



**“EFECTO PROTECTOR DE LA PLANTA *LAMPAYA MEDICINALIS* PHIL. SOBRE LA RESISTENCIA A LA INSULINA INDUCIDA POR ÁCIDO PALMÍTICO EN ADIPOCITOS DIFERENCIADOS 3T3-L1”**

**TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE MAGÍSTER EN NUTRICIÓN Y ALIMENTOS MENCIÓN NUTRICIÓN CLÍNICA**

**Por Karin S. Herrera Carrasco**

**Directoras Tesis: Dra. Mariana Cifuentes K. - Dra. Paulina Ormazábal L.**

---

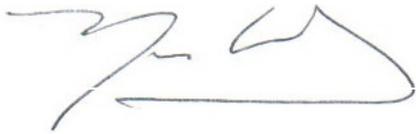
Laboratorio de Obesidad y Metabolismo Energético en Geriatría y Adultos (OMEGA)

Santiago - Chile

Octubre 2019

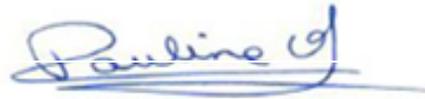
## AUTORIZACIÓN

El siguiente documento presentado como Tesis por la estudiante Karin Sibny Herrera Carrasco ha sido revisado y aprobado por ambas Directoras de Tesis para la presentación formal ante la Comisión Evaluadora que designó el Comité Académico del Magíster en Nutrición y Alimentos.



---

**Dra. Mariana Cifuentes Köster**



---

**Dra. Paulina Ormazábal Leiva**

**Octubre de 2019**

**“EFECTO PROTECTOR DE LA PLANTA *LAMPAYA MEDICINALIS* PHIL.  
SOBRE LA RESISTENCIA A LA INSULINA INDUCIDA POR ÁCIDO PALMÍTICO  
EN ADIPOCITOS DIFERENCIADOS 3T3-L1”**

**Por**

**Karin Herrera Carrasco**

**Tesis presentada como parte de los requisitos para optar al grado  
académico de Magíster en Nutrición y Alimentos Mención Nutrición Clínica**

**COMITÉ DE TESIS**

**DIRECTORES DE TESIS**

**FIRMA**

**DRA. MARIANA CIFUENTES KÖSTER**

\_\_\_\_\_

**DRA. PAULINA ORMAZÁBAL LEIVA**

\_\_\_\_\_

**COMISIÓN INFORMANTE DE TESIS**

**DR. FRANCISCO PÉREZ**

\_\_\_\_\_

**DRA. ANA MARÍA RONCO**

\_\_\_\_\_

**DR. RODRIGO TRONCOSO**

\_\_\_\_\_

**Octubre 2019**

## **FINANCIAMIENTO**

PROYECTO FONDO INVESTIGACIÓN UNIVERSIDAD DE O'HIGGINS ICSP-  
2017 - 19 DRA. PAULINA ORMAZABAL LEIVA

PROYECTO FONDECYT 1150651 DRA. MARIANA CIFUENTES KÖSTER

PROYECTO ABCVITAL 0003-2018 NTA. KARIN HERRERA CARRASCO.

*A mis padres María Soledad, Carlos y Marcelo,  
por su apoyo y amor incondicional.  
A mi hijo Benjamín, por ser mi motor de vida y  
acompañarme fielmente en todo este proceso.*

## 1.- ÍNDICE DE CONTENIDOS

1.-	ÍNDICE DE CONTENIDOS.....	6
2.-	ÍNDICE DE FIGURAS.....	8
3.-	LISTA DE ABREVIATURAS .....	9
4.-	RESUMEN .....	11
5.-	ABSTRACT .....	13
6.-	INTRODUCCIÓN .....	14
6.1	Obesidad y tejido adiposo .....	14
6.2	Insulina .....	15
6.3	PI3K / Akt.....	16
6.4	Insulino-Resistencia.....	17
6.5	Lampaya medicinalis Phil. (Verbenaceae) .....	18
7.-	HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS .....	19
7.1	Objetivo General .....	19
7.1.1	Objetivos Específicos.....	19
8.-	METODOLOGÍA.....	20
8.1	Definición del modelo experimental .....	20
8.1.1	Línea celular: 3T3-L1 .....	20
8.2	Estandarización de tratamientos .....	21
8.2.1	Estandarización del estímulo agudo con insulina: Curva de Tiempo - Respuesta. ....	21
8.2.2	Estandarización del tratamiento con ácido palmítico: Curva de Concentración – Respuesta y Tiempo - Respuesta .....	21
8.3	Tratamiento con el extracto de Lampaya:.....	22
8.4	Condiciones Experimentales.....	23
8.5	Procedimientos y Técnicas .....	23
8.5.1	Tinción con Oil Red O .....	23

8.5.2 Lisado Celular .....	24
8.5.3 Western Blot.....	24
<b>8.6 Análisis estadístico de los datos .....</b>	<b>25</b>
<b>9.- RESULTADOS .....</b>	<b>26</b>
<b>9.1 Validaciones y estandarizaciones.....</b>	<b>26</b>
9.1.1 Diferenciación adipogénica.....	26
9.1.2 Tratamientos .....	27
<b>9.2 Resultados en base a cada objetivo específico (OE):.....</b>	<b>29</b>
9.2.1 OE 1. Definir las condiciones óptimas (concentración, tiempo) para establecer el modelo de inhibición de la señalización de la insulina inducido por PA en adipocitos diferenciados 3T3-L1 evidenciado a través de la disminución en la fosforilación de Akt inducida por insulina.....	29
9.2.2 OE 2. Establecer el efecto del EHL sobre la fosforilación de Akt en condiciones basales y luego de la estimulación con insulina.....	32
9.2.3 OE 3. Evaluar la fosforilación de Akt basal y estimulada por insulina en adipocitos 3T3-L1 incubados con PA y pre-expuestos o no a EHL. ....	33
<b>10.- DISCUSIÓN .....</b>	<b>35</b>
<b>11.- CONCLUSIONES .....</b>	<b>40</b>
<b>12.- AGRADECIMIENTOS .....</b>	<b>41</b>
<b>13.- REFERENCIAS .....</b>	<b>42</b>

## 2.- ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Preadipocitos y adipocitos 3T3-L1 después de 8 días de diferenciación celular. ....	26
<b>Figura 2.</b> Efecto de insulina sobre la fosforilación de Akt en adipocitos 3T3-L1....	27
<b>Figura 3.</b> Efecto del extracto hidroalcohólico de Lampaya (EHL) sobre la viabilidad celular de adipocitos diferenciados 3T3-L1 .....	28
<b>Figura 4.</b> Fosforilación de Akt a distintos tiempos de incubación con ácido palmítico (PA) en adipocitos 3T3-L1. ....	30
<b>Figura 5.</b> Efecto concentración-respuesta de ácido palmítico sobre la fosforilación de Akt en adipocitos 3T3-L1 diferenciados.. ....	31
<b>Figura 6.</b> Efecto de EHL sobre la fosforilación de Akt en adipocitos 3T3-L1.....	32
<b>Figura 7.</b> Efecto de PA, EHL y su combinación sobre la fosforilación de Akt en adipocitos diferenciados 3T3-L1.....	34

### 3.- LISTA DE ABREVIATURAS

<b>PKB</b>	Proteína quinasa B
<b>BSA</b>	Albúmina de suero bovino
<b>BSA FFA</b>	Albúmina de suero bovino libre de ácidos grasos
<b>DMEM</b>	Medio de Eagle modificado de Dulbecco
<b>EEM</b>	Error estándar de la media
<b>EHL</b>	Extracto hidroalcohólico de Lampaya
<b>GLUT4</b>	Transportador de glucosa tipo 4
<b>IR</b>	Insulino-resistencia
<b>IRS-1</b>	Sustrato receptor de insulina 1
<b>L-PK</b>	Piruvato quinasa hepática
<b>MAPK</b>	Proteína quinasa activada por mitógenos
<b>NADH</b>	Dinucleótido de nicotinamida y adenina (reducido)
<b>NF-κB</b>	Factor nuclear de transcripción kappa B
<b>PA</b>	Ácido palmítico
<b>PBS</b>	Buffer salino fosfato
<b>PI3K</b>	Fosfatidilinositol 3 quinasa
<b>PIP2</b>	Fosfatidilinositol 4,5-bifosfato
<b>PIP3</b>	Fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato

<b>PDK1</b>	Proteína quinasa-1
<b>PDK2</b>	Proteína quinasa-2
<b>PKC</b>	Proteína quinasa C
<b>RI</b>	Receptor de insulina
<b>ROS</b>	Especies reactivas de Oxígeno
<b>Ser</b>	Serina
<b>SFB</b>	Suero fetal bovino
<b>TA</b>	Tejido adiposo
<b>TBS</b>	Solución salina tris-tamponada
<b>TBST</b>	Solución salina tris-tamponada 1% Tween 20
<b>Thr</b>	Treonina
<b>TLR</b>	Receptores tipo Toll ( <i>Toll-like receptors</i> )
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Factor de necrosis tumoral alfa
<b>Tyr</b>	Tirosina
<b>WB</b>	Western blot

#### 4.- RESUMEN

La obesidad es un importante problema de salud a nivel mundial que se asocia con un proceso inflamatorio crónico de baja intensidad. Interesantemente, existe una fuerte relación entre inflamación y disminución en la sensibilidad a la insulina en células adiposas. Tal alteración puede deberse a una menor activación por fosforilación de moléculas de la vía de señalización intracelular de esta hormona, como Ser-473-Akt. Por otra parte, se ha descrito que grasas saturadas como el ácido palmítico (PA) reducen la capacidad de las células de captar la glucosa inducida por insulina *in vitro*.

Como parte de la cultura ancestral del altiplano chileno, la planta nativa Lampaya (*Lampaya medicinalis* Phil. (*Verbenaceae*)) se emplea en infusiones para el tratamiento de enfermedades con componente inflamatorio, tales como problemas reumáticos y artritis, entre otras. Estos efectos se atribuyen a su alto contenido de flavonoides y polifenoles, cuyas actividades antioxidantes son ampliamente reconocidas. Sin embargo, son escasos los estudios científicos que avalen este conocimiento popular y la acción medicinal de la planta. En particular, se desconoce si esta planta o sus derivados poseen efectos biológicos sobre eventos metabólicos relacionados con procesos inflamatorios como la insulino-resistencia, condición ampliamente presente en la población chilena con sobrepeso y obesidad.

