



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

**EFECTO DE LA QUERCETINA SOBRE LA EXPRESIÓN GÉNICA
RELACIONADA CON EL METABOLISMO ENERGÉTICO EN
DIFERENTES TEJIDOS DE RATAS ALIMENTADAS CON UNA
DIETA ALTA EN COLESTEROL**

Nicole Francisca de la Jara Bravo

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Fomento de la
Producción Animal

PROFESORA GUÍA: CATALINA ANTONIETA CARRASCO POZO

Departamento de Nutrición, Facultad de Medicina, Universidad de Chile

PROYECTO FONDECYT 11130232

SANTIAGO, CHILE
2016



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

**EFEECTO DE LA QUERCETINA SOBRE LA EXPRESIÓN GÉNICA
RELACIONADA CON EL METABOLISMO ENERGÉTICO EN
DIFERENTES TEJIDOS DE RATAS ALIMENTADAS CON UNA
DIETA ALTA EN COLESTEROL**

Nicole Francisca de la Jara Bravo

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Fomento de la
Producción Animal

	Nota Final
Profesora Guía	Catalina Carrasco Pozo
Profesora Correctora	María Sol Morales Silva
Profesor Corrector	Sergio Bucarey Vivanco

PROYECTO FONDECYT 11130232

SANTIAGO, CHILE
2016

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a mis padres, Oscar de la Jara y Nicole Bravo, por la enseñanza, apoyo, valores y cariño que me han entregado a lo largo de toda mi vida. ¡Son los mejores papás!

A mi hermana mayor, Camila, por acompañarme a lo largo de todo el proceso universitario en Santiago y ser un pilar fundamental en mi día a día. A mis hermanos pequeños, Consuelo y Oscar, por su cariño y darme la oportunidad de enseñarles y acompañarlos en su crecimiento.

A mi mejor amiga de la universidad, Patricia, por todos los momentos compartidos, noches de estudio y desvelo, y ser la persona con la cual pude compartir paso a paso cada una de las alegrías de este proceso.

A mi pareja, Daniel, por su apoyo incondicional, consejos, amor y por sacarme una sonrisa cada día.

A mi profesora guía, Catalina Carrasco, por darme la oportunidad de participar en su investigación y una de sus publicaciones científicas, por la confianza, paciencia, buena disposición y conocimientos entregados durante este largo proceso. ¡Muchas gracias!

A Marjorie Reyes, por enseñarme todas las técnicas de laboratorio necesarias para llevar a cabo mi trabajo de memoria y por su excelente disposición, y a mis profesores correctores, María Sol Morales y Sergio Bucarey, por ayudarme con cada una de las dudas que tuve durante este proceso..

Y finalmente, agradezco al proyecto FONDECYT 11130232, por permitir el financiamiento de la investigación de la cual mi memoria de título formó sólo una pequeña parte.

ÍNDICE DE CAPITULOS

INTRODUCCIÓN	1
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	3
Polifenoles	3
Quercetina.....	3
Nutrigenómica	4
Genes relacionados con un posible efecto protector de la quercetina frente a una dieta alta en colesterol.....	5
<i>PPAR</i> γ	5
<i>PGC-1α</i>	5
<i>FOXO1</i>	6
<i>FOXO3</i>	7
<i>UCP-2</i>	7
<i>HO-1</i>	8
HIPÓTESIS.....	9
OBJETIVO GENERAL	9
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	9
MATERIALES Y MÉTODOS	10
Grupos experimentales	10
Cuantificación de la expresión génica	10
<i>Extracción de ARN</i>	10
<i>Cuantificación de ARN</i>	11
<i>Síntesis de ADNc a partir de ARN</i>	12
<i>Determinación de la expresión génica mediante qPCR</i>	12
<i>Análisis de la expresión génica</i>	13
Inmunohistoquímica	13
<i>Desparafinación y recuperación antigénica</i>	13
<i>Reconocimiento y detección antigénica</i>	14
RESULTADOS	15
DISCUSIÓN	21
Tejido pancreático	22
Modulación de la cantidad de insulina presente en tejido pancreático.....	23
Tejido adiposo epididimal	24
Tejido adiposo subcutáneo	27
Tejido cardíaco	29
CONCLUSIONES	32
BIBLIOGRAFÍA	33

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA NRO. 1: Efecto de una dieta alta en colesterol y la suplementación con quercetina sobre la expresión génica en tejido pancreático.....	15
TABLA NRO. 2: Efecto de una dieta alta en colesterol y la suplementación con quercetina sobre la cantidad de insulina presente en tejido pancreático	16
TABLA NRO. 3: Efecto de una dieta alta en colesterol y la suplementación con quercetina sobre la expresión génica en tejido adiposo epididimal	18
TABLA NRO. 4: Efecto de una dieta alta en colesterol y la suplementación con quercetina sobre la expresión génica en tejido adiposo subcutáneo.....	19
TABLA NRO. 5: Efecto de una dieta alta en colesterol y la suplementación con quercetina sobre la expresión génica en tejido cardíaco	20

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA NRO. 1: Inmunotinción de insulina en tejido pancreático.....	17
FIGURA NRO. 2: Efecto de la suplementación con quercetina sobre la expresión génica en tejido pancreático y su relación con la función pancreática.....	22
FIGURA NRO. 3: Efecto de la dieta HC sobre la expresión génica en tejido adiposo epididimal y relación con su función: efecto protector de quercetina.....	24
FIGURA NRO. 4: Efecto de la dieta HC sobre la expresión génica en tejido adiposo subcutáneo y relación con su función: efecto protector de quercetina.....	27
FIGURA NRO. 5: Efecto de la dieta HC sobre la expresión génica en tejido cardíaco y su relación con la función cardíaca: efecto protector de quercetina.....	29

RESUMEN

El sobrepeso y obesidad son considerados uno de los mayores problemas en salud pública a nivel nacional y mundial, considerando que sus prevalencias han aumentado dramáticamente en las últimas tres décadas. Estudios recientes han demostrado el rol protector de los polifenoles en el desarrollo de obesidad y desórdenes metabólicos asociados, al modular rutas fisiológicas y moleculares involucradas en el metabolismo energético. Los polifenoles corresponden a los antioxidantes más abundantes en la dieta, destacándose entre ellos la quercetina, que ha sido extensamente estudiada debido a sus efectos anti-inflamatorios y antioxidantes. Su consumo está asociado a efectos benéficos para la salud, mejorando el perfil lipídico y la glicemia, atenuando la insulino-resistencia, adiposidad y obesidad. Como antioxidante podría proteger a los componentes celulares contra el daño oxidativo, y así, limitar el riesgo de desarrollo de patologías con un fuerte componente de estrés oxidativo como enfermedades cardiovasculares, diabetes y obesidad. Este estudio tuvo como objetivo determinar el efecto de quercetina en ratas alimentadas con una dieta alta en colesterol, en la expresión génica de factores de transcripción, co-activadores y genes involucrados en el metabolismo celular y homeostasis del colesterol en tejidos asociados al desarrollo de enfermedades crónicas relacionadas a estrés oxidativo. Los animales fueron distribuidos al azar en 4 grupos distintos y alimentados con dieta control (C), dieta control con suplementación de quercetina (CQ), dieta alta en colesterol (HC) o dieta alta en colesterol con suplementación de quercetina (HCQ) durante 4 semanas. Para esto se midió la expresión génica relativa (ARNm), mediante PCR en tiempo real, de PPAR γ , PGC-1 α , FOXO1, FOXO3, UCP-2 y HO-1 en páncreas, tejido adiposo epididimal (TAE) y subcutáneo (TAS) y en corazón, y se midieron los niveles de insulina en páncreas a través de inmunohistoquímica. En páncreas la modulación que ejerce quercetina sobre PPAR γ , PGC-1 α y FOXO1 no se relaciona con efectos protectores específicos ante la dieta HC. La cantidad de insulina en páncreas aumenta con la suplementación de quercetina, tanto en ratas alimentadas con la dieta C como con la dieta HC. En TAE, quercetina atenúa la alteración en la expresión de PPAR γ , FOXO1, UCP-2 y HO-1 inducida por la dieta HC. En TAS, quercetina atenúa la alteración en la expresión de FOXO1 y HO-1 inducida por la dieta HC. En corazón, quercetina atenúa la alteración en la expresión de FOXO1, UCP-2 y HO-1 inducida por la dieta HC. En conclusión, quercetina tuvo un efecto protector en páncreas al aumentar la cantidad de insulina, a pesar de que no se observó un efecto protector específico ante una dieta HC. Por otra parte, la administración con quercetina en ratas alimentadas con una dieta alta en colesterol protege a tejido adiposo epididimal, subcutáneo y corazón a través de la regulación de distintos genes involucrados en el metabolismo energético.

Palabras clave: polifenoles, quercetina, resistencia a insulina, diabetes, obesidad, estrés oxidativo, colesterol, metabolismo, expresión génica, insulina, PPAR γ , PGC-1 α , FOXO1, FOXO3, UCP-2, HO-1.

SUMMARY

Overweight and obesity are considered one of the most important problems in national as well as global public health, considering that their prevalence has increased dramatically over the past three decades. Recent studies have demonstrated the protective role of polyphenols in the development of obesity, and associated metabolic disorders, by modulating physiological and molecular pathways involved in energy metabolism. Polyphenols are the most abundant antioxidants in the diet, outstanding among them quercetin, which has been extensively studied because of its anti-inflammatory and antioxidant effects. Its consumption is associated with beneficial health effects, improving the lipid profile and glycemia, diminishing insulin resistance, adiposity and obesity. As an antioxidant, quercetin may protect cellular components against oxidative damage, and thus decreasing the risk of the development of diseases with a strong oxidative stress component, as cardiovascular disease, diabetes and obesity. This study aimed to determine the effect of quercetin on gene expression of transcription factors, co-activators and genes involved in cellular metabolism and homeostasis of cholesterol in rats fed a high cholesterol diet. These expression were studied, in tissues associated with the development of oxidative stress related chronic diseases. Animals were randomly distributed into 4 groups and fed control diet (C); control diet supplemented with quercetin (CQ); high-cholesterol diet (HC); or HC diet supplemented with quercetin (HCQ) for 4 weeks. Therefore, PPAR γ , PGC-1 α , FOXO1, FOXO3, UCP-2 and HO-1 relative gene expressions (mRNA) were measured by real-time PCR in pancreas, epididymal (TAE) and subcutaneous adipose tissue (TAS), and heart, and insulin levels were measured through immunohistochemistry in pancreas. The modulation exerted on PPAR γ , PGC-1 α and FOXO1 by quercetin was not related to its specific protective effects against a HC diet in pancreas. Quercetin increased the amount of insulin, both in rats fed a C or HC diet. Quercetin attenuated HC diet-induced alteration on PPAR γ , FOXO1, UCP-2 and HO-1 expression in TAE. Quercetin attenuated HC diet-induced alteration on FOXO1 and HO-1 expression in TAS. Quercetin attenuated HC diet-induced alteration on FOXO1, UCP-2 and HO-1 expression in heart. In conclusion, quercetin had a protective effect on pancreas by increasing insulin levels, although a specific protective effect against a HC diet was not observed. Furthermore, quercetin administration to rats fed a high cholesterol diet protected epididymal and subcutaneous adipose tissue, and heart, through the regulation of several genes involved in energy metabolism.

Keywords: polyphenols, quercetin, insulin resistance, diabetes, obesity, oxidative stress, cholesterol, metabolism, gene expression, insulin, PPAR γ , PGC-1 α , FOXO1, FOXO3, UCP-2, HO-1.

