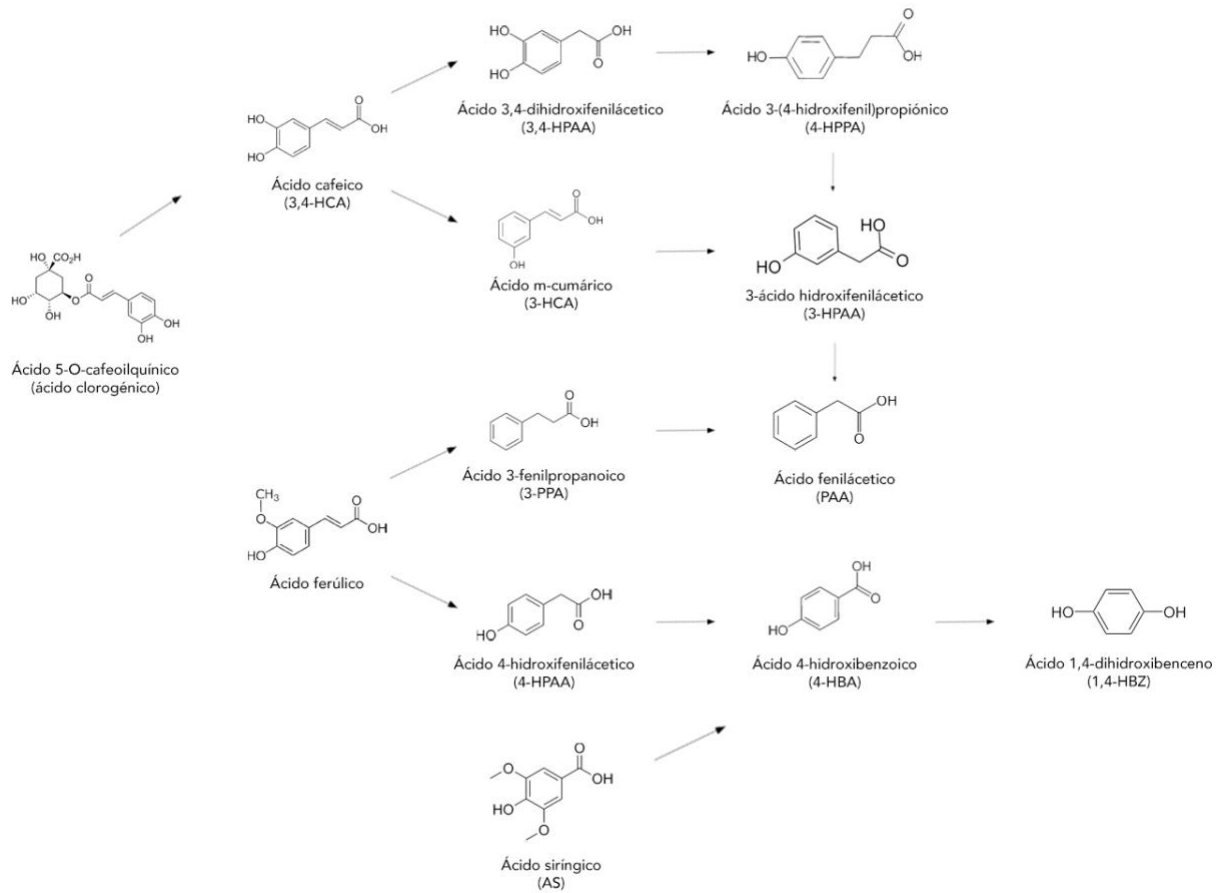
Datos obtenidos desde Bustamante et. al., 2018 (34). Concentración de cada compuesto presente del calafate (*Berberis microphylla*) expresado en µmol/g peso seco.

Anexo 4. Efectos del uso de extractos de calafate en modelos in vitro e in vivo sobre adiposidad y termogénesis.