La presente tesis evaluó el efecto protector de un extracto hidroalcohólico de Lampaya (EHL) sobre la inhibición de la señalización de la insulina inducida por PA en adipocitos de la línea celular 3T3-L1, reconocida ampliamente como modelo para el estudio de mecanismos asociados a obesidad. Para ello se utilizaron cultivos de células 3T3-L1 diferenciadas *in vitro* a adipocitos, fueron tratados con EHL previo a la exposición a PA y posteriormente estimulados de forma aguda con insulina o vehículo. Se estudió la respuesta a la insulina evaluando fosfo-Ser-473-Akt (Western blot) en condición basal y estimulada por insulina, a partir de lisados citoplasmáticos totales.

Los resultados de esta investigación mostraron que EHL restaura la disminución en la fosforilación de Akt inducida por PA, describiendo por primera vez un efecto protector del EHL contra la inhibición de la señalización de la insulina insulino-resistencia inducida por PA en células adiposas *in vitro*.

Los hallazgos de este trabajo entregan nuevas bases científicas respecto al potencial de la planta Lampaya como estrategia fitofarmacológica y/o nutricional para la prevención y manejo de los problemas metabólicos asociados a la obesidad, como lo es la alteración de la señalización de la insulina en células adiposas.

## 5.- ABSTRACT

Obesity is an important health problem worldwide characterized by a low-grade chronic inflammation state. There is a strong relationship between inflammation and decreased insulin sensitivity in adipose cells. At a molecular level, impaired insulin sensitivity can result from reduced phosphorylation of intracellular targets of the insulin signaling pathway, such as Ser-473-Akt. On the other hand, saturated fats such as palmitic acid (PA) reduce insulin-dependent glucose uptake by cells in vitro. The use of Lampaya (*Lampaya medicinalis* Phil. (*Verbenaceae*)) infusions for the treatment of inflammatory diseases, such as rheumatic problems, arthritis and others, is part of the ancestral culture of the Andean High Plateau in Northern Chile. The biological activity of Lampaya is associated to the high content of phytochemicals such as flavonoids and polyphenols present in the plant whose antioxidant activity is widely recognized. However, scientific studies validating such traditional knowledge as well as the medicinal action of the plant are scarce. Particularly, it is unknown whether Lampaya or its constituents have biological effects on metabolic events related to inflammation such as insulin resistance, a common condition in overweight and obese population. This work evaluated the protective effect of a hydroalcoholic extract Lampaya (EHL, Spanish acronym) on the inhibition of insulin signaling induced by PA in 3T3-L1 adipocytes, a cell line widely used as model for studying mechanisms associated with the development of obesity. For this, in vitro cultures of differentiated 3T3-L1 adipocytes were used. Cells were exposed to EHL prior and along PA exposure and then acutely stimulated with insulin or vehicle. Insulin response was studied from total cytoplasmic lysates by evaluating phospho-Ser-473-Akt (Western blot) in basal and insulin-stimulated conditions. Our results showed that EHL prevented the PA-induced decrease in Akt phosphorylation, describing for the first time a protective effect of EHL against the inhibition of insulin signaling induced by PA in adipocytes. Findings from this work provide new scientific evidence regarding the potential of Lampaya as a phyto-pharmacological and/or nutritional tool in the prevention and management of metabolic conditions associated with obesity, such as impaired insulin signaling in adipose cells.

## 6.- INTRODUCCIÓN

### 6.1 *Obesidad y tejido adiposo*

La creciente prevalencia de obesidad en el mundo se ha transformado en un serio problema de salud pública (1). La obesidad es una patología multifactorial caracterizada fundamentalmente por un desbalance entre la ingesta y el gasto de energía, que se traduce en un exceso de energía y acumulación de grasa en el organismo (2). La prevalencia mundial de obesidad desde 1975 se ha triplicado, y en 2016 más de 1.900 millones de adultos tenían sobrepeso (39%), de los cuales más de 650 millones eran obesos (13%) (3). En Chile, la prevalencia de obesidad alcanza un 31,2%, según los datos de la última Encuesta Nacional de Salud 2016-2017 (4). Está ampliamente reportado que esta condición se asocia a anomalías metabólicas como el síndrome metabólico, diabetes mellitus de tipo II, resistencia a la insulina, dislipidemia y enfermedades cardiovasculares (5), por lo tanto, contribuir a la validación científica de nuevas aproximaciones preventivas y/o terapéuticas de origen natural constituye un avance importante en el manejo de dichas condiciones.

Uno de los tejidos más relevantes en el desbalance energético positivo es el adiposo, el cual se ha considerado clásicamente un reservorio de energía y grasas, dejando de lado las múltiples funciones que cumple metabólicamente. El tejido adiposo está compuesto por adipocitos, preadipocitos, células endoteliales, fibroblastos, macrófagos y leucocitos (6), siendo los adipocitos el tipo celular responsable del manejo de los triacilglicéridos. Durante el desarrollo de la obesidad, el tejido adiposo incrementa su masa, ya sea por un aumento del tamaño (hipertrofia) y/o por un incremento en el número (hiperplasia) de los adipocitos (7). Dichos eventos, sumados a otros sucesos que ocurren durante la expansión adiposa, determinarán si en esta expansión se altera funcionalidad del tejido (8). La principal función del tejido adiposo es actuar como un regulador de la homeostasis lipídica, ya que es capaz de almacenar la energía en forma de triacilglicéridos durante los periodos de exceso y movilizar ácidos grasos libres y glicerol cuando el gasto energético excede la ingesta de energía (9). Este proceso

esta finamente regulado por la acción de diferentes hormonas tales como la Insulina.

## **6.2 Insulina**

La insulina es una hormona polipeptídica de 51 aminoácidos que se sintetiza como un precursor inactivo (proinsulina) por las células beta de los islotes de Langerhans pancreáticos. La activación de la proinsulina se genera luego de la eliminación de una sección de la cadena polipeptídica y la posterior unión de los fragmentos libres mediante puentes disulfuro (10). Una vez activa, esta hormona participa no sólo en la reducción de la glicemia, sino también promueve potentemente la lipogénesis en los adipocitos y actúa como factor de crecimiento (11).

La insulina actúa en múltiples tejidos y sus efectos varían dependiendo de la funcionalidad del órgano blanco. En el tejido adiposo, la insulina es un regulador fundamental en los adipocitos: promueve la síntesis de triacilglicéridos, estimula la diferenciación de los preadipocitos, el transporte de glucosa e inhibe la lipólisis. La acción de la insulina se inicia con el acoplamiento de la hormona a su receptor transmembrana (RI), que se compone de dos subunidades  $\alpha$  y dos subunidades  $\beta$  unidas por puentes disulfuro. La insulina se une a la subunidad  $\alpha$  extracelular e induce un cambio conformacional en la subunidad  $\beta$ , gatillando su actividad intrínseca como tirosina quinasa. A continuación, el receptor se autofosforila en múltiples residuos de tirosina (Tyr). En particular, la fosforilación del residuo Tyr-960 crea un sitio de reconocimiento para el dominio de unión a fosfotirosinas de los sustratos del receptor de la insulina (IRS). Existen numerosas isoformas de IRS (IRS 1-12), sin embargo, la evidencia indica que IRS-1 está involucrada en el transporte de glucosa estimulado por insulina hacia el interior de las células, por lo que en este trabajo se hará referencia a esta isoforma (12).

La señalización río abajo del RI involucra dos vías principales: la vía de la proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK), denominada la vía mitogénica, y la ruta de fosfatidilinositol 3 quinasa (PI3K), conocida como vía metabólica (13). Este

trabajo de tesis evaluará esta última ruta, debido a que es la más relevante en el tejido adiposo en los aspectos relacionados a obesidad (vía clásica). A continuación, se entrega una breve descripción de esta vía.

### **6.3 PI3K / Akt**

PI3K es una proteína de naturaleza dimérica ubicada en la membrana plasmática, con una subunidad catalítica (p110) y otra reguladora (p85). La subunidad p85 se une a IRS-1 fosforilada en tirosina, lo que provoca que cese su actividad inhibitoria sobre p110 (14). La PI3K activa es capaz, a su vez, de fosforilar principalmente el fosfatidilinositol-4,5-bifosfato (PIP<sub>2</sub>), convirtiéndolo en fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato (PIP<sub>3</sub>). Estos fosfolípidos son segundos mensajeros que regulan la actividad de la proteína transductora de señal Akt, efector clave de PI3K y foco esencial de esta tesis. La Akt o proteína quinasa B/(PKB)) es una Serina (Ser)/Treonina (Thr) quinasa que se une con alta afinidad a fosfoinositoles de membrana. Al interactuar con estos fosfolípidos, se produce su translocación a la membrana interna, lugar donde la proteína quinasa-1 (PDK1) activa a Akt fosforilándola en Thr-308, sin embargo, su activación completa se lleva a cabo cuando la proteína quinasa-2 (PDK-2) fosforila el residuo de Ser-473 de Akt (15). La activación de Akt estimula, entre otras cosas, la translocación de vesículas intracelulares ricas en transportador dependiente de insulina tipo 4 (GLUT4) hacia la membrana plasmática, favoreciendo la captación de glucosa hacia el interior de la célula (16-18).

En síntesis, la insulina gatilla una cascada de señales que activan Akt en sus células blanco, como el adipocito, y convierten a esta proteína en un importante mediador de las acciones anabólicas de la hormona. En este sentido, la fosforilación de Akt ha sido un blanco para numerosos estudios de la acción metabólica de la insulina, la cual se ve afectada en muchos casos de obesidad, generando lo que se conoce como "resistencia a la insulina" (19).