INTRODUCCIÓN

La obesidad es uno de los mayores problemas de salud pública en el mundo industrializado, estimándose que a nivel mundial 2.000 millones de adultos tienen sobrepeso y, al menos, 300 millones son considerados obesos (Stewart *et al.*, 2008; Arias *et al.*, 2014). Los mayores contribuyentes al aumento de estas cifras son la vida sedentaria y el consumo de dietas altas en grasa y calorías (Stewart *et al.*, 2008; Arias *et al.*, 2014). En Chile su prevalencia también ha aumentado notablemente en la última década, afectando al 25.1% de la población chilena (MINSAL, 2010). La obesidad constituye una enfermedad crónica inflamatoria y multifactorial, considerada uno de los factores de riesgo más importantes en el desarrollo de varias enfermedades, que incluyen hipertensión, diabetes tipo II, enfermedades coronarias y enfermedades metabólicas (Kopelman, 2000 citado por Arias *et al.*, 2014; Stewart *et al.*, 2008; Meydani y Hasan, 2010). Esta enfermedad también se relaciona con el desarrollo del síndrome metabólico el cual afecta al 35,3% de la población chilena (MINSAL, 2010). Dentro de los factores clínicos que definen este síndrome se encuentran: resistencia a la insulina, hipertensión arterial, obesidad central e hipercolesterolemia, éste último afecta al 38,5% de la población chilena (MINSAL, 2010). Los niveles elevados de colesterol pueden dañar las células de distintos tejidos, al promover estrés oxidativo, apoptosis celular y disfunción mitocondrial (Dirkx y Solimena, 2012; Carrasco-Pozo *et al.*, 2015; Carrasco-Pozo *et al.*, 2016b). El estrés oxidativo genera resistencia a la insulina, daño en el ADN, lipoperoxidación y modificaciones oxidativas en proteínas, entre otros efectos (Boden *et al.*, 2015). El estrés oxidativo está involucrado en la disfunción de las células β , factor clave en la patogénesis de diabetes tipo II (Adewole *et al.*, 2007). La resistencia persistente a insulina implica un importante riesgo de desarrollar enfermedad cardiovascular, la cual constituye la mayor causa de mortalidad en pacientes con diabetes tipo II (Kalofoutis *et al.*, 2007 citado por Bahadoran *et al.*, 2013). La Organización Mundial de la Salud (OMS) predice que para el 2030 aproximadamente 23,3 millones de personas serán víctimas de enfermedades cardiovasculares, siendo la dieta el principal factor de riesgo en el desarrollo y progresión de la diabetes (OMS, 2013 citado por Miranda *et al.*, 2016).

Compuestos con altas capacidades antioxidantes podrían relacionarse con un menor riesgo de desarrollar diabetes tipo II y complicaciones asociadas (Bahadoran *et al.*, 2013). Se ha descrito que el consumo de frutas y verduras aportan al organismo diversos compuestos bioactivos, destacando entre los con propiedades antioxidantes los polifenoles. Los polifenoles son metabolitos secundarios de las plantas que, normalmente, cumplen funciones de defensa contra patógenos y radiación ultravioleta y que presentan propiedades anti-inflamatorias y antioxidantes, dentro de otras (Manach *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2014). Debido a su probable rol en la prevención de diversas enfermedades asociadas al estrés oxidativo, tales como enfermedades cardiovasculares, neurodegenerativas y cancerígenas, su estudio ha tomado relevancia en los últimos años (Manach *et al.*, 2004; Kelly, 2011). Se ha visto un 21% de reducción en la mortalidad por enfermedades cardiovasculares en humanos que consumen más de 4 mg de polifenoles al día (Stewart *et al.*, 2008). Sus propiedades antioxidantes y capacidad de modular la función mitocondrial protegen a los tejidos contra daños por isquemia-reperfusión, componentes tóxicos y otros factores que puedan inducir estrés oxidativo (Manach *et al.*, 2004; Kelly, 2011), tales como el colesterol. Es por esto que el uso de moléculas que posean propiedades antioxidantes, anti-inflamatorias y protectoras de la función mitocondrial, como la quercetina, son una estrategia prometedora para la protección celular en distintos tejidos contra diversas *noxas* cuyo mecanismo de acción involucre al estrés oxidativo, inflamación o disfunción mitocondrial. El presente trabajo busca identificar el efecto de la quercetina sobre la expresión génica, que permita explicar su efecto protector ante el estrés oxidativo y alteración del metabolismo energético generado por una dieta alta en colesterol.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Polifenoles

Los polifenoles representan el mayor porcentaje de antioxidantes consumidos por la población humana, siendo los flavonoides los más abundantes en la dieta humana (Scalbert *et al.*, 2005; Bahadoran *et al.*, 2013). Las principales fuentes de polifenoles consumidos por la población corresponden a las frutas y bebidas, como el té y el vino tinto (Manach *et al.*, 2004). Los efectos benéficos de los polifenoles sobre la salud se deberían a diversos mecanismos, tales como: supresión de la absorción intestinal de grasas, mayor consumo de glucosa en tejido muscular, supresión de vías anabólicas, estimulación de vías catabólicas en tejido adiposo, hígado y otros, atenuación de la hiperglicemia, dislipemia e insulino-resistencia, disminución de niveles de colesterol en plasma, inhibición de la angiogénesis en tejido adiposo, inhibición de la diferenciación de adipocitos y reducción de la inflamación crónica asociada a obesidad y sobrepeso (Scalbert *et al.*, 2005; Meydani y Hasan, 2010; Bahadoran *et al.*, 2013). El consumo de ciertos polifenoles modifican el metabolismo lipídico y energético, pudiendo facilitar la pérdida de peso corporal y prevenir su ganancia (Meydani y Hasan, 2010). El consumo de flavanonas, por ejemplo, durante 2-6 semanas reduce los niveles de colesterol, LDL y triglicéridos en plasma de ratas (Scalbert *et al.*, 2005).

Quercetina

Quercetina es un polifenol ubiqüo en frutas y verduras y representa uno de los flavonoides más abundantes en la dieta occidental. De acuerdo al “US Department of Health and Human Services” (Stavric, 1994), y a estudios realizados sobre la dieta francesa (Pérez-Jiménez *et al.*, 2011) y finlandesa (Ovaskainen *et al.*, 2008), la ingesta diaria promedio de quercetina es de ~ 25 mg. Grandes cantidades de quercetina son encontradas en las cebollas (284-486-mg/kg) y manzanas (21-72 mg/kg) (Hertog *et al.*, 1992). Debido a sus propiedades antioxidantes, el consumo de quercetina sería relevante para el tratamiento de enfermedades relacionadas al estrés oxidativo. Quercetina estabiliza radicales libres, induce defensas antioxidantes y disminuye la actividad de enzimas pro-oxidantes, lo que contribuye a una prevención en la lipoperoxidación, oxidación de LDL, oxidación de

proteínas y ADN (Adewole *et al.*, 2007). Quercetina ejerce también una serie de efectos beneficiosos sobre el metabolismo, con relevancia frente a enfermedades cardiovasculares, diabetes, obesidad y síndrome metabólico (Kelly, 2011). Quercetina tiene un efecto anti-obesidad, anti-diabético (Arias *et al.*, 2014) y protector contra el síndrome metabólico, ya que reduce los niveles basales de glucosa e insulina, mejora la tolerancia a la glucosa, preserva la función e integridad de células β , reduce la presión sistólica y adipocidad visceral (Adewole *et al.*, 2007; Kobori *et al.*, 2009 citado por Kelly, 2011; Youl *et al.*, 2010; Panchal *et al.*, 2012). En ratones alimentados con dieta alta en grasas, colesterol y azúcar, quercetina previene el aumento de grasa visceral, colesterol, triglicéridos, insulina y glucosa en plasma (Kobori *et al.*, 2011 citado por Kelly, 2011). En humanos, disminuye la presión sanguínea, niveles de colesterol y de LDL en sujetos con sobrepeso y obesidad, existiendo una correlación negativa entre el consumo de quercetina y la concentración de colesterol total y LDL (Egert *et al.*, 2009 citado por Kelly, 2011). También ha demostrado tener efectos beneficiosos sobre el sistema cardiovascular, previniendo el desarrollo de hipertrofia cardíaca inducida por sobrecargas de presión en ratas (Han *et al.*, 2009 citado por Kelly, 2011) y en humanos inhibe la agregación plaquetaria y formación de trombos (Hubbard *et al.*, 2004 citado por Kelly, 2011). En conejos, reduce la formación de placas ateroscleróticas en aorta y carótida (Juzwiak *et al.*, 2005 citado por Kelly, 2011).

Nutrigenómica

La nutrigenómica es la ciencia que estudia la interacción existente entre los componentes de la dieta y el genoma, en donde los componentes de la dieta pueden alterar la expresión génica directa o indirectamente. Esta modulación génica por medio de la dieta puede alterar la incidencia, progresión y/o severidad de ciertas enfermedades (Marti *et al.*, 2005).

Son muchos los genes que codifican para las proteínas que median y controlan los procesos biológicos y fisiopatológicos de los distintos organismos. Así, en los últimos años ha ganado gran importancia el estudio de los factores que regulan la expresión génica y su relación con el desarrollo de enfermedades crónicas (Puigserver y Spiegelman, 2003). La regulación de estos programas biológicos se realiza a través de distintos niveles: epigenético, transcriptómico, proteómico y metabólico (Sanhueza y Valenzuela, 2012).

Uno de ellos es a nivel de la transcripción génica, la cual involucra una serie de complejos proteicos que son necesarios para una adecuada regulación de la transcripción, donde toma importancia el reconocimiento y estudio de los factores de transcripción, como también sus co-activadores y co-represores (Puigserver y Spiegelman, 2003).

Genes relacionados con un posible efecto protector de la quercetina frente a una dieta alta en colesterol

PPAR γ

El receptor activado por proliferadores de peroxisomas gamma (PPAR γ) es un receptor hormonal nuclear que cumple un rol importante en la adipogénesis, resistencia a insulina, inflamación, balance energético y biosíntesis de lípidos (Grygiel-Górniak, 2014; Beekmann *et al.*, 2015). En humanos y roedores PPAR γ se expresa principalmente en tejido adiposo y su activación facilita el depósito de lípidos en este tejido, pero en estados de ayuno permite la liberación de ácidos grasos y su subsecuente oxidación (Savage, 2005). También disminuye los niveles de glucosa al aumentar la expresión de transportadores de glucosa (GLUT 1 y 4) y al incrementar la captura de glucosa hepática y muscular. Disminuye niveles de triglicéridos, la expresión de proteínas desacoplantes (UCPs) y niveles de colesterol HDL en tejido adiposo, muscular y hepático (Grygiel-Górniak, 2014). Mutaciones que causan pérdida de su función generan resistencia a insulina e hipertensión severa en humanos (Fuentes *et al.*, 2013). También es importante para la diferenciación de los adipocitos, demostrándose que ratones “knockout” para PPAR γ presentan hipocelularidad en tejido adiposo (Fuentes *et al.*, 2013) y son más susceptibles a desarrollar dislipemia, esteatosis hepática y resistencia a insulina al consumir dietas altas en grasa (Savage, 2005).

PGC-1 α

El co-activador de PPAR γ 1 alfa (PGC-1 α) es un co-activador transcripcional de una gran variedad de receptores nucleares involucrados en diversos procesos metabólicos, promoviendo principalmente la biogénesis y función mitocondrial (Chen *et al.*, 2009a), la expresión de genes que participan en la cadena de transporte de electrones, β -oxidación de ácidos grasos y ciclo de Krebs (Puigserver y Spiegelman, 2003; Lin *et al.*, 2005). La

expresión de PGC-1 α en el hígado es relativamente baja, pero en situaciones de ayuno ésta incrementa y estimula la gluconeogénesis al activar a factores de transcripción, como por ejemplo FOXO1, el cual promueve la expresión de genes que codifican para enzimas gluconeogénicas (García *et al.*, 2008). Así, la expresión de PGC-1 α estaría fuertemente relacionada a las necesidades metabólicas (Chen *et al.*, 2009a) y la regulación metabólica ejercida la realiza a través de la co-activación de diversos factores de transcripción, como PPAR γ , FOXO1 y UCP-2. Debido a esto, es considerado como un interruptor molecular (Lin *et al.*, 2005; Ronnebaum y Patterson, 2010). La expresión de PGC-1 α disminuye en músculo y tejido adiposo de ratas y ratones al ingerir dietas altas en grasa saturada. Debido a las funciones de PGC-1 α sobre la función mitocondrial y la producción de energía, se ha sugerido que podría ser un blanco para drogas utilizadas en el tratamiento de obesidad y diabetes (Puigserver y Spiegelman, 2003).

FOXO1

Las proteínas “forkhead box” (FOXOs) son factores de transcripción que promueven la transcripción de genes involucrados en resistencia al estrés, muerte y sobrevivencia celular (Ronnebaum y Patterson, 2010), entre otras funciones. Sus efectos son tejido-específicos, por lo que son muy variables y no siempre generan efectos positivos (Glauser y Schlegel, 2007; Kousteni, 2011). Así, los factores FOXOs podrían estar involucrados en la progresión de diabetes, y un sin número de otras enfermedades, en donde, en el caso específico de diabetes, la adaptación compensatoria que debiesen tener las células β dependen de los factores FOXOs y su adecuada regulación (Glauser y Schlegel, 2007).