Autor	Modelo	Resultados
Farias-Reyes, 2015 (32)	Preadipocitos (3T3-L1) y macrófagos de ratón (RAW264.7)	Previno secreción de NO inducido por LPS de macrófagos.
Farias-Reyes, 2016 (35)	Preadipocitos (3T3-L1) y macrófagos de ratón (RAW264.7)	Previno efecto de disminución de captación de glucosa en adipocitos tratados con MC + LPS.
Duarte L, 2019 (36)	Ratones C57BL6	Incrementó el TAP. Aumentó el gasto energético. Provocó expresión diferencial de genes relacionados con termogénesis y adiposidad en TAB y TAP (ej. UCP-1, PGC-1 α , PPAR α , SIRT y DIO2.)
Soto-Covasich J, 2020 (37)	Ratones C57BL6	Provocó reducción en el aumento de peso. Disminuyó el TAB epididimarios y retroperitoneales. Aumentó el TAP interescapular. Restauró fosforilación de AKT inducida por insulina. Atenuó aumento de TNF α y disminuyó niveles de F4/80.
Duarte L, 2021 (38)	Ratones C57BL6	Provocó reducción en el aumento de peso. Aumentó el gasto energético. Evidenció pardeamiento en TAB inguinal.

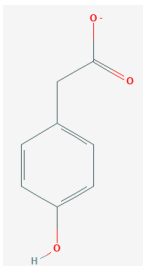
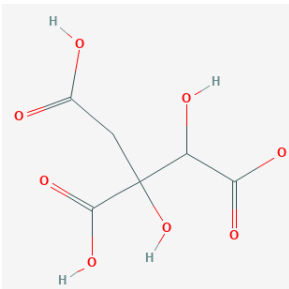
	<p>Provocó expresión diferencial de distintos genes relacionados con termogénesis y adiposidad en TAB y TAP (ej. UCP-1, PGC-1α, PPARα, SIRT1, PRDM16 y DIO2)</p>
<p>Ramirez L, 2021 (39) Ratones C57BL6</p>	<p>Disminuyó la ganancia de peso inducida por dieta alta en grasas a partir de la semana 6 de tratamiento y aumentó el gasto energético en reposo.</p> <p>En TAP, revirtió la disminución de los niveles de proteína UCP-1 generada por la dieta rica en grasas.</p> <p>Mejóro el potencial transmembrana mitocondrial.</p> <p>Aumentó la expresión de la proteína de atrofia óptica 1, proteína relacionada con la fusión mitocondrial.</p>

AKT: Gen de proteína kinasa B. DIO2: yodotironina deiodinasa tipo II. F4/80: Receptor de hormonas similares a mucina que contiene el módulo EGF (factor de crecimiento epidérmico). LPS: lipopolisacáridos. MC: medio condicionado. NO: óxido nítrico. PRDM16: proteína zinc finger de dominio PR 16. PGC-1 α : coactivador 1-alfa del receptor gamma activado por proliferador de peroxisomas. PPAR α : receptores activados por proliferadores peroxisomales. SIRT1: Sirtuina 1. TAB: tejido adiposo blanco. TAP: tejido adiposo pardo. TNF α : factor de necrosis tumoral alfa. UCP-1: proteína de desacoplante 1.



Anexo 5. Ácidos hidroxicinámicos parentales y sus submetabolitos derivados presentes en el calafate (*Berberis microphylla*) posterior a procesos asociados a actividad de la microbiota intestinal y enzimática hepática.

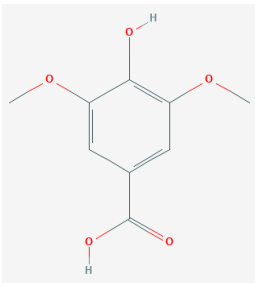
Anexo 6. Submetabolitos presentes en el calafate con efectos termogénicos y/o en adiposidad

Compuesto	Otros Nombres	Estructura	Efectos biomédicos reportados	Ref.
Acetato de hidroxifenilo	2-(4-hydroxyphenyl)acetate		Capacidad inhibitoria sobre la lipogénesis en adipocitos de epidídimo de rata.	(46)
Ácido hidroxicítrico	Hydroxycitrate Hibiscus acid 1,2-dihydroxypropane-1,2,3-tricarboxylic acid <i>Garcinia cambogia</i>		Impide aumento de peso corporal. Se asocia a menor expresión de leptina en tejido adiposo en ratas. Reducción en el tamaño de los adipocitos. En ratas obesas disminuye ingesta de alimentos y peso corporal.	(47) (48)
			Disminución de ganancia de peso, triacilglicerol, ácidos grasos libres, y aumento en el	(49)

colesterol HDL en ratones C57BL/6.

Mayor concentración de adiponectina en ratones C57BL/6.

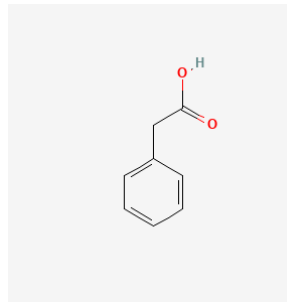
Menor área de adipocito y mayores niveles de ARNm de adiponectina y UPC-2 en ratones C57BL/6.