#### **6.4 Insulino-Resistencia**

La resistencia a la insulina (IR) es un estado patológico que se caracteriza por una capacidad disminuida de la insulina para llevar a cabo sus funciones fisiológicas normales. En términos moleculares, la alteración en la sensibilidad de la insulina puede deberse a diversos mecanismos, por ejemplo, una alteración en la fosforilación de las moléculas de la cascada de señalización del RI, lo que se traduce en una deficiencia en los efectos esperados río abajo de la señal (20). La resistencia a la insulina es uno de los principales desórdenes relacionados con la obesidad, e investigaciones recientes se han centrado en el estudio de ácidos grasos saturados y sus metabolitos como mediadores relevantes en este fenómeno (21). Los ácidos grasos no esterificados, conocidos también como ácidos grasos libres, provienen del tejido adiposo como consecuencia de la lipólisis. Su exceso, tanto intra como extracelularmente, ejerce distintos efectos en el metabolismo. En el caso del TA, afectan la vía de señalización de la insulina, y a su vez, constituyen un estímulo pro-inflamatorio, dada su capacidad de estimular la producción de citoquinas, promoviendo así el estado de inflamación característico de la obesidad. Uno de los ácidos grasos más abundantes en la dieta es el ácido palmítico (PA) (30%), un ácido graso saturado de cadena larga ampliamente utilizado por la industria alimentaria. Los ácidos grasos saturados han sido asociados con la resistencia a la insulina en el tejido adiposo (22-23), existiendo amplia evidencia de los efectos nocivos del PA en la homeostasis celular (24 - 28). En estudios *in vitro* en células adiposas 3T3-L1, la exposición crónica a PA induce inhibición de la señalización de la insulina, reflejado también en la inhibición de la captación de glucosa estimulada por la hormona (29,30). Se ha descrito que PA inhibe la fosforilación estimulada por insulina en varios blancos de su vía de señalización, tales como el receptor de insulina, IRS-1, PI3K, PDK1 y Akt. Se ha observado también que el PA inhibe la translocación de GLUT4 hacia la membrana mediada por insulina y que disminuye su cantidad en la superficie celular (31). Frente a estos antecedentes se hace relevante encontrar estrategias de prevención para los efectos del PA, por lo cual se han estudiado distintas

aproximaciones, entre ellas las que involucran extractos vegetales, que pudieran contrarrestar estos efectos.

### **6.5 *Lampaya medicinalis* Phil. (Verbenaceae)**

Desde tiempos ancestrales, la población se ha valido del uso de plantas medicinales para el tratamiento y cura de enfermedades, por lo que el interés y necesidad de investigar científicamente sus propiedades benéficas ha ido en aumento en los últimos años. En este contexto, poblaciones del altiplano del norte chileno han empleado la popular planta nativa *Lampaya* (*Lampaya medicinalis* Phil. (Verbenaceae)). Esta especie, es un pequeño arbusto con una altura de 80 - 100 cm que crece en la "puna atacameña" del norte de Chile; a la que se le ha asociado propiedades antiinflamatorias, antioxidantes y anticancerígenas, entre otras (32). Dichas actividades benéficas podrían ser resultado de la elevada presencia de compuestos fenólicos y flavonoides que están presentes en extractos hidroalcohólicos de *Lampaya* (EHL), y que muestran, a partir de ensayos químicos, actividad antioxidante y poder reductor (33). Estudios *in vivo*, han reportado que la administración oral del EHL en dosis altas (3000 mg/ Kg peso corporal) no es tóxica en ratas, además se ha descrito que su administración en dosis bajas muestra un efecto antiinflamatorio en edema de extremidades inducido por carragenina (32).

De acuerdo a nuestro conocimiento, no existen estudios acerca de un posible efecto benéfico del EHL sobre condiciones que se asocian a un ambiente inflamatorio, como lo es la insulino-resistencia asociada a la obesidad, ni de los mecanismos moleculares que lo subyacen. En particular, se desconoce si el EHL revierte la inhibición de la señalización de la insulina inducida por PA en células adiposas. Por tanto, y en base a los antecedentes antes mencionados, este trabajo evaluó el efecto protector del EHL sobre la inhibición de la señalización de la insulina inducida por PA en la línea celular adiposa 3T3-L1.

## 7.- HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS

A la luz de la actual epidemia de obesidad en gran parte del mundo, el reto es encontrar nuevas alternativas terapéuticas naturales que ayuden a contrarrestar la insulino-resistencia del adipocito asociada a esta condición. La presente tesis se centra en estudiar el efecto del EHL sobre la señalización de insulina, específicamente sobre la fosforilación de Akt.

Por lo tanto, dentro del contexto del marco teórico de este proyecto, la **hipótesis** de este trabajo es que “**La planta *Lampaya medicinalis* Phil. previene la disminución en la fosforilación de Akt inducida por PA en adipocitos diferenciados 3T3-L1**”.

### 7.1 *Objetivo General*

- Evaluar el efecto protector del EHL sobre la inhibición de la señalización de la insulina (fosforilación de Akt) inducida por PA en adipocitos diferenciados de la línea celular 3T3-L1

#### 7.1.1 **Objetivos Específicos**

- Definir las condiciones óptimas (concentración, tiempo) para establecer el modelo de inhibición de la señalización de la insulina inducido por PA en adipocitos diferenciados 3T3-L1 evidenciado a través de la fosforilación de Akt.
- Establecer el efecto del EHL sobre la fosforilación de Akt en condiciones basales y luego de la estimulación con insulina.
- Evaluar la fosforilación de Akt basal y estimulada por insulina en adipocitos 3T3-L1 incubados con PA y pre-expuestos o no a EHL.

## 8.- METODOLOGÍA

En este proyecto se evaluó el efecto de un extracto hidroalcohólico de Lampaya frente a la inhibición de la señalización de la insulina inducida por PA. Este estudio contempló un diseño de investigación de tipo experimental, teniendo como variable independiente el tratamiento con EHL y como variable dependiente la fosforilación de Akt.

### 8.1 *Definición del modelo experimental*

#### 8.1.1 **Línea celular: 3T3-L1**

Se utilizó la línea celular 3T3-L1 (ATCC<sup>®</sup> CL-173<sup>™</sup>) que corresponde a una línea celular derivada de células (3T3) de ratón, ampliamente utilizada como modelo para la investigación del tejido adiposo. Las células 3T3-L1 tienen una morfología similar a los fibroblastos, y en condiciones apropiadas, se pueden diferenciar hacia un fenotipo similar al del adipocito (33,34).

##### 8.1.1.1 **Cultivo celular**

Las células se mantuvieron en medio de cultivo, que corresponde a Medio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) alto en glucosa (4,5 g/l) (Gibco), suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10% (Biological Industries), Penicilina 50 U/mL (Sigma-Aldrich) y Estreptomina 100 µg/mL (Sigma-Aldrich). Los cultivos se incubaron en atmósfera controlada con 5% CO<sub>2</sub> a 37°C. Para los experimentos se utilizaron placas de 6 o 12 pocillos sembradas a una densidad de 20.000 células/cm<sup>2</sup>. Los medios de cultivo fueron cambiados día por medio.

##### 8.1.1.2 **Diferenciación celular**

Cuando los fibroblastos 3T3-L1 (preadipocitos) alcanzaron confluencia fueron diferenciados incubando las células en medio de cultivo de crecimiento suplementado con factores adipogénicos (Dexametasona 1 µM (Sigma), Isobutilmetilxantina 0,5 mM (Calbiochem®) e Insulina recombinante humana 10

µg/ml (Insuman®)). Luego de 48 horas de incubación con dicho medio, las células se lavaron con buffer salino fosfato (PBS, por sus siglas en inglés) (Biological Industries) y fueron incubadas por tres días con medio rico en insulina (medio de crecimiento suplementado con Insulina). Transcurrido este periodo, las células se lavaron con PBS y se agregó medio de cultivo DMEM 10% SFB, suplementado con antibióticos por 1 a 3 días hasta observar al microscopio células ricas en gotas lipídicas (fenotipo de adipocito).

## **8.2 Estandarización de tratamientos**

### **8.2.1 Estandarización del estímulo agudo con insulina: Curva de Tiempo - Respuesta.**

Este experimento de estandarización se realizó para determinar el tiempo de estimulación con insulina que lograra generar un mayor incremento de la fosforilación de Akt en células 3T3-L1 diferenciadas a adipocitos. Previo a la estimulación con insulina, se reemplazó el medio de cultivo por un medio de privación (sin SFB). Luego de 22 horas, se realizó una estimulación con Insulina 100 nM por 0, 5, 10, 15 y 20 minutos. Se detuvo la estimulación retirando el medio rápidamente para luego agregar PBS frío. A continuación, se realizaron lisados citoplasmáticos totales y se evaluó la fosforilación de Akt mediante Western blot (WB).

### **8.2.2 Estandarización del tratamiento con ácido palmítico: Curva de Concentración – Respuesta y Tiempo - Respuesta**

Una vez establecida la diferenciación adipogénica, se realizó el tratamiento con PA. Se utilizó un rango de concentraciones y tiempos de exposición descritos en la literatura para observar la inhibición de la fosforilación de Akt inducida por insulina y se evaluó dicha fosforilación mediante WB.

Se escogió el tiempo y la concentración de PA que lograron una disminución de al menos un 50% en la capacidad de respuesta a la insulina (observado como el incremento en la fosforilación Akt estimulado por la hormona).

En breve, adipocitos diferenciados fueron privados por 6 horas de SFB, para luego incubarlos en distintos tiempos (12 - 16 - 24 horas) y a distintas concentraciones con PA (0,12 - 0,24 - 0,45 - 0,65 - 0,83 mM). Las concentraciones del ácido graso se prepararon diluyendo en el medio de cultivo una solución concentrada de PA (5 mM) conjugado en 10% de albúmina de suero bovino libre de ácidos grasos (BSA FFA por sus siglas en inglés) (Sigma). La condición control para estos tratamientos corresponde al vehículo, es decir, BSA FFA agregado al medio de cultivo. Para las curvas de concentración y tiempo de exposición a PA, se empleó como condición control BSA FFA en los volúmenes equivalentes a la mayor y menor concentración del ácido graso y por el menor y mayor tiempo de la curva, respectivamente. Para todas las condiciones se destinó una población de células mantenidas en condición basal, mientras que otra fracción fue estimulada agudamente con insulina (100 nM), por el tiempo que fue definido en el experimento de estandarización (descrito en la sección 7.2.1). Se detuvo la estimulación con PBS frío y a continuación se realizaron los lisados celulares.

### **8.3 Tratamiento con el extracto de Lampaya:**

#### **8.3.1.1 Obtención del extracto**

Se utilizaron las hojas y partes aéreas de *Lampaya medicinalis* Phil. recolectadas en la localidad de Socaire, ubicada en la segunda Región de Antofagasta, Chile. Las hojas se secaron al aire para luego realizarse la extracción con etanol : agua (1:1), durante una semana a temperatura ambiente. El extracto de etanol : agua se filtró, evaporó y liofilizó para obtener una masa de extracto color verde oscuro (EHL) (33). El extracto seco fue sellado en una botella protegida de la luz y almacenado a -20°C. Los extractos fueron proporcionados por los doctores Glauco Morales y Adrián Paredes de la Universidad de Antofagasta.

### **8.3.1.2 Viabilidad celular**

Para determinar la mayor concentración de extracto que no afectara la viabilidad de los adipocitos 3T3-L1, las células se incubaron a distintas concentraciones del EHL (0,01 - 0,1 - 1 - 10 µg/ml). El tiempo se determinó en base al resultado de la curva Tiempo- Respuesta de PA (punto 7.2.2) al cual se le adicionaron 2 horas, correspondientes al pre-tratamiento con el EHL. Posteriormente se evaluó la viabilidad celular en cámara de Neubauer por exclusión de azul de tripan.