La proteína “forkhead box” subclase O1 (FOXO1) se expresa mayormente en hígado, páncreas, tejido adiposo y músculo esquelético (Kousteni, 2011). Se activa bajo condiciones de hipoglicemia (Morris *et al.*, 2015) y bajo condiciones de ayuno estimula la gluconeogénesis (García *et al.*, 2008). Regula la homeostasis metabólica en distintos niveles, siendo un regulador negativo de sensibilidad a insulina en células β , hepatocitos y adipocitos (Kousteni, 2011). Controla tres aspectos fundamentales del metabolismo de glucosa: inhibiendo la producción de glucosa en hígado, disminuyendo la producción de insulina y la sensibilidad a ella, además de suprimir la proliferación y función de las células β (Kousteni, 2011). Su sobre-expresión en algunos tejidos se relaciona con apoptosis

(Ronnebaum y Patterson, 2010). Sin embargo, FOXO1, dependiendo del tejido en el cual se localice, puede tener efectos protectores o negativos sobre la resistencia a insulina, diabetes y función vascular (Kousteni, 2011).

FOXO3

La proteína “forkhead box” subclase O3 (FOXO3) promueve efectos antiinflamatorios y antioxidantes y está involucrado en señales de muerte celular y sobrevivencia (Glauser y Schlegel, 2007; Ronnebaum y Patterson, 2010, Morris *et al.*, 2015). Se expresa mayormente en cerebro, corazón, riñones y bazo (Morris *et al.*, 2015). Controla la producción de citoquinas, disminuye la inflamación (Kousteni, 2011) y también regula la transcripción de un removedor de peróxido de hidrógeno mitocondrial, la peroxiredoxina III, el cual previene la apoptosis y posee un rol cardioprotector (Ronnebaum y Patterson, 2010). En obesidad inducida por dietas altas en grasa se genera una disfunción de los cardiomiocitos, lo que genera un aumento en la expresión de FOXO3 (Relling *et al.*, 2006). La sobre-expresión de este factor en corazón reduce el desarrollo de hipertrofia cardíaca (Ronnebaum y Patterson, 2010).

UCP-2

La proteína desacoplante 2 (UCP-2) controla el potencial de membrana mitocondrial y consecuentemente, regula la síntesis de ATP y también, la producción de EROs por la mitocondria (Laskowski y Russell, 2008). Al desacoplar la β -oxidación de la síntesis de ATP (Powell *et al.*, 2007) disminuye el potencial de membrana mitocondrial y con ello reduce la producción de EROs y superóxidos (Lin *et al.*, 2005; Dalgaard, 2011). Se localiza en múltiples tejidos incluyendo grasa parda, músculo esquelético, corazón, riñones, páncreas, cerebro e hígado (Aguilar, 2002). UCP-2 puede ser activada también por ácidos grasos, glucosa y lípidos, de esta manera su expresión puede ser regulada por condiciones de ayuno, por proliferadores de peroxisomas (como PPAR γ), PGC-1 α e hiperglicemia, lo que demuestra un rol conectado con la disponibilidad de combustibles como sustrato (Lin *et al.*, 2005; Bjorndal *et al.*, 2011; Dalgaard, 2011). UCP-2 se sobre-regula en respuesta a hormonas tiroideas, frío, agonistas β 3-adrenérgicos y dietas altas en grasa (Dalgaard, 2011). Específicamente en páncreas es inducida por dietas altas en grasa y azúcar (Dalgaard, 2011) y en tejido adiposo su expresión aumenta por exposición al frío y por acción de hormonas

tiroideas (Mahadik *et al.*, 2012). Su actividad es tejido-específica, por ejemplo, su sobre-expresión en tejido pancreático tendría un efecto deletéreo sobre las células β ya que al limitar la producción de ATP, se ve reducida la secreción de insulina (Dalgaard, 2011), mientras que en tejido adiposo la disminución en su expresión se asocia a obesidad y diabetes al disipar el potencial de membrana mitocondrial (clave para síntesis de ATP) y aumentar el gasto energético (Mahadik *et al.*, 2012). Ratas con falla cardíaca presentan mayor expresión de UCP-2 en miocardio, correlacionándose con mayor nivel de EROs y grado de tumefacción mitocondrial (Huang *et al.*, 2016).

HO-1

La hemo-oxigenasa 1 es una enzima que en reacción genera CO y bilirrubina, los cuales poseen un rol antiinflamatorio y antioxidante, respectivamente (Son *et al.*, 2013). (Romacho *et al.*, 2014). La HO-1 puede ser inducida por una variedad de estímulos fisiológicos (ej.: hipoxia) y patológicos, como la exposición a toxinas, metales pesados, citoquinas, luz ultravioleta, estrés oxidativo, entre otros (Hosick y Stec, 2012; Romacho *et al.*, 2014). La HO-1 puede ser inducida por estímulos antioxidantes como quercetina (Panchal *et al.*, 2012) y pro-oxidantes (Hosick y Stec, 2012). El aumento en su actividad protege contra el estrés oxidativo que se genera en diversas patologías (Romacho *et al.*, 2014). La inducción crónica y sistémica de HO-1 corrige la hiperglicemia e hiperinsulinemia en ratas (Hosick y Stec, 2012). Debido a que la expresión de HO-1 puede ser inducida tanto por la *noxa* como por el agente protector, es que su rol en la fisiopatología de diversas enfermedades es controversial (Huang *et al.*, 2013). Es secretado primordialmente por adipocitos disminuyendo la inflamación en tejido adiposo, la ganancia de peso y grasa corporal en ratas obesas (Romacho *et al.*, 2014). En humanos, HO-1 aumenta en tejido adiposo subcutáneo y visceral de personas obesas y aumenta sus niveles séricos en obesos y personas con diabetes tipo II (Romacho *et al.*, 2014).

HIPÓTESIS

La quercetina tiene un rol citoprotector ante las alteraciones oxidativas y metabólicas inducidas por una dieta alta en colesterol, atenuando o previniendo las alteraciones sobre la expresión de PPAR γ , PGC-1 α , FOXO1, FOXO3, UCP-2 y HO-1.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de la suplementación con quercetina sobre la expresión de PPAR γ , PGC-1 α , FOXO1, FOXO3, UCP-2 y HO-1 en tejido pancreático, cardíaco, adiposo epididimal y adiposo subcutáneo de ratas alimentadas con una dieta alta en colesterol.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar el cambio que se produce en la expresión de PPAR γ , PGC-1 α , FOXO1, FOXO3, UCP-2 y HO-1 en tejido pancreático, cardíaco, adiposo epididimal y adiposo subcutáneo de ratas tratadas con una dieta control, dieta control suplementada con quercetina, dieta alta en colesterol y dieta alta en colesterol suplementada con quercetina.
2. Determinar la biosíntesis de insulina en tejido pancreático de ratas tratadas con una dieta control, dieta control suplementada con quercetina, dieta alta en colesterol y dieta alta en colesterol suplementada con quercetina a través de inmunohistoquímica.

MATERIALES Y MÉTODOS

Grupos experimentales

Se utilizaron 4 grupos de ratas machos Wistar (150-200g, 5 semanas), los que fueron alimentados isocalóricamente y ajustando cada semana la cantidad de alimento a la ingerida por el grupo con menor consumo. Las ratas fueron alimentadas durante 4 semanas con las siguientes dietas prefabricadas (TestDiet, St. Louis, Misuri, EEUU):

- Grupo 1 (n=8): dieta control (TestDiet 58R4) con 17,3% proteína, 4,3% grasa, 4,8% fibra, 67% carbohidratos y 0% colesterol.
- Grupo 2 (n=6): dieta control (TestDiet 58R4) suplementada con 0,5% de quercetina.
- Grupo 3 (n=9): dieta alta en colesterol (TestDiet 58R6) con 20,2% proteína, 20,1% grasa, 5,6% fibra, 45,2% carbohidratos y 1,25% colesterol.
- Grupo 4 (n=8): dieta alta en colesterol (TestDiet 58R6) suplementada con 0,5% de quercetina.

Al final del estudio las ratas se anestesiaron y fueron sacrificadas por exanguinación. Posteriormente se extrajeron las muestras de tejido pancreático, cardíaco, grasa subcutánea y epididimal. Una porción de estos tejidos fue incubada con ARN “later”/-80°C/48h para análisis de la expresión génica por PCR cuantitativa (qPCR, por sus siglas en inglés “quantitative polymerase chain reaction”) y la otra porción fue fijada en paraformaldehído 4% para su posterior análisis inmunohistoquímico. El procedimiento fue autorizado por el “Comité de Bioética sobre investigación en animales” de la Facultad de Medicina, U. de Chile, número de certificación CBA #0586 FMUCH.

Cuantificación de la expresión génica

Extracción de ARN

Se realizó siguiendo las indicaciones recomendadas por el fabricante, usando TRIzol (Invitrogen®, Carlsbad, CA, USA), reactivo que permite la extracción del ARN, manteniendo su integridad durante la homogenización del tejido.

- Preparación de la muestra: Se utilizaron 50 mg de tejido por cada ml de TRIzol® y se homogeneizaron durante 30 segundos en frío para evitar la degradación del ARN. Se descartó la fase lipídica de los homogeneizados de muestras grasas luego de la centrifugación a 12000g/4°C/10min y las muestras fueron almacenadas a -80°C.

- Separación de fases: Muestras fueron incubadas con TRIzol® a temperatura ambiente/5min para permitir la completa disociación de los complejos de nucleoproteínas, luego se adicionaron 0,2 ml de cloroformo por cada ml de TRIzol® utilizado. Muestras fueron agitadas suavemente, manteniéndolas a temperatura ambiente/3-4min y posteriormente, centrifugadas a 12000g/4°C/15min. Se obtuvieron 2 fases, una roja que contenía el ADN y proteínas, y una fase incolora que contenía el ARN, de las que sólo se extrajo la fase incolora.

- Precipitación de ARN: Se adicionaron 0,5 ml de isopropanol al ARN para que precipitara en forma de “pellet”. Luego las muestras fueron mezcladas suavemente, incubadas a temperatura ambiente/10min y finalmente centrifugadas a 12000g/4°C/10min.

- Lavado de ARN: Se removieron los sobrenadantes de los tubos, dejando sólo los “pellets” de ARN, y se agregó 1 ml de etanol al 75% a cada muestra. Las muestras fueron agitadas con un vórtex y centrifugadas a 7500g/4°C/5min. El etanol fue removido con la ayuda de una pipeta y luego se mantuvieron los “pellets” a temperatura ambiente para permitir la evaporación del etanol restante.

- Re-suspensión del ARN: una vez evaporado el etanol se agregaron 20 µl de agua libre de nucleasas e incubaron en baño seco a 60°C/10-15min. Las muestras fueron almacenadas a -80°C.

Cuantificación de ARN

Se utilizó el equipo de espectrofotometría Infinite® 200PRO NanoQuant (Tecan®, Männedorf, Suiza) para medir la concentración y pureza del ARN extraído usando el ratio A260/A280. Se realizaron las diluciones necesarias para obtener muestras con una concentración de ARN de 2000 ng/µl.

Síntesis de ADNc a partir de ARN

La síntesis de ADN complementario (ADNc) fue efectuada mediante la enzima “Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase” (M-MLV RT). Se agregaron 2 μ l de Oligo(dT)15 Primer (500 μ g/ml, C110A, Promega®) a cada muestra, considerando también un control negativo, y fueron incubadas a 70°C/5min en el termociclador T Personal (Biometra®). Se preparó una mezcla de los siguientes dNTPs a 5 mM: dATP 100 mM (BM-0652), dCTP 100 mM (BM-0653), dGTP 100 mM (BM-0654) y dTTP 100 mM (BM-0655) todos de la marca Winkler®. Se preparó también una solución madre, que por cada muestra utilizada debía contener los siguientes componentes, la mayoría de Promega®: 5 μ l de M-MLV RT 5X Buffer (M531A), 2,5 μ l de la mezcla de dNTPs, 0,675 μ l de “Recombinant RNasin” (40u/ μ l, N251A) un inhibidor de ribonucleasas, 1 μ l de M-MLV RT (200u/ μ l, M170A) y 3,875 μ l de agua libre de nucleasas. Se agregaron 13 μ l de la solución madre a cada muestra de ARN utilizada. Las muestras fueron incubadas a 42°C/1h en el termociclador T Personal y almacenadas a -20 °C.