Ácido siringico	4-Hydroxy-3,5- dimethoxybenzoic acid 3,5-Dimethoxy-4- hydroxybenzoic acid		<p>Disminución en (50) diferenciación de preadipocitos a adipocitos maduros y supresión de acumulación de lípidos, lipogénesis y aumento de lipólisis en células 3T3-L1.</p> <p>Disminución del peso (51) corporal, y del tamaño de adipocitos en tejido adiposo epididimal en ratones C57BL/6J.</p> <p>Disminución de expresión hepática de genes que codifican</p>
----------------------------	--	---	--

para proteínas relacionadas con la lipogénesis e inflamación en ratones C57BL/6J.

Aumento de expresión de genes que codifican para proteínas relacionadas con la oxidación de lípidos en ratones C57BL/6J.

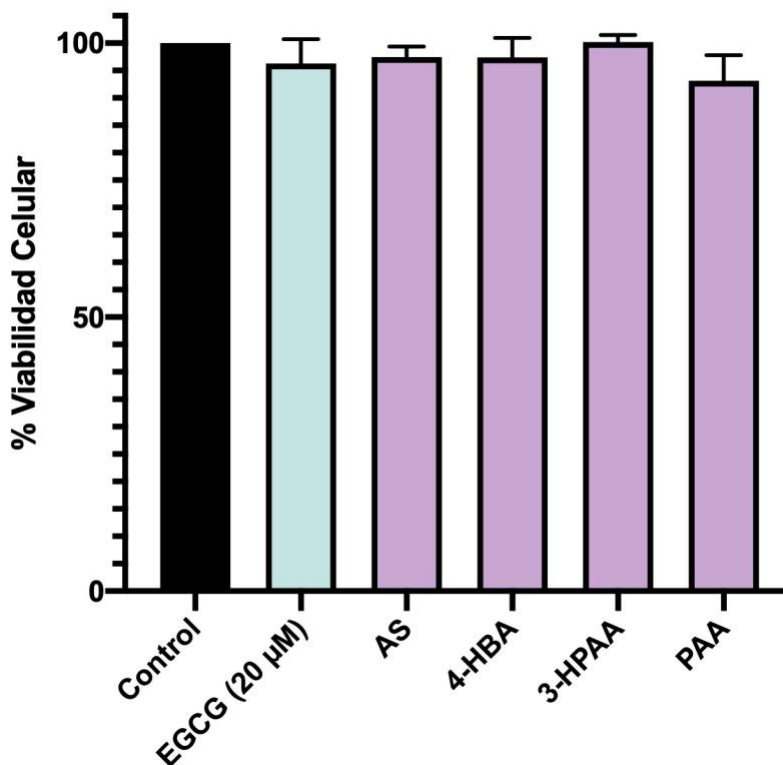
Ácido fenilacético 2-Phenylacetic acid
 Benzeneacetic acid
 Phenylethanoic acid



Disminución de los niveles de glicerol y oxaloacetato, asociado a una reducción concomitante de la actividad de PC en adipocitos maduros con sobreexpresión de TR4. (52)

No afectó la expresión de genes lipogénicos (PC, FAS, ACC y PEPCK-C) en los adipocitos.

ACC: acetil-CoA carboxilasa. ARNm: ácido ribonucleico mensajero. FAS: Ácido graso sintasa. HDL: lipoproteínas de alta densidad. PC: Piruvato carboxilasa. PEPCK-C: Fosfoenolpiruvato carboxiquinasa. Ref: Referencia Bibliográfica. TAP: tejido adiposo pardo. UPC-2: proteína desacoplante 2. TR4: Receptor testicular 4.



Anexo 7. Viabilidad celular en porcentaje (%) con respecto a células control (sin estímulo de submetabolitos).

Estímulo con submetabolitos por 24 h. Viabilidad determinada mediante ensayo MTT. Se utilizó ANOVA de una vía con posthoc de Dunnet para analizar diferencias entre los tratamientos con respecto al control. Se consideró un nivel de significancia de $p < 0,05$. AS: ácido sirínigico, 4-HBA: ácido 4-hidroxibenzoico, PAA: ácido fenilacético, 3-HPAA: ácido 3-hidroxifenilacético, EGCG: epigallocatequin galato.