## **8.4 Condiciones Experimentales**

Se expuso los cultivos de células 3T3-L1 diferenciadas a adipocitos a EHL en la concentración anteriormente determinada (sección 7.3.1.2), 2 horas previo y durante la exposición a PA, utilizando las concentraciones definidas previamente (sección 7.2.2). Así, las condiciones experimentales fueron las siguientes: a) Control (no-tratado), b) EHL, c) PA y d) EHL + PA. Concluidos los tratamientos, se realizó la estimulación aguda con insulina según el tiempo obtenido desde el experimento de estandarización con dicha hormona (punto 7.2.1) y se evaluó la fosforilación de Akt en lisados citoplasmáticos totales por WB.

## **8.5 Procedimientos y Técnicas**

### **8.5.1 Tinción con Oil Red O**

Para la tinción de las gotas de lípidos, se retiró el medio de cada pocillo, se lavó con PBS y se fijó las células en formaldehído al 10% durante 20 minutos a temperatura ambiente. Luego de dos lavados con PBS, los pocillos se secaron completamente y se agregó solución de Oil Red O (Sigma) al 60% en agua destilada, por una hora a temperatura ambiente, para luego lavar 3 veces con PBS. Posteriormente se agregó hematoxilina al 100% por 10 minutos a 37°C. Se observaron las gotas de lípidos utilizando un microscopio invertido (MOTIC AE 2000), conectado a una cámara digital (Olympus DP71).

### 8.5.2 Lisado Celular

Una vez concluidos los tratamientos, se realizó la lisis celular en hielo utilizando buffer de lisis NP-40 (Tris 10 mM, NaCl 150 mM, Nonidet P40 0.01%, pH 8.0, Glicerol 10%) suplementado con Cóctel inhibidor de proteasa 1,5  $\mu$ M Complete® (Roche), Pepstatina 2  $\mu$ g/mL, Ortovanadato de Sodio 2 mM, NaF 50 mM). La recolección de las células se realizó con rastrillo y el contenido se transfirió a tubos Eppendorf. Se separó la fracción insoluble por centrifugación a 12.000 g por 15 minutos a 4°C. Se traspasó la fracción soluble (sobrenadante) a un nuevo tubo y se mantuvo a -80°C hasta su análisis. La concentración de proteína del lisado se determinó utilizando el kit de ensayo de proteínas BCA Pierce™ (Rockford IL) siguiendo las instrucciones del fabricante.

### 8.5.3 Western Blot

Como se mencionó anteriormente, se evaluó la fosforilación de Akt en los lisados celulares mediante inmunodetección por WB. Se sometió cantidades equivalentes de proteína a electroforesis en buffer de corrida en geles de poliacrilamida al 10% en condiciones denaturantes, para ser luego transferidas a una membrana de nitrocelulosa en buffer de transferencia 1X (Tris 24 mM, Glicina 194 mM, Metanol 20%). La inmuno-reacción se realizó mediante la incubación de las membranas, previamente bloqueadas en BSA 5%, utilizando un anticuerpo primario fabricado en conejo que reconoce la forma fosforilada de Akt (anti-fosfo-Akt ser473, Cell Signaling 9271) o Akt total (Cell Signaling 9272). La detección de los complejos inmunes se realizó a través de la incubación con anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa, seguido de una incubación con el sustrato enzimático ECL (SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate, Pierce Biotechnology Inc., Rockford, IL) y la obtención de las señales se realizó con el equipo C-DiGit™ (LI-COR®, USA). A partir de las imágenes digitalizadas, se cuantificó la densidad de las bandas mediante el programa Image J (National Institutes of Health, USA).

## **8.6 Análisis estadístico de los datos**

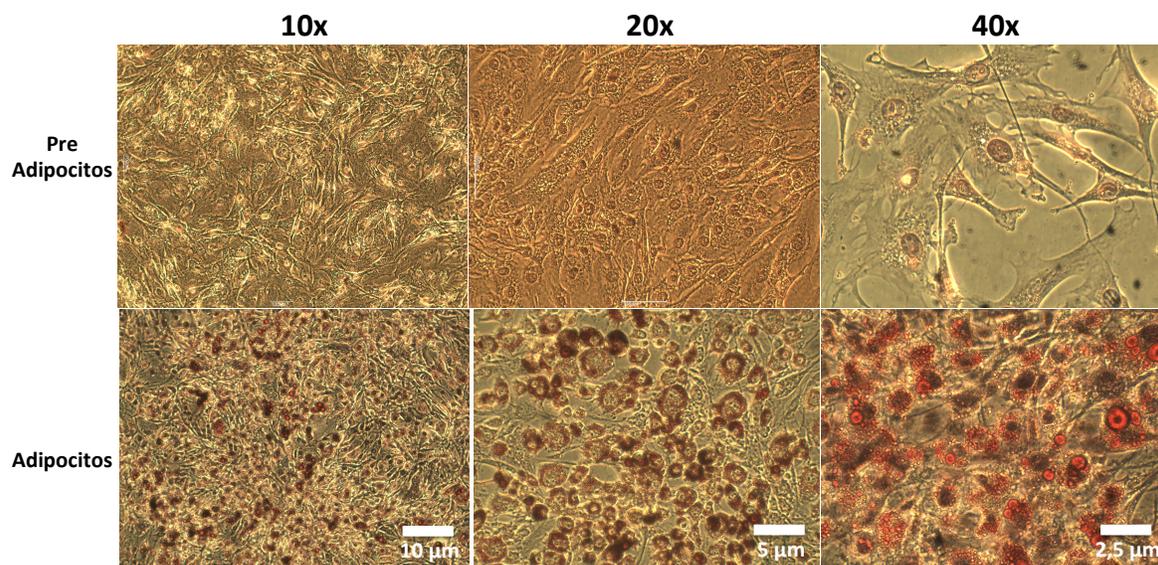
Los resultados se expresan como promedio  $\pm$  desviación estándar (DS). Para el análisis estadístico se utilizó el programa Graph Pad Prism 4.0. Se recurrió al Test no paramétrico de Friedman, seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Dunn y se consideró un  $p < 0,05$  como criterio de significancia. Se realizaron al menos cuatro experimentos en forma independiente y en duplicado.

## 9.- RESULTADOS

### 9.1 Validaciones y estandarizaciones

#### 9.1.1 Diferenciación adipogénica

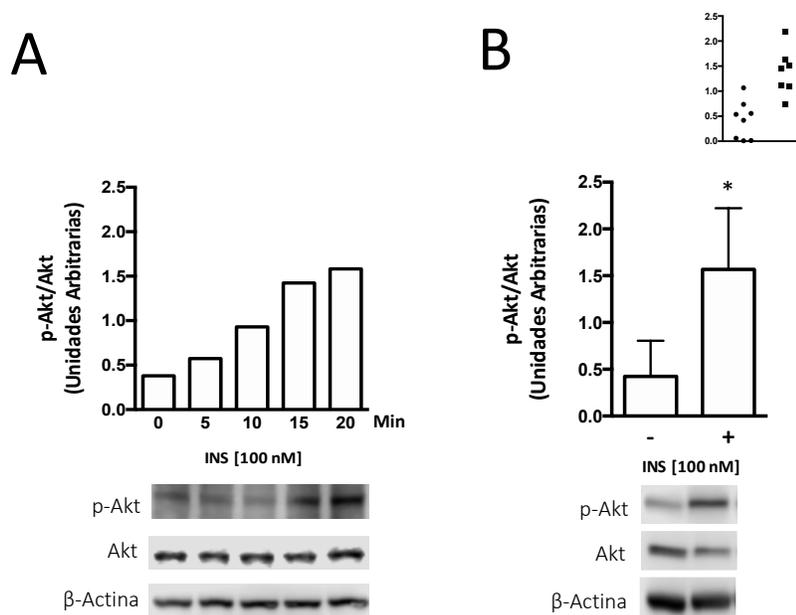
Se validó la diferenciación de los preadipocitos 3T3-L1 luego de 8 días de exposición al protocolo de diferenciación. Esta fue evaluada morfológicamente, constatándose el paso de una forma alargada, tipo fibroblasto, hacia una redondeada, tipo adipocito, así como a través de la observación de la presencia de gotas de lípidos citoplásmicas.



**Figura 1. Preadipocitos y adipocitos 3T3-L1 después de 8 días de diferenciación celular.** Imágenes representativas de la diferenciación de adipocitos 3T3-L1 diferenciados según las condiciones detalladas en el texto, luego fueron sometidas a la tinción Oil Red O y observadas mediante microscopio invertido en tres aumentos (10x, 20x y 40x / barra = 10 – 5 – 2,5 µm respectivamente).

### 9.1.2 Tratamientos

Se realizó una estandarización para determinar el tiempo óptimo de estimulación con insulina que genera un mayor incremento de la fosforilación de Akt (p-Akt). Para ello, se estimuló a los cultivos de adipocitos con insulina (100 nM) por 0, 5, 10, 15 y 20 minutos (n = 1). Los lisados celulares se analizaron mediante WB para determinar Akt fosforilada (p-Akt) y total. Se observó una mayor fosforilación de Akt luego de 15 minutos de incubación con insulina (Figura 2A), sin un cambio importante a los 20 minutos, por lo que se escogió 15 minutos como tiempo de estimulación para los experimentos de este estudio.