Determinación de la expresión génica mediante qPCR

Se preparó otra solución madre con los siguientes componentes: 6,25 μ l de 2X Brilliant II SYBR® Green QPCR Master Mix (600828-51, Agilent®), 0,5 μ l del “primer” correspondiente y 3,75 μ l de agua libre de nucleasas. Los “primers” fueron diseñados en la plataforma de “The National Center for Biotechnology Information” (NCBI) llamada “Primer-BLAST”, sintetizados por IDT®. Se diseñaron “primers” para los siguientes genes: PPAR γ , PGC-1 α , FOXO1, FOXO3, UCP-2, HO-1 y β -actina (ACTB), todos a 200nM, y gliceraldehído-3-fosfatodeshidrogenada (GAPDH) a 400 nM. A cada reacción de PCR se le agregaron 2 μ l de la muestra de ADNc (800ng/ μ l) y 12,5 μ l de la solución madre. Las muestras fueron agitadas suavemente y luego se midieron en el equipo de “Real Time-PCR” Mx3000P (Agilent®).

Análisis de la expresión génica

Se cuantificó la expresión de los genes a través de PCR en tiempo real utilizando el método de Pfaffl, un modelo matemático de cuantificación relativa que compara la expresión del gen de interés (“target”) con la expresión de un gen constitutivo o de referencia (“ref”), los cuales fueron GAPDH para tejido cardíaco y pancreático y ACTB para tejido adiposo epididimal y subcutáneo. El método de Pfaffl utiliza la siguiente fórmula:

$$ratio = \frac{(E_{target})^{\Delta CP_{target} (control-sample)}}{(E_{ref})^{\Delta CP_{ref} (control-sample)}}$$

donde E es la eficiencia y ΔCP la diferencia de los Ct (“Cycle threshold”) obtenidos con la curva estándar para el “primer” y el PCR en tiempo real, respectivamente. Los datos obtenidos fueron sometidos a un test ANOVA de dos vías para determinar los efectos principales, es decir el efecto de la dieta HC y el efecto de quercetina, y la interacción entre ellos. Luego los datos fueron sometidos a un “post hoc” de Bonferroni. Todos los análisis estadísticos se desarrollaron con el software Graphpad Prism 6.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA).

Inmunohistoquímica

Se realizó la detección de insulina en tejido pancreático a través de inmunohistoquímica. Para esto se realizaron cortes transversales seriados del tejido de 10 μm , los cuales fueron fijados con paraformaldehído 4% y parafina e incubados a 4°C previo al análisis inmunohistoquímico.

Desparafinación y recuperación antigénica

Las muestras fueron incubadas a 60°C/90min y sumergidas en el siguiente tren hidratante: xilol I/5min, xilol II/5min, etanol 100% I/3min, etanol 100% II/3min, etanol 96% I/3min, etanol 96% II/3min, etanol 70%/3min, etanol 50%/3min, etanol 25%/3min, agua destilada I/5min y agua destilada II/5min. Las muestras fueron sumergidas en ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) tibio (10mM, pH 8) e incubadas en una vaporera a 96°C/20min.

Reconocimiento y detección antigénica

Las muestras fueron incubadas a temperatura ambiente/5min y lavadas con agua bidestilada/3min/2veces. Se realizaron lavados con PBS 1X (5min/2veces) y con PBS-tritón 0,1% (5min/1vez). Se secó el tejido y se delimitó con lápiz hidrófobo. Luego las muestras fueron incubadas con la solución bloqueadora (“Dako protein block”) por 10 min y durante la noche se dejaron en humedad a 4°C, con 50 µl del anticuerpo primario de cobayo anti-insulina (ab7842, Abcam, UK) dilución 1:100 en PBS-tritón 0,1%. Posteriormente, las muestras fueron lavadas con PBS-tritón 0,1% (5min/3veces) e incubadas a temperatura ambiente durante 1h (en oscuridad y humedad) con 50 µl del anticuerpo secundario de cabra anti-cobayo (Alexa Fluor® 488, A11073, Thermofisher, USA) dilución 1:1000 en PBS-tritón 0,1%. Las muestras fueron lavadas con PBS-tritón 0,1% (3min/3veces) e incubadas a temperatura ambiente durante 10 segundos con 50 µl de 0,1 µg/ml DAPI (4',6-diamino-2-fenilindol), un marcador fluorescente que se une a secuencias de ADN. Luego las muestras fueron lavadas con PBS-Tritón 0,1% (2 min/2 veces), PBS 1X (1min/2veces) y con flujo de agua bidestilada. Se incubaron con medio de montaje DAKO® (1h a temperatura ambiente, en humedad y oscuridad). Posteriormente, las muestras fueron observadas mediante microscopía de fluorescencia (microscopio Zeiss®, modelo Scope A1) y fotografiadas con cámara digital (Canon EOS Rebel T3). Las imágenes fueron procesadas con el programa AxioVision® SE64 (Carl Zeiss Microscopy, LLC, Thornwood, NY, USA) mediante el cual se midió la señal fluorescente de las imágenes y el área de 6-8 secciones por muestra. La fluorescencia fue normalizada al tamaño del islote, del tejido y del fondo.

Los datos obtenidos a través de las inmunofluorescencias fueron sometidos a un test ANOVA de dos vías y un “post hoc” de Bonferroni, para estimar los efectos principales y la interacción entre ellos.

RESULTADOS

Tabla Nro. 1: Efecto de la alimentación con una dieta alta en colesterol y suplementada con quercetina en ratas sobre la modulación de la expresión de PPAR γ , PGC-1 α y FOXO1 (expresión relativa) en tejido pancreático.

Genes	C (n=8)	CQ (n=6)	HC (n= 9)	HCQ (n= 8)	Valor p		
					HC	SQ	HCxSQ
PPAR γ	1,000 \pm 0,134	0,301 \pm 0,024	1,683 \pm 0,210	1,146 \pm 0,029	<0,0001	0,0005	0,6061
PGC1 α	1,000 \pm 0,290	2,698 \pm 0,616	1,925 \pm 0,489	3,326 \pm 0,483	0,1321	0,0061	0,7748
FOXO1	1,000 \pm 0,178	0,163 \pm 0,038	1,033 \pm 0,082	0,038 \pm 0,008	0,7319	<0,0001	0,5545

C= dieta control, CQ= dieta control con 0,5% quercetina, HC= dieta dieta alta en colesterol, HCQ= dieta alta en colesterol con 0,5% quercetina. HC= efecto dieta HC, SQ= efecto suplementación con quercetina, HCxSQ= interacción entre dieta HC y suplementación con quercetina.

PPAR γ = receptor activado proliferador de peroxisomas gama, PGC-1 α = coactivador del receptor activado proliferador de peroxisomas gama 1 alfa y FOXO1= "Forkhead" caja subclase O1, por sus siglas en inglés. Los valores son expresados como promedio \pm SE, o error estándar.

La dieta HC sólo aumentó la expresión de **PPAR γ** (p <0,0001) mientras que la suplementación con Q modifica la expresión de PPAR γ , PGC-1 α y FOXO1 (p = 0,0005). La dieta HC no tuvo efecto sobre la expresión de **PGC-1 α** en páncreas, sin embargo la suplementación con Q aumentó la expresión de PGC-1 α en la dieta C y HC (p <0,0061). La dieta HC no tuvo efecto sobre la expresión pancreática de **FOXO1**, sin embargo la suplementación con Q disminuyó la expresión de FOXO1 en la dieta C y H (p <0,0001) (**Tabla Nro. 1**). No hubo interacción entre la dieta HC y la suplementación con Q sobre la expresión de los genes medidos en tejido pancreático.

Tabla Nro. 2: Efecto de la alimentación con una dieta alta en colesterol y suplementada con quercetina en ratas sobre la modulación de la cantidad de insulina (URF/área) presente en tejido pancreático.

Insulina	C	CQ	HC	HCQ	Valor p		
					HC	SQ	HCxSQ
Insulina	4,168 ± 0,295	6,363 ± 0,803	2,838 ± 0,295	6,823 ± 0,242	0,1375	< 0,0001	0,2732

C= dieta control, CQ= dieta control con 0,5% quercetina, HC= dieta alta en colesterol, HCQ= dieta alta en colesterol con 0,5% quercetina. HC= efecto dieta HC, SQ= efecto suplementación con quercetina, HCxSQ= interacción entre dieta y suplementación con quercetina. URF= unidad relativa de fluorescencia.

Los valores son expresados como promedio ± SE, o error estándar.

La dieta HC no tuvo efecto sobre la cantidad de insulina presente en páncreas. Sin embargo la suplementación con Q, tanto en la dieta C como la dieta HC, aumentó la cantidad de insulina ($p < 0,0001$). No hubo interacción entre el efecto dieta HC y la suplementación con quercetina (**Tabla Nro. 2**). El efecto de la suplementación con Q puede ser apreciado en la **Figura Nro. 1** que muestra la cantidad de insulina en tejido pancreático de los distintos grupos experimentales.

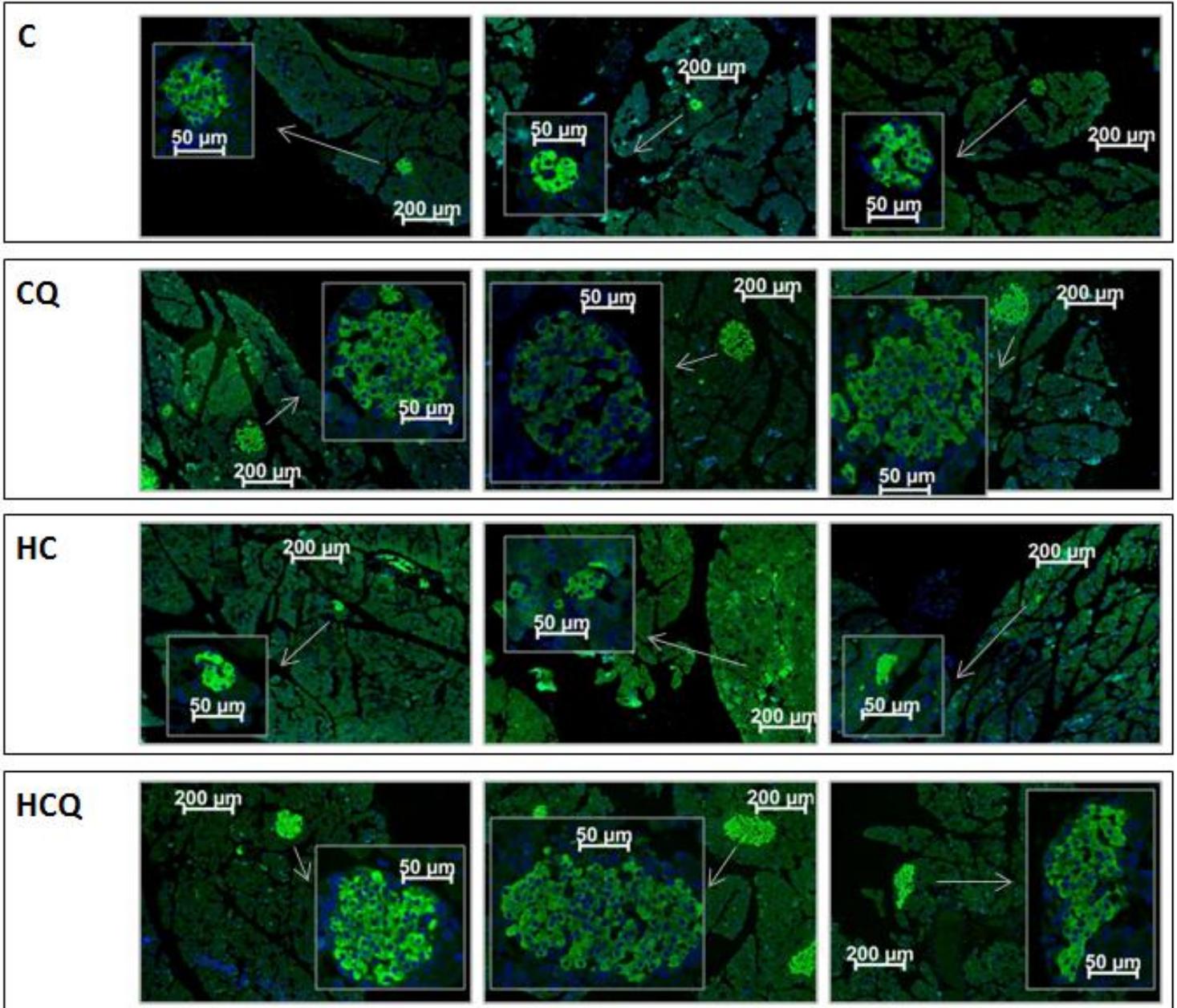


Figura Nro. 1: Inmunotinción para insulina en cortes histológicos de tejido pancreático, utilizando un anticuerpo anti-insulina y FITC, además de inmunotinción de los núcleos celulares a través de DAPI. Los cortes histológicos fueron analizados por microscopía de fluorescencia (microscopio Zeiss®, modelo Scope A1) y fotografiados con cámara digital (Canon EOS Rebel T3). C= dieta control, CQ= dieta control con 0,5% quercetina, HC= dieta alta en colesterol, HCQ= dieta alta en colesterol con 0,5% quercetina. Magnificación 10X, inserción 40X.