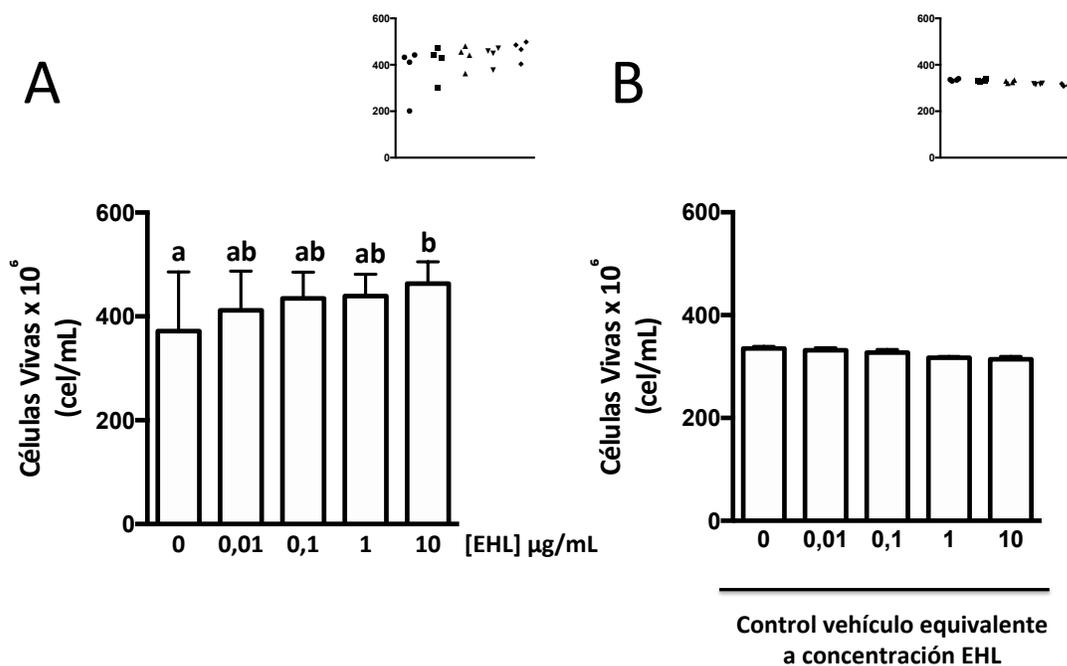


**Figura 2. Efecto de insulina sobre la fosforilación de Akt en adipocitos 3T3-L1.** El contenido de p-Akt relativo a Akt total se evaluó mediante WB en lisados citoplasmáticos totales. **(A)** Efecto de insulina (100 nM) a distintos tiempos de estimulación (0, 5, 10, 15, 20 min) sobre el contenido de Akt fosforilado en relación a Akt total en adipocitos 3T3-L1 (n=1). **(B)** Efecto de insulina (100 nM, 15 min) sobre la fosforilación de Akt en adipocitos 3T3-L1 (n=8). El inserto muestra los valores individuales para cada experimento. En la parte inferior del recuadro se muestran blots representativos para cada experimento. \*p < 0,05 versus control (sin insulina). Prueba de Wilcoxon.

Al evaluar en un mayor número de muestras el efecto de la estimulación por 15 minutos con insulina sobre p-Akt (Figura 2.B) en nuestro modelo experimental, se confirmó que la hormona induce un incremento de Akt fosforilado respecto a la

condición basal ( $p = 0,016$ ). Este resultado indica que insulina activa Akt, en concordancia con la bien reportada activación de la vía PI3K/Akt por efecto de dicha hormona (Whiteman *et al.*, 2002).

Como estandarización del trabajo con el EHL, se evaluó la viabilidad de los adipocitos tras ser expuestos a distintas concentraciones del extracto y de su vehículo. Para esto, se expuso los adipocitos a 0 - 0,01 - 0,1 - 1 y 10  $\mu\text{g/mL}$  de EHL por 18 horas. De igual forma, los adipocitos fueron tratados con el equivalente del vehículo (Dimetilsulfóxido DMSO) según las concentraciones 0,01 - 0,1 - 1 y 10  $\mu\text{g/mL}$  del extracto por 18 horas. La viabilidad celular se evaluó por exclusión de azul de tripán y recuento celular en cámara de Neubauer.



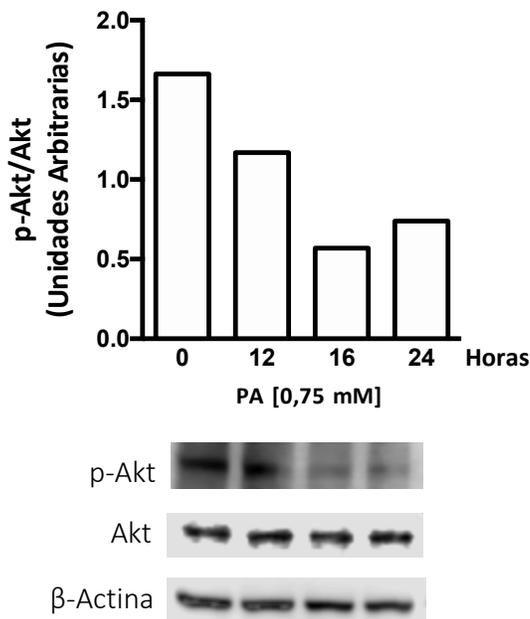
**Figura 3. Efecto del extracto hidroalcohólico de Lampaya (EHL) sobre la viabilidad celular de adipocitos diferenciados 3T3-L1.** Los adipocitos se trataron con diferentes concentraciones de EHL (0,01 - 0,1 - 1 - 10  $\mu\text{g/mL}$ ) (A) o con el equivalente correspondiente de vehículo (DMSO) (B) durante 18 horas. Posteriormente, se evaluó la viabilidad celular por exclusión de azul de tripán a través de recuento en cámara de Neubauer. Las barras representan media  $\pm$  DS ( $n = 4$  experimentos independientes). Los insertos muestran los valores individuales para cada experimento. Las letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas entre las condiciones ( $p < 0,05$ ), Prueba de Friedman, seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Dunn.

Como se muestra en la Figura 3.A, se observó que la exposición al extracto en una concentración de 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  incrementa la viabilidad de las células ( $p = 0,002$ ) en relación a la condición sin extracto. Por su parte, en la Figura 3.B se observa que el vehículo del extracto no afecta la viabilidad celular respecto al su control.

## **9.2 Resultados en base a cada objetivo específico (OE):**

### **9.2.1 OE 1. Definir las condiciones óptimas (concentración, tiempo) para establecer el modelo de inhibición de la señalización de la insulina inducido por PA en adipocitos diferenciados 3T3-L1 evidenciado a través de la disminución en la fosforilación de Akt inducida por insulina.**

Para definir el tiempo de incubación con PA tras el cual se observa un menor incremento de p-Akt estimulado por insulina versus un control expuesto al vehículo de PA (BSA FFA), los adipocitos fueron incubados a distintos tiempos (12 - 16 - 24 horas) con PA 0,75 mM, concentración que es usualmente utilizada en la literatura para este modelo biológico (26). Tras esta preincubación con PA, los adipocitos fueron expuestos a 100 nM de insulina por 15 minutos. Posteriormente, los lisados citoplasmáticos se analizaron mediante WB para determinar p-Akt/Akt ( $n = 1$ ). Se observó que 16 horas de exposición al ácido graso los adipocitos fue el menor tiempo de incubación que logró una disminución en la fosforilación de Akt en respuesta a insulina en la magnitud esperada, por lo tanto, dicho tiempo fue el escogido para el desarrollo de esta investigación (Figura 4).

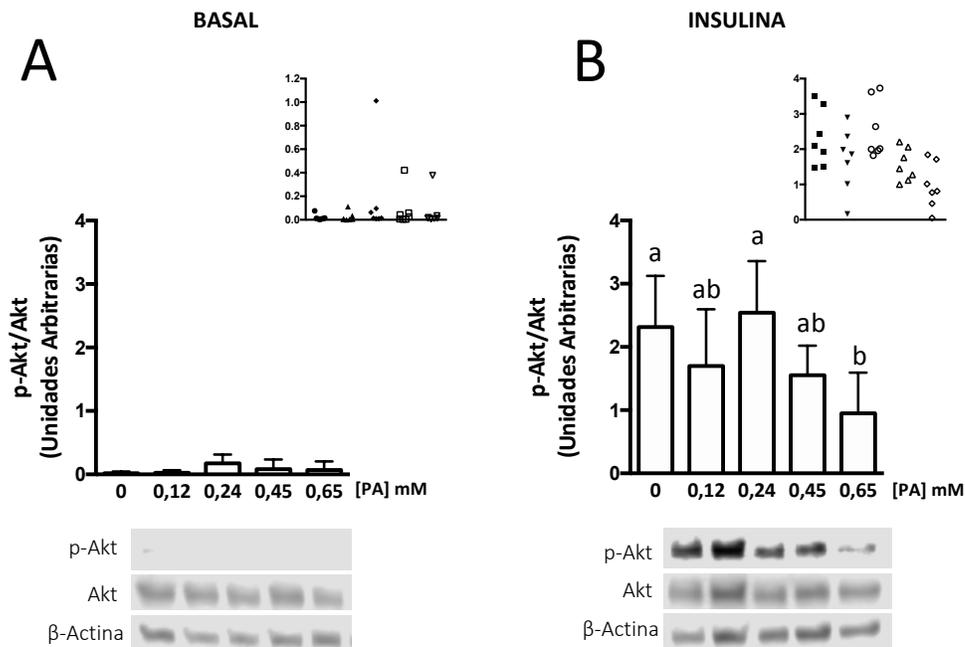


**Figura 4. Fosforilación de Akt a distintos tiempos de incubación con ácido palmítico (PA) en adipocitos 3T3-L1.** Los adipocitos se trataron con PA (0,75 mM) a diferentes tiempos de incubación (12, 16, 24 horas) versus un control expuesto al vehículo de PA (BSA FFA). A continuación, fueron estimulados con INS (100 nM) por 15 minutos. Los lisados citoplasmáticos totales fueron analizados mediante WB para estudio de Akt fosforilado en relación al Akt total (n = 1). En la parte inferior del recuadro se muestra blot del experimento.

Si bien se consideraron 5 concentraciones de PA para realizar la curva concentración–respuesta (fosforilación de Akt), la concentración más alta del ácido graso (0,83 mM) fue descartada, pues provocó que los adipocitos diferenciados perdieran adherencia a la placa de cultivo.