Tabla Nro. 3: Efecto de la alimentación con una dieta alta en colesterol y suplementada con quercetina en ratas sobre la modulación de la expresión génica de PPAR γ , PGC-1 α , FOXO1, FOXO3, UCP-2 y HO-1 (expresión relativa) en tejido adiposo epididimal.

Genes	C (n=8)	CQ (n=6)	HC (n= 9)	HCQ (n= 8)	Valor p		
					HC	SQ	HCxSQ
PPAR γ	1,000 \pm 0,106	0,836 \pm 0,183	1,665 \pm 0,101	0,939 \pm 0,238	0,0308	0,0131	0,1092
PGC1 α	1,000 \pm 0,068 ^{ab}	0,883 \pm 0,047 ^{ab}	0,732 \pm 0,033 ^a	1,108 \pm 0,066 ^b	0,7643	0,0781	0,0015
FOXO1	1,000 \pm 0,112 ^a	1,145 \pm 0,423 ^{ab}	1,717 \pm 0,114 ^b	0,934 \pm 0,082 ^a	0,1115	0,0529	0,0071
FOXO3	1,000 \pm 0,231	1,828 \pm 0,134	1,073 \pm 0,084	2,177 \pm 0,241	0,2920	<0,0001	0,4870
UCP-2	1,000 \pm 0,056	1,400 \pm 0,070	0,741 \pm 0,124	1,108 \pm 0,120	0,0015	<0,0001	0,7144
HO-1	1,000 \pm 0,084	0,889 \pm 0,239	1,471 \pm 0,056	1,140 \pm 0,052	0,0018	0,0390	0,2861

C= dieta control, CQ= dieta control con 0,5% quercetina, HC= dieta alta en colesterol, HCQ= dieta alta en colesterol con 0,5% quercetina. HC= efecto dieta, SQ= efecto suplementación con quercetina, HCxSQ= interacción entre dieta y suplementación con quercetina.

PPAR γ = receptor activado proliferador de peroxisomas gama, PGC-1 α = coactivador del receptor activado proliferador de peroxisomas gama 1 alfa, FOXO1= "Forkhead" caja subclase O1, FOXO3= "Forkhead" caja subclase O3, UCP-2= proteína desacoplante 2 y HO-1= hemo-oxigenasa 1, por sus siglas en inglés.

a y b indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$). Los valores son expresados como promedio \pm SE, o error estándar.

La dieta HC aumentó la expresión de **PPAR γ** y de **HO-1** ($p = 0,0308$ y $0,0018$, respectivamente) y la suplementación con Q disminuyó su expresión respecto a las dietas no suplementadas con Q ($p = 0,0131$ y $0,0390$, respectivamente). La dieta HC aumentó la expresión de **FOXO1** en un 72% y la suplementación con Q sólo tuvo efecto cuando se administra con HC ($p = 0,0071$), disminuyendo la expresión de FOXO1 en un 46% y re-estableciendo de esta forma los niveles de ARNm a la situación con dieta C. La dieta HC no tuvo efecto sobre la expresión de **PGC-1 α** y la suplementación con Q sólo tuvo efecto cuando se administró con la dieta HC ($p = 0,0015$), aumentando su expresión en un 51%. La dieta HC no tuvo efecto sobre la expresión de **FOXO3**, sin embargo la suplementación con Q en ambas dietas aumentó la expresión de FOXO3 respecto a las dietas no suplementadas ($p < 0,0001$). La dieta HC disminuyó la expresión de **UCP-2** ($p = 0,0015$) y la suplementación con Q aumentó su expresión respecto a las dietas no suplementadas con Q ($p < 0,0001$) (**Tabla Nro. 3**).

Tabla Nro. 4: Efecto de la alimentación con una dieta alta en colesterol y suplementada con quercetina en ratas sobre la modulación de la expresión génica de PPAR γ , PGC-1 α , FOXO1, FOXO3, UCP-2 y HO-1 (expresión relativa) en tejido adiposo subcutáneo.

Genes	C (n=8)	CQ (n=6)	HC (n= 9)	HCQ (n= 8)	Valor p		
					HC	SQ	HCxSQ
PPAR γ	1,000 \pm 0,269	1,139 \pm 0,336	0,473 \pm 0,066	0,416 \pm 0,068	0,0055	0,8409	0,6309
PGC1 α	1,000 \pm 0,101	0,733 \pm 0,044	0,454 \pm 0,038	0,322 \pm 0,101	0,0007	0,0889	0,5454
FOXO1	1,000 \pm 0,093 ^a	0,928 \pm 0,106 ^{ab}	0,587 \pm 0,058 ^b	1,150 \pm 0,071 ^a	0,2632	0,0056	0,0005
FOXO3	1,000 \pm 0,200	3,264 \pm 0,661	1,491 \pm 0,441	2,976 \pm 0,317	0,8000	0,0003	0,3402
UCP-2	1,000 \pm 0,123	1,001 \pm 0,058	0,554 \pm 0,059	0,877 \pm 0,047	0,0040	0,0787	0,0809
HO-1	1,000 \pm 0,161 ^a	2,164 \pm 0,486 ^b	3,303 \pm 0,137 ^c	1,938 \pm 0,104 ^b	0,0003	0,6735	<0,0001

C= dieta control, CQ= dieta control con 0,5% quercetina, HC= dieta alta en colesterol, HCQ= dieta alta en colesterol con 0,5% quercetina. HC= efecto dieta, SQ= efecto suplementación con quercetina, HCxSQ= interacción entre dieta y suplementación con quercetina.

PPAR γ = receptor activado proliferador de peroxisomas gama, PGC-1 α = coactivador del receptor activado proliferador de peroxisomas gama 1 alfa, FOXO1= "Forkhead" caja subclase O1, FOXO3= "Forkhead" caja subclase O3, UCP-2= proteína desacoplante 2 y HO-1= hemo-oxigenasa 1, por sus siglas en inglés.

a, b y c indican diferencias estadísticamente significativas (p <0,05). Los valores son expresados como promedio \pm SE, o error estándar.

La dieta HC disminuyó la expresión de **PPAR γ** (p = 0,0055) y la suplementación con Q no tuvo efecto sobre su expresión. La dieta HC disminuyó la expresión de **PGC-1 α** y de **UCP-2** (p = 0,0007 y 0,0040, respectivamente) y la suplementación con Q no tuvo efectos sobre sus expresiones. La dieta HC disminuyó la expresión de **FOXO1** en un 41% en ausencia de Q. La suplementación con Q sólo tuvo efecto cuando se administró con la dieta HC (p = 0,0005), aumentado su expresión en un 96%. La suplementación con Q en la dieta HC previene la disminución en la expresión de FOXO1 inducida por HC, re-estableciendo de esta forma el nivel de ARNm a la situación con dieta C. La dieta HC no tuvo efecto sobre la expresión de **FOXO3**, sin embargo la suplementación con Q aumentó la expresión de FOXO3 (p = 0,0003). La dieta HC aumentó la expresión de **HO-1** en un 230% (p = 0,0003) en ausencia de Q. La suplementación con Q modula la expresión de HO-1 en forma distinta de acuerdo a la dieta (p <0,0001). La suplementación con Q aumentó la expresión de HO-1 en un 116% al ser administrada con la dieta C y disminuyó su expresión en un 41% con la dieta HC. Sin embargo, la suplementación con Q en la dieta HC no previno completamente el aumento en la expresión de HO-1 inducido por HC (**Tabla Nro. 4**).

Tabla Nro. 5: Efecto de la alimentación con una dieta alta en colesterol y suplementada con quercetina en ratas sobre la modulación de la expresión génica de PPAR γ , PGC-1 α , FOXO1, FOXO3, UCP-2 y HO-1 (expresión relativa) en tejido cardíaco.

Genes	C (n=8)	CQ (n=6)	HC (n= 9)	HCQ (n= 8)	Valor p		
					HC	SQ	HCxSQ
PPAR γ	1,000 \pm 0,072	1,078 \pm 0,145	1,332 \pm 0,040	1,120 \pm 0,093	0,0562	0,4772	0,1314
PGC1 α	1,000 \pm 0,103 ^{ab}	0,847 \pm 0,215 ^{ab}	0,652 \pm 0,081 ^a	1,227 \pm 0,097 ^b	0,8927	0,0806	0,0044
FOXO1	1,000 \pm 0,083 ^a	2,264 \pm 0,676 ^{ab}	5,382 \pm 0,469 ^c	3,570 \pm 0,383 ^b	<0,0001	0,5297	0,0015
FOXO3	1,000 \pm 0,032 ^a	4,624 \pm 1,297 ^b	3,296 \pm 0,834 ^{ab}	2,424 \pm 0,138 ^{ab}	0,9467	0,0592	0,0027
UCP-2	1,000 \pm 0,075 ^a	1,237 \pm 0,231 ^{ab}	1,640 \pm 0,209 ^b	0,945 \pm 0,112 ^a	0,3023	0,1779	0,0093
HO-1	1,000 \pm 0,077	1,592 \pm 0,142	0,566 \pm 0,026	1,354 \pm 0,214	0,0189	0,0001	0,4112

C= dieta control, CQ= dieta control con 0.5% quercetina, HC= dieta alta en colesterol, HCQ= dieta alta en colesterol con 0.5% quercetina. D= efecto dieta, SQ= efecto suplementación con quercetina, DxSQ= interacción entre dieta y suplementación con quercetina.

PPAR γ = receptor activado proliferador de peroxisomas gama, PGC-1 α = coactivador del receptor activado proliferador de peroxisomas gama 1 alfa, FOXO1= "Forkhead" caja subclase O1, FOXO3= "Forkhead" caja subclase O3, UCP-2= proteína desacoplante 2 y HO-1= hemo-oxigenasa 1, por sus siglas en inglés.

a, b y c indican diferencias estadísticamente significativas (p <0,05). Los valores son expresados como promedio \pm SE, o error estándar.

Tanto la dieta HC como la suplementación con Q no tuvieron ningún efecto sobre la expresión de **PPAR γ** en tejido cardíaco. La dieta HC no tuvo efecto sobre la expresión de **PGC-1 α** y la suplementación con Q moduló su expresión en forma distinta de acuerdo a la dieta (p = 0,0044), aumentado la expresión de PGC-1 α en un 88% con la dieta HC y sin efectos en la dieta C. La dieta HC aumentó la expresión de **FOXO1** en un 438% (p<0,0001). La suplementación con Q moduló la expresión de FOXO1 en forma distinta de acuerdo a la dieta (p = 0,0015), sin efecto con la dieta C y disminuyendo su expresión en un 34% con la dieta HC. Sin embargo, la suplementación con Q en la dieta HC no previno completamente el aumento en la expresión de FOXO1 inducido por HC con respecto a la dieta C. La dieta HC no tuvo efecto sobre la expresión de **FOXO3** y la suplementación con Q tuvo efectos sólo en la dieta C, donde aumentó su expresión en un 362% (p = 0,0027). La dieta HC aumentó la expresión de **UCP-2** en un 64% y su suplementación con Q disminuyó su expresión en un 42% (p = 0,0093), re-estableciendo los niveles de ARNm con respecto a la dieta C. La dieta HC disminuyó la expresión de **HO-1** (p =0,0189) y la suplementación con Q aumentó su expresión en ambas dietas (p = 0,0001) (**Tabla Nro. 5**).