En la Figura 5 se muestra el efecto de distintas concentraciones de PA sobre p-Akt en adipocitos diferenciados en condición basal y estimulada por insulina. Al analizar el efecto de las distintas concentraciones de PA sobre p-Akt en la condición basal (ausencia de estimulación aguda con insulina, Figura 5.A), se observó que el PA no tiene un efecto. Por su parte, al evaluar el efecto de las distintas concentraciones PA sobre la p-Akt estimulada por insulina (Figura 5.B), las concentraciones de 0,12; 0,24 y 0,45 mM no tienen un efecto en relación a la condición sin PA, mientras que la concentración de 0,65 mM provocó una disminución en la fosforilación de Akt en un 59% respecto a la condición control (p

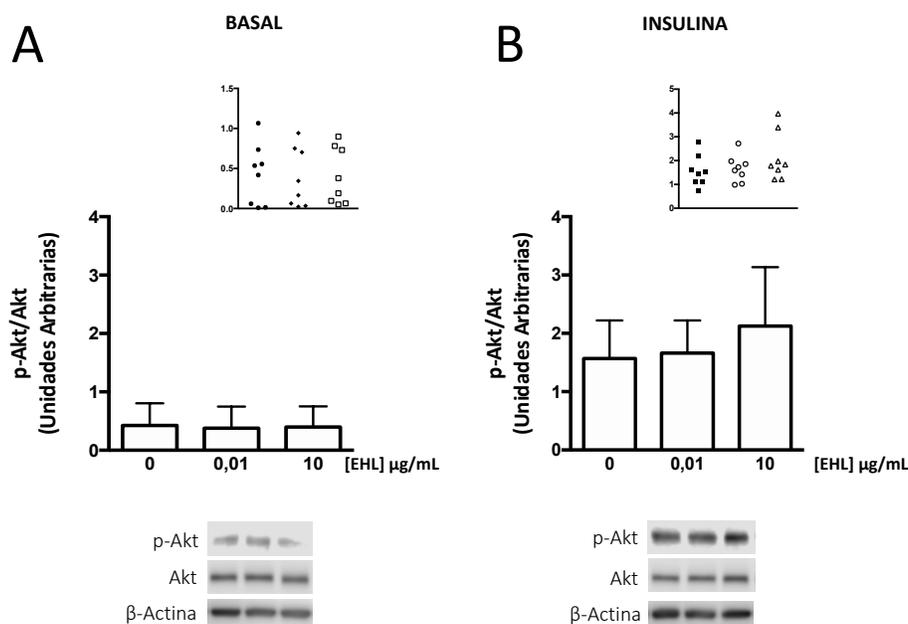
= 0,045). Por lo tanto, el tratamiento con 0,65 mM de PA por 16 horas fue escogido como la condición experimental adecuada para disminuir la fosforilación de Akt inducida por insulina en adipocitos 3T3-L1.



**Figura 5. Efecto concentración-respuesta de ácido palmítico sobre la fosforilación de Akt en adipocitos 3T3-L1 diferenciados.** Los adipocitos 3T3-L1 fueron deprivados de suero, para luego ser tratados con vehículo y distintas concentraciones de PA (0,12 - 0,24 - 0,45 - 0,65 mM) durante 16 horas. Posteriormente, las células se estimularon con insulina (INS,100 nM) durante 15 min. El contenido de Akt fosforilado (p-Akt) relativo a Akt total se evaluó mediante WB en lisados totales. **(A)** Efecto del PA sobre la fosforilación de Akt en adipocitos diferenciados en condiciones basales (sin insulina). **(B)** Efecto del PA sobre la fosforilación de Akt inducida por insulina. Los insertos muestran los valores individuales para cada experimento. En la parte inferior del recuadro se muestran blots representativos para cada experimento. Las barras representan media  $\pm$  DS ( $n = 8$  experimentos independientes). Las letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas entre las condiciones ( $p < 0,05$ ), Prueba de Friedman, seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Dunn.

## 9.2.2 OE 2. Establecer el efecto del EHL sobre la fosforilación de Akt en condiciones basales y luego de la estimulación con insulina.

Tal como se mencionó anteriormente (sección 8.2.1) al no reportarse un efecto citotóxico del EHL sobre los adipocitos 3T3-L1, se utilizó la concentración más baja (0,01  $\mu\text{g/mL}$ ) y la más alta (10  $\mu\text{g/mL}$ ) del extracto para evaluar su efecto sobre la fosforilación de Akt. Los adipocitos diferenciados fueron tratados con dichas concentraciones por un periodo de 18 horas, para luego ser o no estimulados durante 15 minutos con insulina (100 nM) (Figura 6).



**Figura 6. Efecto de EHL sobre la fosforilación de Akt en adipocitos 3T3-L1.** Los adipocitos diferenciados se trataron con vehículo y EHL (0,01 y 10  $\mu\text{g/mL}$ ) durante 18 horas. Posteriormente, las células se estimularon con insulina (100 nM) durante 15 min. El contenido de Akt fosforilado (p-Akt) relativo a Akt total se evaluó mediante WB en lisados totales. **(A)** Efecto de EHL sobre p-Akt en condición basal. **(B)** Efecto de EHL sobre la p-Akt inducida por insulina. En los insertos, se muestran los valores individuales para cada experimento. En la parte inferior del recuadro se muestran blots representativos para cada experimento. Las barras representan media  $\pm$  DS ( $n=8$  experimentos independientes). No se encontraron diferencias significativas entre las condiciones ( $p < 0,05$ ). Datos analizados mediante Prueba de Friedman, seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Dunn.

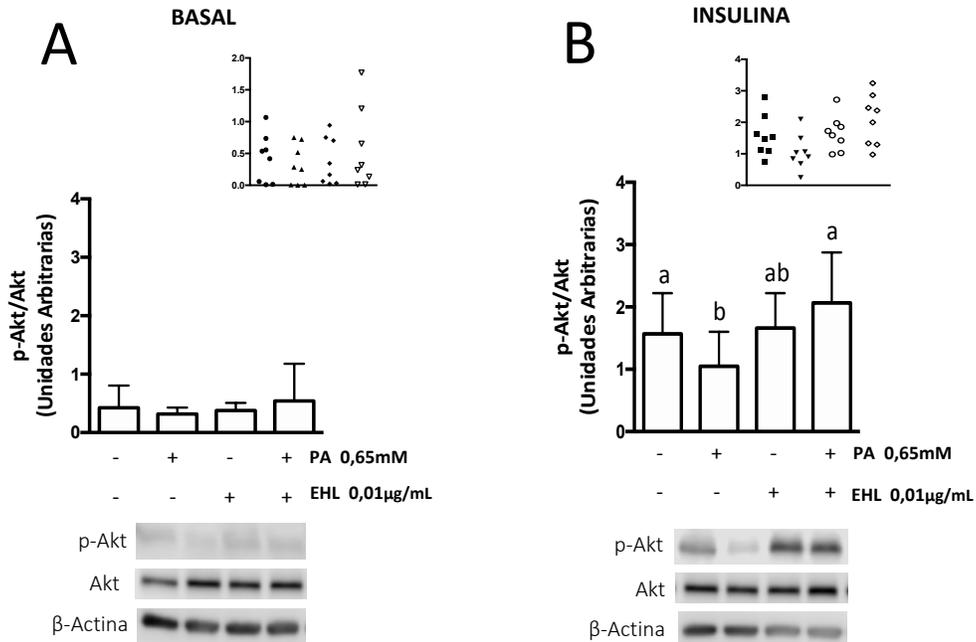
Al analizar el efecto del extracto sobre dicha activación (Figura 6.A – 6.B), no se encontraron diferencias significativas entre las concentraciones utilizadas de EHL respecto al control, tanto en aquellas células en condición basal como en las estimuladas con insulina. Lo anterior sugiere que el extracto por sí mismo no afecta la activación de la proteína Akt.

Con el objetivo de disminuir eventuales sesgos debido a la mayor viabilidad de los adipocitos observada con la concentración de 10 µg/mL, se decidió continuar el estudio utilizando solamente 0,01 µg/mL de EHL para estudiar el posible efecto protector del extracto sobre la inhibición de la señalización de la insulina inducida *in vitro* por PA.

### **9.2.3 OE 3. Evaluar la fosforilación de Akt basal y estimulada por insulina en adipocitos 3T3-L1 incubados con PA y pre-expuestos o no a EHL.**

Para evaluar el efecto protector del EHL sobre la disminución de la fosforilación de Akt en respuesta a insulina inducida por PA, se realizó una preincubación de 2 horas con EHL (0,01 µg/mL), para luego adicionar PA (0,65 mM) durante 16 horas. Así, las condiciones experimentales fueron: a) Control (no tratado), b) PA 0,65 mM, c) EHL 0,01 µg/mL, d) EHL 0,01 µg/mL + PA 0,65 mM. Posterior a dichos tratamientos, se realizó una estimulación aguda con insulina (100 nM) durante 15 minutos y luego se evaluó p-Akt y Akt total en los lisados celulares mediante WB.

La Figura 7.A, muestra todas las condiciones experimentales antes definidas en condición basal, no reportándose diferencias significativas respecto al control en dicha fosforilación. En presencia de insulina (Figura 7.B), se observó que PA provoca una menor fosforilación de Akt respecto al control ( $p = 0,04$ ). Por otra parte, la fosforilación de Akt en los adipocitos preincubados con EHL y luego tratados con PA fue similar a la fosforilación encontrada en las células controles (no tratadas). Lo anterior indica que el pre-tratamiento con EHL previene la disminución de la respuesta a insulina (p-Akt) inducida por PA.



**Figura 7. Efecto de PA, EHL y su combinación sobre la fosforilación de Akt en adipocitos diferenciados 3T3-L1.** El contenido de p-Akt relativo a Akt total se evaluó mediante WB en lisados citoplasmáticos totales. Los adipocitos se trataron con PA (16 horas, 0,65 mM), con o sin preincubación de 2 horas con EHL (0,01 µg/mL), en **(A)** ausencia (basal) o **(B)** presencia de insulina. En los insertos, se muestran los valores individuales para cada experimento. En la parte inferior del recuadro se muestran blots representativos para cada experimento. Las barras representan media  $\pm$  DS (n=8 experimentos independientes). Las letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas entre las condiciones ( $p < 0,05$ ). Análisis mediante Prueba de Friedman, seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Dunn.

## 10.- DISCUSIÓN

El tejido adiposo es un importante blanco de la insulina, la cual estimula el almacenamiento de triglicéridos por múltiples mecanismos. Estos incluyen el promover la diferenciación de preadipocitos a adipocitos y, en adipocitos maduros, la estimulación de la captación de glucosa, la lipogénesis y la inhibición de la lipólisis (34,35). En este contexto, se ha demostrado que alteraciones en la señalización de la insulina, en particular en la activación de Akt en el TA, son cruciales en el desarrollo de resistencia a la insulina a nivel sistémico (36). Uno de los modelos utilizados para evaluar estos efectos es la línea celular de preadipocito 3T3-L1. El PA se ha usado ampliamente en estos estudios dado que genera una disminución en la señalización de la insulina en diferentes modelos celulares (37-39). Ácidos grasos saturados como PA inhiben la captación de glucosa inducida por insulina, a nivel del transporte de glucosa y/o interfiriendo en la cascada de señalización intracelular de la hormona (40). En nuestro modelo, vemos que el PA no genera diferencias en los valores basales de la fosforilación de Akt (Figura 5.A), lo cual era esperable según los efectos vistos por PA en otros modelos celulares de estudio de la señalización de insulina (41). Con respecto a la línea celular utilizada en este trabajo de tesis, sólo se encuentra una referencia que asocia PA a la fosforilación de Akt ante el estímulo de insulina (42), donde utilizan una concentración de 0,75 mM de PA por 16 horas. En nuestra estandarización previa al inicio de los experimentos, utilizamos concentraciones de PA menores a la encontrada en la literatura (0- 0,65 mM), sin embargo, con 0,65 mM observamos casi un 60% de menor fosforilación de Akt que el control (Figura 5.B), lo cual sugiere un defecto en la señalización de la insulina, confirmando este modelo como una herramienta válida de evaluación de nuestra hipótesis. Existe amplia evidencia acerca de cómo los lípidos ejercen su acción inhibitoria sobre la señal de insulina. Por una parte, los diacilglicéridos, en su acción como segundos mensajeros, son sustrato de la proteína quinasa C (PKC), la cual posee actividad serina-quinasa y puede fosforilar la porción intracelular del receptor de insulina en Serina 307, lo que se traduce en una menor interacción del receptor con proteínas de señalización como IRS. La pérdida de dicha interacción con el receptor impide

la posterior activación de PI3K y, por consiguiente, la de Akt, lo que determina una disminución de la actividad de la señal generada por la insulina (43-45). Asimismo, estudios recientes muestran que la delección de la PKC épsilon en tejido adiposo, pero no en hepático, es capaz de mejorar la tolerancia a la glucosa y la sensibilidad a la insulina en un modelo de ratón (46).

Una vez validado el modelo, estudiamos los efectos producidos por el EHL en adipocitos 3T3-L1. Tal como en otros casos de plantas con propiedades medicinales, no existen muchos antecedentes respecto a la actividad biológica de la *Lampaya* y sus posibles efectos adversos, por lo cual es necesario estudiar sus propiedades y distintos efectos en forma sistemática (33,47). En primera instancia, el extracto hidroalcohólico no generó muerte celular, pero sí, de forma inesperada, la concentración mayor evaluada, se asoció a un aumento relativo del contenido de células (Figura 3.A). Al revisar la literatura vemos que los datos de viabilidad celular son muy variables y en muchos casos, dependientes del tipo de extracto y de la planta utilizada, pero la mayoría de los casos donde la viabilidad aumenta, se hace hincapié al posible efecto que podrían tener los polifenoles y compuestos antioxidantes de cada extracto evaluado, sin describir un mecanismo específico (48,49). Se destaca este punto como un posible tema a investigar en el futuro, ya que escapa de los objetivos de esta tesis. Por otra parte, se ha estudiado extractos de *Lampaya medicinalis* para describir sus efectos medicinales, la mayoría asociadas a sus efectos antiinflamatorios, también debido a su alto contenido de antioxidantes, específicamente polifenoles y flavonoides. Morales y sus colaboradores midieron la toxicidad de EHL usando un modelo animal de ratas. Los resultados mostraron que dosis de 3000 mg/Kg no presentaron indicios de malignidad ni toxicidad (32).

Al evaluar si el extracto genera cambios en la fosforilación basal de Akt, se aprecia que esto no ocurre, así como tampoco en condiciones de estimulación con insulina. Este dato nos sugiere que el EHL no tendría una actividad directa sobre esta vía, sugiriéndonos una respuesta más bien ligada a la presencia de PA. Hasta donde sabemos, no existen estudios donde se hayan analizado vías de

señalización intracelular como la ruta Akt u otra, sólo se han reportado datos relacionados con inflamación (32). No obstante, diversos estudios evalúan los efectos de extractos de plantas medicinales sobre resistencia a la insulina, donde se observan tanto aumentos como disminuciones de activación de Akt basal (50, 51). Cabe destacar que los estudios enfocados en efectos específicos de plantas medicinales sobre el tejido adiposo o modelos del mismo, son muy escasos.

Nuestra observación que muestra que el pretratamiento con EHL previno la disminución en la fosforilación de Akt inducida por PA, es sin duda una de las más relevantes del trabajo. De acuerdo con nuestra revisión de la literatura, este es el primer estudio en el cual se ha evaluado los efectos preventivos que podría tener un extracto hidroalcohólico de la planta nativa *Lampaya medicinalis* Phil. en la disminución de la señalización de la insulina inducida por PA en la línea celular 3T3-L1. A la fecha sólo existe un estudio que evalúa el efecto del EHL sobre la inflamación, sin embargo, este se limitó a observar efectos tóxicos y cambios morfológicos e histológicos en las articulaciones de animales (32), así como a describir los componentes y su capacidad antioxidante (33). Como se mencionó anteriormente, se han realizado estudios con extractos medicinales de diversas plantas, enfocados en los efectos antioxidantes y la mejora de la sensibilidad a la insulina, sin evaluar señalización intracelular en un modelo de adipocitos (52,53).

El exceso de lípidos, particularmente ácidos grasos saturados, genera la activación de receptores TLR (*Toll-like receptors*), los cuales no son exclusivos de células inmunes, sino que también se expresan en adipocitos (54). Este mecanismo lleva a la activación del factor nuclear de transcripción NF- $\kappa$ B, el cual está asociado a la disminución de la acción de la insulina, debido a que al activarse esta vía, genera la fosforilación de Ser307-IRS-1, de manera que impide su activación por la unión de insulina a su receptor (55). Adicionalmente, un aumento de los niveles de glucosa y ácidos grasos libres produce un incremento en la concentración de acetil-CoA, la cual a su vez incrementa la producción de donantes de electrones (NADH) en el ciclo de los ácidos tricarbóxicos. Cuando el exceso de NADH no puede ser utilizado por la fosforilación oxidativa (u otros

mecanismos), aumenta el gradiente de protones mitocondrial y aumenta la transferencia de electrones al oxígeno, formándose así radicales libres (anión superóxido en particular), produciendo así estrés oxidativo. Sumado a esto, el estrés oxidativo produce un aumento de la expresión de citoquinas pro-inflamatorias y disminución de la expresión de citoquinas antiinflamatorias en los tejidos, lo que representaría un nexo entre el exceso de lípidos y la inducción de la RI (56). En el presente trabajo, proponemos que el mecanismo protector de EHL podría relacionarse con su capacidad antioxidante y antiinflamatoria. Si bien en este estudio no se aplicaron técnicas para identificar los componentes específicos del extracto, creemos que este efecto protector del EHL contra los efectos del PA pudo ser producto de su ya conocido alto contenido de flavonoides (33,57). En concordancia con otras investigaciones, la caracterización química ha revelado que ciertas hierbas medicinales, a las cuales se les han atribuido actividad antioxidante e antiinflamatoria, tienen en común grandes concentraciones de flavonoides. Estos compuestos son ampliamente reconocidos como antioxidantes naturales, principalmente por su capacidad de atrapar especies reactivas de oxígeno (ROS) (47,52,53,57), mecanismo por el cual se ha documentado que el PA genera la mayoría de los efectos relacionados a la resistencia a la insulina. Si el efecto del extracto es por acción antioxidante, solo deberíamos observar algún cambio en condiciones de estrés oxidativo cuando la cantidad de ROS está elevada. Entre nuestros resultados no se observan cambios en la fosforilación de Akt en ausencia de PA. De acuerdo a esto, esperaríamos ver, en una evaluación a futuro, que el PA induce un aumento de ROS, el que sería revertido por el EHL.

Dentro de las limitaciones de este estudio, podemos mencionar la ausencia de aproximaciones experimentales que evaluaran la resistencia a la insulina en forma más fisiológica, es decir, las consecuencias en un modelo animal *in vivo*, o bien otras respuestas intracelulares dependientes de insulina en los adipocitos, como por ejemplo captación de glucosa. También se reconoce la falta de medición de parámetros de estrés oxidativo y/o de evaluación del efecto biológico específico para cada uno de los compuestos descritos en EHL (33). No se utilizaron otros tiempos de pre-incubación, para analizar sus posibles efectos. Todo lo anterior representa

desafíos a futuro que contribuirán a dilucidar el mecanismo por el cual EHL actúa frente al efecto deletéreo del PA.

Consideramos que los resultados de este estudio son muy relevantes. Primero porque esta investigación es pionera en el uso del EHL en un modelo celular adiposo. Además, corroboramos que, en este modelo, Lampaya es una planta inocua en el aspecto toxicológico y metabólico. Por otra parte, destaca la dimensión medicinal de la especie evaluada, pues contribuimos a avalar científicamente el uso tradicional de esta planta. Dado el ámbito patrimonial que esta especie nativa significa para el país, proyectamos una gran relevancia en su uso como tratamiento complementario en la prevención y tratamiento de problemas metabólicos asociados a la obesidad e inflamación.

## 11.- CONCLUSIONES

Este es el primer estudio donde se analiza el efecto del EHL sobre la vía de señalización de insulina en un modelo *in vitro*. Basados en los resultados de este trabajo que indican un efecto protector de EHL en la disminución de la fosforilación estimulada por insulina de Akt inducida por PA, podemos señalar que nuestra hipótesis ha sido comprobada.

## 12.- AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, a mis directoras de tesis Dra. Paulina Ormazábal y Dra. Mariana Cifuentes, quienes creyeron en mí y me dieron la oportunidad de ampliar mis conocimientos y permitieron el desarrollo de este trabajo. Por su disposición, entrega de conocimientos, motivación y amplia calidad humana.

A los miembros de la comisión evaluadora, Dr. Francisco Pérez, Dra. Ana María Ronco y Dr. Rodrigo Troncoso por su gran disposición y expertiz, dedicando su tiempo en correcciones y sugerencias que significaron la elaboración de un mejor proyecto.

A todos los integrantes del Laboratorio de Obesidad y Metabolismo Energético en Geriatria y Adultos (OMEGA) por el estímulo de trabajo, apoyo y cooperación para optimizar la realización de esta tesis. De manera muy especial, agradezco a Cecilia Fuentes, quien fue indispensable para el desarrollo de esta tesis y el de mis aptitudes técnicas en la experimentación realizada en esta tesis.

A mis grandes amigos de Magister quienes han sido una familia en este proceso, llenando de alegrías y entendiendo de forma única esta etapa de formación profesional y personal.

Agradezco a mi familia por su incondicional amor, apoyo y confianza que me han permitido cumplir mis metas y sueños, entregándome la fuerza para seguir adelante en cada una de las dificultades que se presentaron en el camino; sin ellos nada de esto hubiera sido posible. Y, por último, agradezco infinitamente a mi hijo Benjamín, quien me entrega el amor, la energía, el ímpetu y la motivación necesaria para ser cada día, una mejor versión en cada ámbito de mi vida.