DISCUSIÓN

Además del análisis de la expresión génica en los distintos tejidos y la determinación de la cantidad de insulina presente en páncreas, se midieron otros parámetros fisiológicos en las ratas, esto dentro del marco de la investigación financiada por Fondecyt. Algunas de estas mediciones fueron los niveles de insulina y glucosa en plasma, donde la dieta HC disminuyó los niveles de insulina a un 45% y aumentó la glicemia en un 36%. También se realizó un test de tolerancia a glucosa en donde las ratas alimentadas con la dieta HC presentaron un aumento en el área bajo la curva (ABC) de un 47%, lo que denota una intolerancia a glucosa en ratas tratadas con la dieta HC. La suplementación con Q previno estas alteraciones en el control glicémico inducidas por la dieta HC (Carrasco-Pozo *et al.*, 2016b).

También se evaluó el perfil lipídico, donde ratas alimentadas con la dieta HC presentaron niveles elevados de colesterol total (un aumento de 74%), además de una disminución en los niveles de HDL (63%) y un aumento en los niveles de LDL y VLDL (114 y 100%, respectivamente). La suplementación con Q previno el aumento en los niveles de colesterol en plasma y atenuó las demás alteraciones en el perfil lipídico inducidas por la dieta HC (Carrasco-Pozo *et al.*, 2016b). La dieta HC también produjo un aumento en los niveles de triglicéridos circulantes¹. En el caso específico del tejido pancreático también se comprobó que la dieta HC indujo una acumulación de colesterol en páncreas, alteración que fue prevenida con la suplementación de quercetina (Carrasco-Pozo *et al.*, 2016b).

Las ratas alimentadas con la dieta HC desarrollaron hipertrofia ventricular izquierda y presentaron, además, una disminución en la función diastólica y mayores niveles de colesterol en el tejido. También presentaron lipoperoxidación en tejido adiposo epididimal y subcutáneo².

Los resultados anteriormente nombrados permitirán un mejor entendimiento y discusión de los resultados obtenidos en la presente memoria de título.

¹ CARRASCO-POZO, C. 2016. [comunicación personal]. Proyecto Fondecyt 11130232.

² CARRASCO-POZO, C. 2016. [comunicación personal]. Proyecto Fondecyt 11130232.

Tejido pancreático

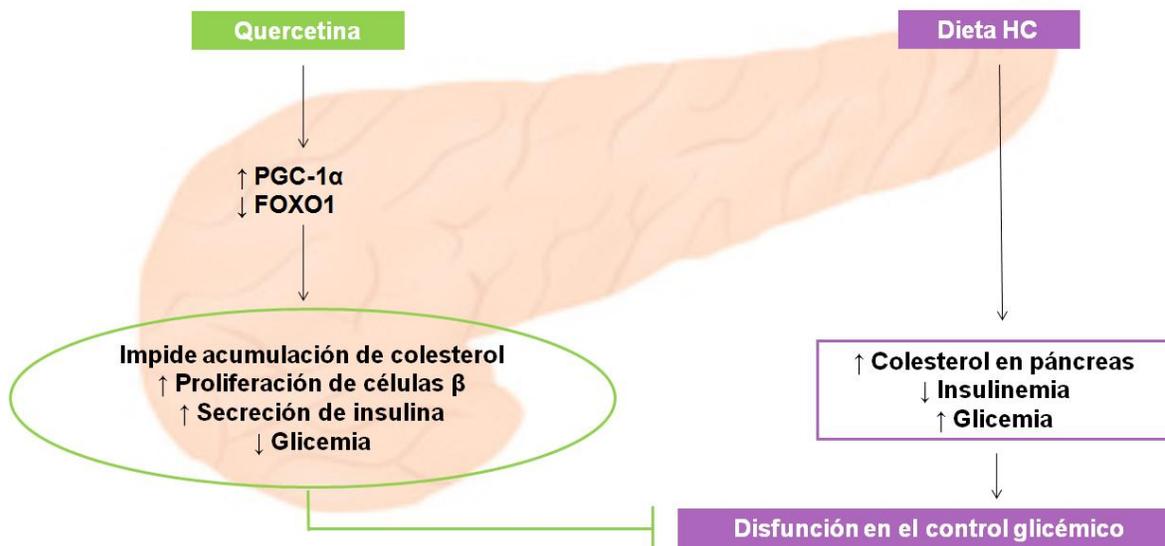


Figura Nro. 2: Efecto de la suplementación con quercetina sobre la expresión génica en tejido pancreático y su relación con la función pancreática. (Símbolo “|—” representa “prevención o atenuación de” y símbolo “↓” representa “inducción de”).

La suplementación con quercetina aumentó la expresión de PGC-1 α y disminuyó la expresión de FOXO1 en páncreas. PGC-1 α se asocia a un aumento en la expresión de enzimas claves en el catabolismo lipídico y esenciales en la secreción de insulina en células β , tales como la enzima ATGL (“adipose triglyceride lipase”) y HSL (“hormone sensitive lipase”) (Oropeza *et al.*, 2014). De esta manera PGC-1 α impide la acumulación de colesterol en células β (Oropeza *et al.*, 2014), lo que permite la adecuada secreción de insulina. La secreción de esta hormona también depende de la adecuada síntesis de ATP, donde PGC-1 α tiene un efecto al regular la expresión de diversos genes mitocondriales (Mitra *et al.*, 2012) y así, la correcta secreción de insulina permitiría una disminución de la glicemia. FOXO1, en cambio, se relaciona con una menor proliferación y función de células β (Kousteni, 2011), por lo tanto la inhibición en su expresión inducida por la suplementación con quercetina permitiría una mejoría en el número y función de estas células aumentando la secreción de insulina. De esta manera, el efecto de quercetina sobre la expresión de estos factores podría contribuir positivamente al mejoramiento de la

función β pancreática, cantidad de insulina en páncreas y secreción de ésta, y en el control glicémico evidenciados en presencia de quercetina (Carrasco-Pozo *et al.*, 2015; Carrasco-Pozo *et al.*, 2016b) (**Figura Nro. 2**). La dieta HC, sin embargo, no tuvo efecto sobre la expresión de FOXO-1 y PGC-1 α , por lo que no estarían involucrados en la inhibición de la secreción de insulina *in vitro* en células β (Carrasco-Pozo *et al.*, 2015) ni en la tendencia a disminuir sus niveles en páncreas *in vivo* (Carrasco-Pozo *et al.*, 2016b).

El efecto de PPAR γ en la función de las células β es controversial, por un lado se ha reportado que PPAR γ promovería la secreción de insulina y aumentaría la masa de células β (Sharma y Alonso, 2014), pero por otro se ha reportado que PPAR γ no sería esencial para la función de estas células (Welters *et al.*, 2012). Además, la sobre-expresión de PPAR γ promueve una mayor salida de colesterol desde los tejidos a través de LXR (“Liver X receptors”) en macrófagos (Baker *et al.*, 2010) y adipocitos (Dong *et al.*, 2011). En este estudio la dieta HC aumentó la expresión de PPAR γ en páncreas, lo cual coincide con un exceso de colesterol en este (Carrasco-Pozo *et al.*, 2016b) y en los otros tejidos estudiados³, en respuesta a un esfuerzo de ellos por disminuir sus niveles. Por otro lado, la suplementación con quercetina disminuyó la expresión de PPAR γ y el contenido de colesterol en los tejidos, por lo que su efecto y el de la dieta HC sobre la expresión de este gen no estarían involucrados en los efectos observados sobre el control glicémico y la secreción de insulina en páncreas.

Modulación de la cantidad de insulina presente en tejido pancreático

La dieta HC no tuvo efectos significativos sobre la cantidad de insulina en páncreas, a pesar de que hubo una tendencia a disminuirla. Sin embargo, la dieta HC si logró disminuir los niveles de insulina y aumentar la glicemia, los niveles de colesterol en plasma y en tejido pancreático (Carrasco-Pozo *et al.*, 2016b). Se ha descrito anteriormente que la acumulación de colesterol en células β altera el metabolismo de la glucosa y reduce la secreción de insulina (Fryirs *et al.*, 2009). De esta manera se puede concluir que la dieta HC constituiría un estímulo negativo para el correcto control glicémico, debido a que disminuye los niveles

³ CARRASCO-POZO *et al.*, manuscrito en preparación (2016). [comunicación personal]. Proyecto Fondecyt 11130232.

de insulina circulantes en ayunas, a pesar de no generar cambios significativos en la cantidad de insulina presente en páncreas.

La suplementación con quercetina aumentó la cantidad de insulina en páncreas independientemente de la dieta administrada. Otros autores han observado que su suplementación no sólo promueve la secreción de insulina *in vivo* e *in vitro* (Youl *et al.*, 2010; Carrasco-Pozo *et al.*, 2015; Carrasco-Pozo *et al.*, 2016b) sino que también aumenta el número de células β en ratas sanas (Youl *et al.*, 2010; Carrasco-Pozo *et al.*, 2016b). También previene las alteraciones sobre los niveles de glucosa en ayunas y el test de tolerancia a glucosa inducidas por la dieta HC (Arias *et al.*, 2014; Carrasco-Pozo *et al.*, 2016b). De esta manera, la suplementación con quercetina previno la disfunción sobre el control glicémico inducido por la dieta HC (**Figura Nro. 2**) al normalizar los niveles de glucosa e insulina en plasma (Carrasco-Pozo *et al.*, 2016b) y al aumentar la cantidad de insulina en células β .

Tejido adiposo epididimal

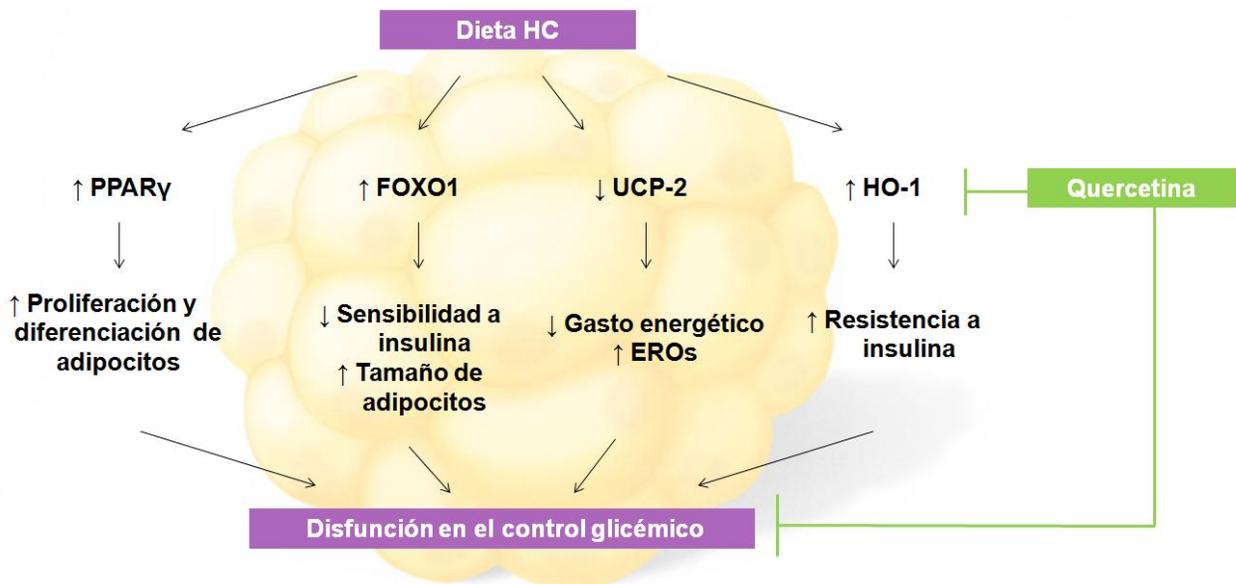


Figura Nro. 3: Efecto de la dieta HC sobre la expresión génica en tejido adiposo epididimal y relación con su función: efecto protector de quercetina. (Símbolo “|—” representa “prevención o atenuación de” y símbolo “↓” representa “inducción de”. EROs = especies reactivas derivadas del oxígeno).