### 13.- REFERENCIAS

1. Visscher TL, et al. The public health impact of obesity. *Annu Rev Public Health* 2001;22:355-75
2. Del Pozo et al. Expression profile in omental and subcutaneous adipose tissue from lean and obese subjects. Repression of lipolytic and lipogenic genes. *Obes Surg* 2011;21:633-43
3. Obesidad y Sobrepeso. Organización Mundial de la Salud. 2016. [accessed 2 Feb 2019] Available from: <http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>
4. Departamento de Epidemiología, División de Planificación Sanitaria, Subsecretaría de Salud Pública, Ministerio de Salud. ENCUESTA NACIONAL DE SALUD 2016-2017. [accessed 2 Feb 2019] Available from: [http://www.minsal.cl/wp-content/uploads/2017/11/ENS-2016-17\\_PRIMEROS-RESULTADOS.pdf](http://www.minsal.cl/wp-content/uploads/2017/11/ENS-2016-17_PRIMEROS-RESULTADOS.pdf)
5. McArdle MA, et al. Mechanisms of obesity-induced inflammation and insulin resistance: insights into the emerging role of nutritional strategies. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2013;4:52
6. Frühbeck G, et al. The adipocyte: a model for integration of endocrine and metabolic signaling in energy metabolism regulation. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2001;280:E827-47
7. Kumari M, et al. Regulation of immunometabolism in adipose tissue. *Semin Immunopathol* 2017;19:1-14
8. Mariman EC, et al. Adipocyte extracellular matrix composition, dynamics and role in obesity. *Cell Mol Life Sci* 2010;67:1277-92
9. Manzur F, et al. Adipocytes, visceral obesity, inflammation and cardiovascular disease. *Rev Col Cardiologia* 2010;17:5-9

10. Sánchez F, et al. Adipocytokines, adipose tissue and its relationship with immune system cells. *Gac Méd Méx* 2005;141:6
11. Groop L, et al. Effect of insulin on oxidative and nonoxidative pathways of free fatty acid metabolism in human obesity. *Am J Physiol* 1992;263:E79-84
12. Matthaei S, et al. Pathophysiology and pharmacological treatment of insulin resistance. *Endocr Rev* 2000;21:585-618
13. White MF, et al. Mutation of the insulin receptor at tyrosine 960 inhibits signal transmission but does not affect its tyrosine kinase activity. *Cell* 1988;54:641-49
14. Saini. Molecular mechanisms of insulin resistance in type 2 diabetes mellitus. *World J Diabetes* 2010;1:68-75
15. Ueki, et al. Suppressor of cytokine signaling 1 (SOCS-1) and SOCS-3 cause insulin resistance through inhibition of tyrosine phosphorylation of insulin receptor substrate proteins by discrete mechanisms. *Mol Cell Biol* 2004;24:5434-46
16. Scheid, et al. Unravelling the activation mechanisms of protein kinase B/Akt. *FEBS Lett* 2003;546:108-12
17. Van Dam et al. Akt activation is required at a late stage of insulin-induced GLUT4 translocation to the plasma membrane. *Mol Endocrinol* 2005;19:1067-77
18. Nascimento EB, et al. Phosphorylation of PRAS40 on Thr246 by PKB/AKT facilitates efficient phosphorylation of Ser183 by mTORC1. *Cell Signal* 2010;22:961-7
19. Freidenberg GR, et al. Reversibility of defective adipocyte insulin receptor kinase activity in non-insulin-dependent diabetes mellitus. Effect of weigh loss. *J Clin Invest* 1988;82:1398-1406

20. Whiteman. EL et al. Role of Akt/protein kinase B in metabolism. Trends Endocrinol Metab 2002;13:444-51
21. Gustavo Vazquez-Jimenez J. Palmitic acid but not palmitoleic acid induces insulin resistance in a human endothelial cell line by decreasing SERCA pump expression. Cell Signal 2016;28:53-9.
22. Palomer X, et al. Palmitic and Oleic Acid: The Yin and Yang of Fatty Acids in Type 2 Diabetes Mellitus. Trends Endocrinol Metab 2017;17:30170-4
23. Emanuel AL, et al. Role of Insulin-Stimulated Adipose Tissue Perfusion in the Development of Whole-Body Insulin Resistance. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2017;37:411-18
24. Listenberger LL, et al. Triglyceride accumulation protects against fatty acid-induced lipotoxicity. Proc Natl Acad Sci USA 2003;100:3077-82
25. Kershaw EE, et al. Adipose tissue as an endocrine organ. J Clin Endocrinol Metab 2004;89:2548-56
26. Yokoyama K, et al. Effects of Ursodeoxycholic Acid and Insulin on Palmitate-Induced ROS Production and Down-Regulation of PI3K/Akt Signaling Activity. Biol Pharm Bull 2017;40:2001-4
27. Randle PJ, et al. The glucose fatty-acid cycle: its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus. Lancet 1963;1:785-9
28. Dey D, et al. A Lupinocide prevented fatty acid induced inhibition of insulin sensitivity in 3T3 L1 adipocytes. Mol Cell Biochem 2007;300:149-57
29. Duplus E, et al. Is there a single mechanism for fatty acid regulation of gene transcription. Biochem Pharmacol 2002;64:893-901
30. Unger RH. Lipotoxicity in the pathogenesis of obesity-dependent NIDDM. Genetic and clinical implications. Diabetes 1995;44:863-70

31. Boden G. Role of fatty acids in the pathogenesis of insulin resistance and NIDDM. *Diabetes* 1997;46:3-10
32. Morales G, et al. Acute oral toxicity and anti-inflammatory activity of hydroalcoholic extract from *Lampaya medicinalis* Phil in rats. *Biol Res* 2014;47:6
33. Morales G, et al. Antioxidant activities of *Lampaya medicinalis* extracts and their main chemical constituents. *BMC Complement Altern Med* 2014;14:259
34. Green H, et al. An established pre-adipose cell line and its differentiation in culture. *Cell* 1974;3:127-33
35. Steinberg MM, et al. Differentiation of cultured pre-adipose cells: a probability model. *J Cell Physiol Suppl* 1982;2:37-50
36. Petersen MC, et al. Mechanisms of Insulin Action and Insulin Resistance. *Physiol Rev* 2018;98:2133-2223
37. Gustavo Vazquez-Jimenez J, et al. Palmitic acid but not palmitoleic acid induces insulin resistance in a human endothelial cell line by decreasing SERCA pump expression. *Cell Signal* 2016;28:53-9
38. Shinjo S, et al. Disruption of the mitochondria-associated ER membrane (MAM) plays a central role in palmitic acid-induced insulin resistance. *Exp Cell Res* 2017;359:86-93
39. Lu L, et al. Egr2 enhances insulin resistance via JAK2/STAT3/SOCS-1 pathway in HepG2 cells treated with palmitate. *Gen Comp Endocrinol* 2018;260:25-31
40. Muscarà C, et al. Anthocyanins ameliorate palmitate-induced inflammation and insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes. *Phytother Res*. 2019. [Epub]

41. Mazibuko-Mbeje SE, et al. Aspalathin-Enriched Green Rooibos Extract Reduces Hepatic Insulin Resistance by Modulating PI3K/AKT and AMPK Pathways. *Int J Mol Sci* 2019;20:pii.E633
42. Mazibuko SE, et al. Aspalathin improves glucose and lipid metabolism in 3T3-L1 adipocytes exposed to palmitate. *Mol Nutr Food Res* 2015;59:2199-208
43. Szendroedi J, et al. Role of diacylglycerol activation of PKC $\theta$  in lipid-induced muscle insulin resistance in humans. *Proc Natl Acad Sci USA* 2014;111:9597-602
44. Capurso C, et al. From excess adiposity to insulin resistance: the role of free fatty acids. *Vascul Pharmacol* 2012;57:91-7
45. Yang L, et al. Inhibitory effect on protein kinase C $\theta$  by Crocetin attenuates palmitate-induced insulin insensitivity in 3T3-L1 adipocytes. *Eur J Pharmacol* 2010;642:47-55
46. Brandon AE, et al. Protein Kinase C Epsilon Deletion in Adipose Tissue, but Not in Liver, Improves Glucose Tolerance. *Cell Metab* 2019;29:183-191
47. Richard AJ, et al. Artemisia extracts activate PPAR $\gamma$ , promote adipogenesis, and enhance insulin sensitivity in adipose tissue of obese mice. *Nutrition* 2014;30:S31-6
48. Marimoutou M, et al. Antioxidant polyphenol-rich extracts from the medicinal plants *Antirhea borbonica*, *Doratoxylon apetalum* and *Gouania mauritiana* protect 3T3-L1 preadipocytes against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, TNF $\alpha$  and LPS inflammatory mediators by regulating the expression of superoxide dismutase and NF- $\kappa$ B genes. *J Inflamm (Lond)* 2015;12:10
49. Lahrita L, et al. Uncovering potential of Indonesian medicinal plants on glucose uptake enhancement and lipid suppression in 3T3-L1 adipocytes. *J Ethnopharmacol* 2015;168:229-36

50. Tang D, et al. Anti-diabetic Effect of Punica granatum Flower Polyphenols Extract in Type 2 Diabetic Rats: Activation of Akt/GSK-3 $\beta$  and Inhibition of IRE1 $\alpha$ -XBP1 Pathways. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2018;9:586
51. Liu K, et al. Modified Si-Miao-San extract inhibits inflammatory response and modulates insulin sensitivity in hepatocytes through an IKK $\beta$ /IRS-1/Akt-dependent pathway. *J Ethnopharmacol* 2011;136:473-9
52. Vijayalakshmi K, et al. Cell line cytotoxicity, antiadipogenic and glucose uptake activity of *Sarcostemma brevistigma* Wight. & Arn. *Mol Biol Rep* 2018;45:2555-61
53. Sangeetha KN, et al. Current trends in small molecule discovery targeting key cellular signaling events towards the combined management of diabetes and obesity. *Bioinformatics* 2017;13:394-99
54. Thomalla M, et al. Evidence of an anti-inflammatory toll-like receptor 9 (TLR 9) pathway in adipocytes. *J Endocrinol* 2019;240:325-343
55. Nandipati KC, et al. Protein kinases: mechanisms and downstream targets in inflammation-mediated obesity and insulin resistance. *Mol Cell Biochem* 2017;426:27-45
56. Zhang J, et al. ROS and ROS-Mediated Cellular Signaling. *Oxid Med Cell Longev* 2016;2016:4350965.
57. Garrido G, et al. Fenoles y flavonoides totales y actividad antioxidante de extractos de hojas de *Lampaya medicinalis* F. Phil. *J Pharm Pharmacogn Res* 2013;1:30-38