La dieta HC en tejido adiposo epididimal tiene efecto sólo sobre la expresión de PPAR γ , FOXO1, UCP-2 y HO-1. La expresión de PPAR γ en tejido adiposo epididimal aumenta en ratas obesas (López *et al.*, 2003) y en tejido adiposo visceral de roedores alimentados con una dieta alta en grasa y colesterol (Vidal-Puig *et al.*, 1996, Kim *et al.*, 2012), lo que estaría asociado a una mayor proliferación y diferenciación de los adipocitos. PPAR γ también promueve el almacenamiento de lípidos en tejido adiposo, y con ello, el crecimiento del tejido adiposo visceral, lo que se correlaciona directamente con un mayor riesgo de desarrollo de insulino-resistencia (Bjorndal *et al.*, 2011). La sobre-expresión de FOXO1 aumenta el tamaño celular de adipocitos en tejido adiposo epididimal de ratones alimentados con dieta alta en grasa (Nakae *et al.*, 2003), promoviendo de esta manera una mayor resistencia a insulina en este tejido, debido a que adipocitos de mayor tamaño pierden la sensibilidad a la acción de esta hormona (Bjorndal *et al.*, 2011). Dietas altas en grasa sub-regulan genes relacionados con la adipogénesis en este tejido, como por ejemplo UCP-2 (Kim *et al.*, 2008; Pang *et al.*, 2008) lo que podría disminuir el gasto energético (Klaus *et al.*, 2005) y aumentar la producción de EROs (Lin *et al.*, 2005; Dalgaard, 2011). Estas dietas también aumentan la expresión de HO-1, el cual tendría un rol sobre la adipogénesis y promovería la resistencia a insulina (Jais *et al.*, 2014). Es bien sabido que el aumento en el tamaño del tejido adiposo visceral se asocia a mayores factores de riesgo cardiometabólicos, como menor sensibilidad a insulina, mayor presión sanguínea, lípidos circulantes y marcadores de inflamación (Porter *et al.*, 2009). En este caso, el efecto que tuvo la dieta HC sobre la expresión de los genes anteriormente nombrados conlleva al crecimiento del tejido adiposo epididimal, a través de una hipertrofia de los adipocitos, lo que a su vez podría tener efecto sobre la glicemia a través de una serie de procesos que ocurren en cascada como consecuencia de su hipertrofia (Bjorndal *et al.*, 2011). Lo primero que se genera es una lipólisis aumentada, que lleva al aumento en circulación de ácidos grasos. Éstos generan una dislipemia, que a su vez estimula al hígado a producir más glucosa, desarrollando en algún punto resistencia a insulina hepática y finalmente, aumentando los niveles de glucosa en sangre (Bjorndal *et al.*, 2011). De esta manera, es posible que el efecto deletéreo de HC sobre el control glicémico, aumentando la glicemia y disminuyendo la insulinemia en ayunas (Carrasco-Pozo *et al.*, 2016b) esté mediado, en

parte, por su efecto sobre la expresión de estos genes en tejido adiposo epididimal (**Figura Nro. 3**).

La suplementación con quercetina previno la sobre-expresión de FOXO1 inducida por la dieta HC, la que se relacionaría con una disminución en la hiperglicemia inducida por la dieta (Nakae *et al.*, 2003) y podría promover una disminución en el tamaño de los adipocitos y así mejorar la sensibilidad a la insulina (Kim *et al.*, 2009). Quercetina además promovió un efecto contrario al de la dieta HC sobre la expresión de PPAR γ , UCP-2 y HO-1. Investigaciones plantean que la quercetina tendría un efecto anti-obesidad y preventivo contra el síndrome metabólico, al sub-regular la expresión de PPAR γ en tejido adiposo visceral (Kim *et al.*, 2012). Algunos polifenoles también estimulan la lipólisis al inducir la expresión de UCP-2 en adipocitos (Bahadoran *et al.*, 2013), promueven el gasto energético e inhiben la síntesis de ácidos grasos, atenuando así el desarrollo de obesidad (Klaus *et al.*, 2005) e incrementando el ingreso de glucosa a adipocitos en ratas (Anderson y Polansky, 2002 citado por Scalbert *et al.*, 2005). La menor expresión de HO-1 en tejido adiposo epididimal se relaciona con una menor glicemia en ayunas (Hosick *et al.*, 2014). El efecto de quercetina sobre la expresión de estos genes podría relacionarse, entonces, con un efecto citoprotector en este tejido, al prevenir la alteración en el control glicémico inducido por la dieta HC (Carrasco-Pozo *et al.*, 2016b) (**Figura Nro. 3**).

La dieta HC no tuvo efecto sobre la expresión de PGC-1 α ni FOXO3 en tejido adiposo epididimal, por lo tanto estos genes no estarían involucrados en los efectos deletéreos de una dieta HC en este tejido. Sin embargo, la suplementación con quercetina aumentó la expresión de PGC-1 α (con respecto a la dieta HC), lo que se relaciona con una mayor biogénesis mitocondrial (Powell *et al.*, 2007) y también aumentó la expresión de FOXO3, lo que podría ser beneficioso para la señalización de insulina y mantención de reservas energéticas (Maiese, 2015) contribuyendo de esta forma a la mejoría en el control glicémico observado con quercetina (Carrasco-Pozo *et al.*, 2016b).

Tejido adiposo subcutáneo

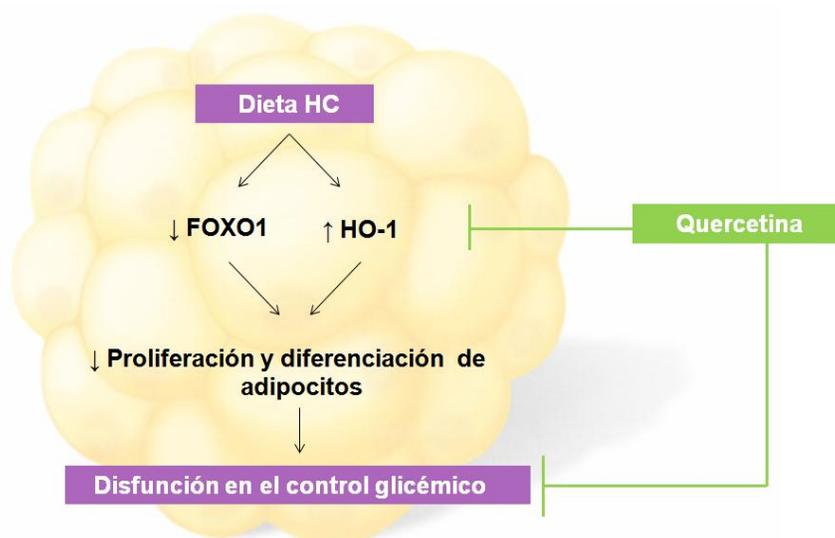


Figura Nro. 4: Efecto de la dieta HC sobre la expresión génica en tejido adiposo subcutáneo y relación con su función: efecto protector de quercetina. (Símbolo “|—” representa “prevención o atenuación de” y símbolo “↓” representa “inducción de”).

La dieta HC tiene efecto sobre la expresión de FOXO1 y HO-1 en tejido adiposo subcutáneo. FOXO1 cumple un importante rol en la capacidad de almacenamiento de lípidos en este tejido al permitir la formación de nuevos adipocitos (Nakae *et al.*, 2003) y su expresión se correlaciona negativamente con la cantidad de triglicéridos en plasma en humanos (Hammes *et al.*, 2012). HO-1 puede ser inducido por la proteína activadora-1 (AP-1), la cual es activada por estrés oxidativo e inflamación (Karin *et al.*, 2001); por lo tanto la dieta HC podría promover la expresión de HO-1 por estrés oxidativo, ya que induce lipoperoxidación en este tejido⁴. HO-1 además cumple un importante papel en la diferenciación del tejido adiposo y su expresión está aumentada en tejido adiposo subcutáneo de pacientes obesos y con diabetes (Shakeri-Manesch *et al.*, 2009; Bao *et al.*, 2010; Lehr *et al.*, 2012). Su inducción en adipocitos atenúa la adiposidad en ratones alimentados con una dieta alta en grasa al suprimir la adipogénesis (Cao *et al.*, 2012; Huang *et al.*, 2013). Tanto FOXO1 como HO-1 inducen una menor proliferación y diferenciación

⁴CARRASCO-POZO *et al.*, manuscrito en preparación (2016). [comunicación personal]. Proyecto Fondecyt 11130232.

de adipocitos en tejido adiposo subcutáneo alterando de esta forma el normal proceso de adipogénesis. Esto disminuye la capacidad de neutralizar y almacenar el exceso de lípidos de la dieta, perdiendo de esta manera la facultad de proteger a otros tejidos de condiciones lipotóxicas (Bjorndal *et al.*, 2011). Los lípidos provenientes de la dieta se almacenan en tejido adiposo visceral y otros tejidos debido al inadecuado desarrollo del tejido adiposo subcutáneo (Heilbronn *et al.*, 2004; Porter *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2013; Gyllenhammer *et al.*, 2015), lo que constituye un problema ya que el crecimiento del tejido adiposo visceral tiene directa relación con el desarrollo de enfermedades cardiovasculares y diabetes tipo 2 (Bjorndal *et al.*, 2011). Además, la redistribución de lípidos a tejidos ectópicos promueve el desarrollo de resistencia a insulina en tejidos periféricos (Bjorndal *et al.*, 2011) agravando aún más los factores de riesgo para el desarrollo de diabetes. Por lo tanto, es posible que el efecto de HC sobre la disfunción en el control glicémico (Carrasco-Pozo *et al.*, 2016b) y sobre el aumento en los niveles de triglicéridos circulantes⁵, esté mediado, en parte, por su efecto sobre la expresión de estos genes en tejido adiposo subcutáneo (**Figura Nro. 4**).

La suplementación con quercetina inhibe la sub-regulación de FOXO1 y atenúa la sobre-regulación de HO-1 inducidas por HC en tejido adiposo subcutáneo, pudiendo relacionarse con los efectos protectores del polifenol en este tejido. Por ejemplo, al normalizar la expresión de FOXO1 permitiría el almacenamiento de lípidos y la diferenciación de nuevos adipocitos (Nakae *et al.*, 2003). Por otro lado, quercetina inhibe la activación de AP-1 (Kobuchi *et al.*, 1999) lo que contribuiría a atenuar la sobre-regulación de HO-1 inducida por HC y así constituir un mecanismo protectorio.

La dieta HC también disminuyó la expresión de PPAR γ , PGC-1 α y UCP-2 en tejido adiposo subcutáneo, pudiendo también ser parte de los mecanismos que afectan el control glicémico en este tejido (Carrasco-Pozo *et al.*, 2016b). Un aumento en la expresión de PPAR γ promueve una mayor salida de colesterol desde los adipocitos (Dong *et al.*, 2011) por lo tanto la dieta HC impediría la salida de colesterol al disminuir la expresión de PPAR γ y también disminuiría la adipogénesis en este tejido (Grygiel-Górniak, 2014). La

⁵ CARRASCO-POZO *et al.*, manuscrito en preparación (2016). [comunicación personal]. Proyecto Fondecyt 11130232.

expresión de PGC-1 α y UCP-2 está disminuida en tejido adiposo subcutáneo de sujetos obesos (Semple *et al.*, 2004; Mahadik *et al.*, 2012) y de ratones alimentados con una dieta alta en grasas (Rong *et al.*, 2007). La menor expresión de PGC-1 α tendría un efecto sobre la biogénesis mitocondrial (Chen *et al.*, 2009a) lo que podría eventualmente contribuir al desarrollo de resistencia a insulina y la menor expresión de UCP-2 disminuiría el gasto energético (Mahadik *et al.*, 2012). Por otro lado, la quercetina no tiene efecto sobre la expresión de PPAR γ , PGC-1 α , ni UCP-2, pero sí logró aumentar la expresión de FOXO3 en este tejido, pudiendo ser parte de sus efectos favorables al mejorar la señalización de insulina y mantener las reservas energéticas (Maiese, 2015), además se ha descrito que su sobre-expresión en otros tejidos, como hígado, reduce los niveles de colesterol en plasma de ratones obesos (Tao *et al.*, 2013).

Tejido cardíaco

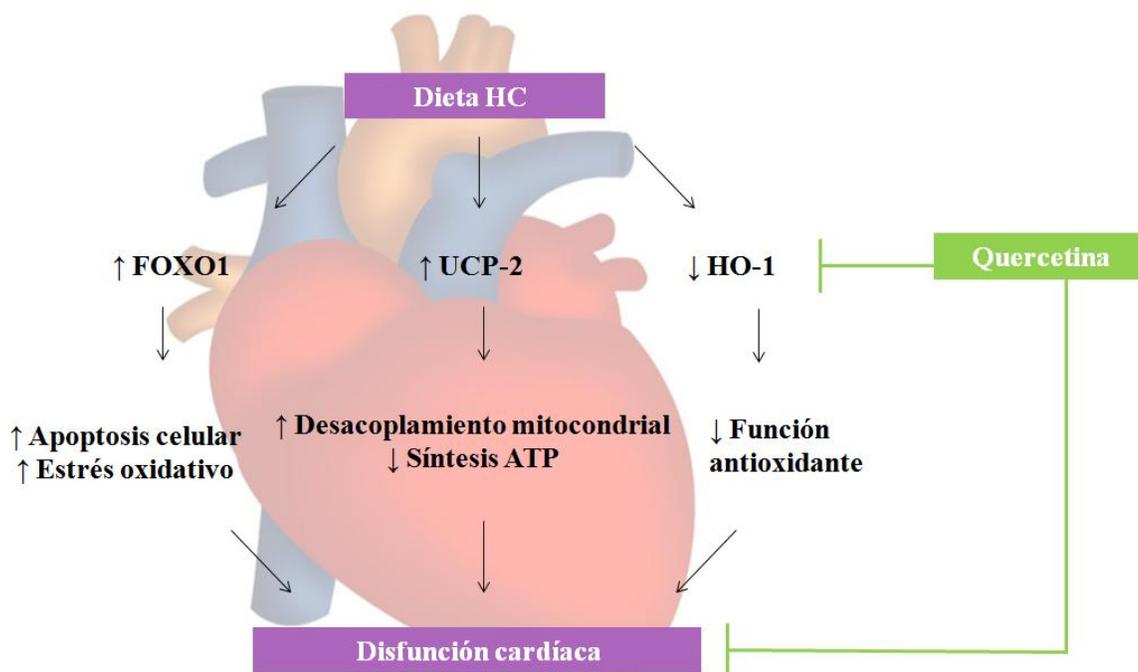


Figura Nro. 5: Efecto de la dieta HC sobre la expresión génica en tejido cardíaco y su relación con la función cardíaca: efecto protector de quercetina. (Símbolo “|—” representa “prevención o atenuación de” y símbolo “↓” representa “inducción de”).

La dieta HC sólo tuvo efecto sobre la expresión de FOXO1, UCP-2 y HO-1 en corazón (**Figura Nro. 5**). La mayor expresión de FOXO1 y UCP-2 podrían jugar un rol importante en la fisiopatología en la falla cardíaca, FOXO1 al ser gatillada por estrés oxidativo (Sengupta *et al.*, 2011) y aumentar la apoptosis celular (Ronnebaum y Patterson, 2010), y UCP-2 al relacionarse con desacoplamiento mitocondrial en miocardios de ratas con falla cardíaca (Laskowski y Russell, 2008; Huang *et al.*, 2016) y por disminuir la síntesis de ATP (Powell *et al.*, 2007, Laskowski y Russell, 2008). El efecto de HC sobre la expresión de estos factores podría estar relacionado con su efecto negativo sobre la función cardíaca observado en estudios asociados a esta memoria, donde el grupo de ratas alimentadas con la dieta HC desarrolló hipertrofia ventricular izquierda además de disminuir su función diastólica⁶.

La suplementación con quercetina atenuó los cambios en la expresión de FOXO1 y previno los cambios en la expresión de UCP-2 inducidos por la dieta HC, relacionándose posiblemente con el efecto cardioprotector ejercido por quercetina, donde su suplementación previno la disfunción cardíaca inducida por HC⁷ (**Figura Nro. 5**). Diversas investigaciones han relacionado la menor expresión de FOXO1 (Chen *et al.*, 2009b) y UCP-2 (Cao *et al.*, 2015) en corazón con un efecto cardioprotector.

HO-1 cumple un rol en la homeostasis cardiovascular y un papel citoprotector al ser antioxidante (Wu *et al.*, 2011). Su mayor expresión en corazón previene los efectos deletéreos de dietas altas en grasa sobre el remodelamiento cardíaco, la presión arterial y el control glicémico (Panchal *et al.*, 2012) y se relaciona con menores niveles de colesterol en plasma (Shen *et al.*, 2013). Así, la menor expresión de HO-1 también se podría relacionar con un efecto negativo de la dieta HC sobre la función cardíaca (**Figura Nro. 5**) y, del mismo modo, el efecto beneficioso de quercetina sobre la salud cardiovascular podría estar mediada por un aumento en la expresión de HO-1

La dieta HC no tuvo efecto sobre la expresión de PPAR γ , PGC-1 α ni FOXO3, por lo tanto estos genes no se relacionarían con la disfunción cardíaca inducida por HC. Sin embargo, la

⁶ CARRASCO-POZO, C. 2016. [comunicación personal]. Proyecto Fondecyt 11130232.

⁷ CARRASCO-POZO, C. 2016. [comunicación personal]. Proyecto Fondecyt 11130232.

suplementación con quercetina aumentó la expresión de PGC-1 α en ratas alimentadas con la dieta HC, lo que promovería una mejora en la función mitocondrial y una adecuada síntesis de ATP (Haemmerle *et al.*, 2011), fundamental para el correcto funcionamiento del tejido cardíaco.

CONCLUSIONES

Los resultados de esta memoria de título contribuyen a entender el rol protector que tendría quercetina frente al desarrollo de diabetes, obesidad y su co-morbilidad cardiovascular, inducidos por la ingesta de una dieta alta en colesterol.

- En **tejido pancreático** el efecto protector de quercetina sobre el control glicémico podría relacionarse con su efecto sobre la expresión de PGC-1 α y FOXO1, independientemente de la dieta administrada. El efecto deletéreo de la dieta HC sobre el control glicémico no estaría relacionado con su modulación sobre la expresión de estos factores.

- En **tejido adiposo epididimal** el efecto protector de quercetina sobre la disfunción en el control glicémico inducido por una dieta HC podría explicarse, en parte, por la atenuación en las alteraciones en las expresiones de PPAR γ , UCP-2 y HO-1 inducidas por esta dieta. El efecto protector de quercetina también podría deberse a un aumento en la expresión de PGC-1 α y FOXO3.

- En **tejido adiposo subcutáneo** el efecto protector de quercetina sobre la disfunción en el control glicémico inducido por una dieta HC podría estar mediado por la prevención en la alteración en la expresión génica de FOXO1 y la atenuación en la expresión de HO-1 inducida por una dieta HC. El efecto protector de quercetina también podría deberse a un aumento en la expresión de FOXO3.

- En **tejido cardíaco** el efecto protector de quercetina sobre la disfunción cardíaca inducida por HC podría estar relacionado con la prevención en la alteración de la expresión génica de UCP-2 y en la atenuación de los cambios en la expresión de FOXO1 y HO-1 inducida por una dieta HC. El efecto protector de quercetina también podría deberse a un aumento en la expresión de PGC-1 α .

BIBLIOGRAFÍA

- **ADEWOLE, S.O.; CAXTON-MARTINS, E.A.; OJEWOLE, J.A.** 2007. Protective effect of quercetin on the morphology of pancreatic b-cells of streptozotocin-treated diabetic rats. *Afr. J. Tradit. Complement. Altern. Med.* 4(1):64-74.
- **AGUILAR, C.** 2002. Las proteínas desacoplantes en la patogenia de la obesidad. *Rev. Mex. Endocrinol. Metab. Nutr.* 10(3):165-170.
- **ANDERSON, R.A.; POLANSKY, M.M.** 2002. Tea enhances insulin activity. *J. Agric. Food Chem.* 50(24):7182-7186. (citado por Scalbert, A.; Manach, C.; Morand, C.; Remesy, C.; Jimenez, L. 2005. Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 45(4):287-306).
- **ARIAS, N.; MACARULLA, M.T.; AGUIRRE, L.; MARTÍNEZ-CASTAÑO, M.G.; PORTILLO, M.P.** 2014. Quercetin can reduce insulin resistance without decreasing adipose tissue and skeletal muscle fat accumulation. *Genes Nutr.* 9(1):361.
- **BAHADORAN, Z.; MIRMIRAN, P.; AZIZI, F.** 2013. Dietary polyphenols as potential nutraceutical in management of diabetes: a review. *J. Diabetes Metab. Disord.* 12(1):43.
- **BAKER, A.D.; MALUR, A.; BARNA, B.P.; KAVURU, M.S.; MALUR, A.G.; THOMASSEN, M.J.** 2010. PPAR γ regulates the expression of cholesterol metabolism genes in alveolar macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 393(4):682-687.
- **BAO, W.; SONG, F.; LI, X.; RONG, S.; YANG, W.; ZHANG, M.; YAO, P.; HAO, L.; YANG, N.; HU, F.B.; LIU, L.** 2010. Plasma heme oxygenase-1 concentration is elevated in individuals with type 2 diabetes mellitus. *PLoS One.* 5(8):e12371.
- **BEEKMANN, K.; RUBIO, L.; DE HAAN, L.H.; ACTIS-GORETTA, L.; VAN DER BURG, B.; VAN BLADEREN, P.J.; RIETJENS, I.M.** 2015. The effect of quercetin and kaempferol aglycones and glucuronides on peroxisome proliferator-activated receptor-gamma (PPAR- γ). *Food Funct.* 6(4):1098-1107.
- **BJORNDAL, B.; BURRI, L.; STAALESEN, V.; SKORVE, J.; BERGE, R.K.** 2011. Different adipose depots: their role in the development of metabolic syndrome and mitochondrial response to hypolipidemic agents. *J. Obes.* 2011:490650.
- **BODEN, G.; HOMKO, C.; BARRERO, C.A.; STEIN, T.P.; CHEN, X.; CHEUNG, P.; FECCHIO, C.; KOLLER, S.; MERALI, S.** 2015. Excessive caloric intake acutely causes oxidative stress, GLUT4 carbonylation, and insulin resistance in healthy men. *Sci. Transl. Med.* 7(304):304re7.

- **CAO, J.; PETERSON, S.J.; SODHI, K.; VANELLA, L.; BARBAGALLO, I.; RODELLA, L.F.; SCHWARTZMAN, M.L.; ABRAHAM, N.G.; KAPPAS, A.** 2012. Heme oxygenase gene targeting to adipocytes attenuates adiposity and vascular dysfunction in mice fed a high-fat diet. *Hypertension*. 60(2):467-475.
- **CAO, K.; XU, J.; PU, W.; DONG, Z.; SUN, L.; ZANG, W.; GAO, F.; ZHANG, Y.; FENG, Z.; LIU, J.** 2015. Punicalagin, an active component in pomegranate, ameliorates cardiac mitochondrial impairment in obese rats via AMPK activation. *Sci. Rep.* 5:14014.
- **CARRASCO-POZO, C.; GOTTELAND, M.; CASTILLO, R.; CHEN, C.** 2015. 3,4-dihydroxyphenylacetic acid, a microbiota-derived metabolite of quercetin, protects against pancreatic β -cells dysfunction induced by high cholesterol. *Exp. Cell Res.* 334:270-282.
- **CARRASCO-POZO, C.; CASTILLO, R.L.; BELTRÁN, C.; MIRANDA, A.; FUENTES, J.; GOTTELAND, M.** 2016a. Molecular mechanisms of gastrointestinal protection by quercetin against indomethacin-induced damage: role of NF- κ B and Nrf2. *J. Nutr. Biochem.* 27:289-298.
- **CARRASCO-POZO, C.; TAN, K.N.; REYES-FARIAS, M.; DE LA JARA, N.; NGO, S.T.; GARCÍA-DÍAZ, D.F.; LLANOS, P.; CIRES, M.J.; BORGES, K.** 2016b. The deleterious effect of cholesterol and protection by quercetin on mitochondrial bioenergetics of pancreatic β -cells, glycemic control and inflammation: *In vitro* and *in vivo* studies. *Redox Biol.* 9:229-243.
- **CHEN, W.; YANG, Q.; ROEDER, R.** 2009a. Dynamic interactions and cooperative functions of PGC-1 α and MED1 in TR α -mediated activation of the brown-fat-specific UCP-1 gene. *Mol. Cell.* 35:755-768.
- **CHEN, C.J.; YU, W.; FU, Y.C.; WANG, X.; LI, J.L.; WANG, W.** 2009b. Resveratrol protects cardiomyocytes from hypoxia-induced apoptosis through the SIRT1-FoxO1 pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 378(3):389-393.
- **DALGAARD, L.** 2011. Genetic variance in uncoupling protein 2 in relation to obesity, type 2 diabetes, and related metabolic traits: focus on the functional -866G>A promoter variant (rs659366). *J. Obes.* 2011:1-12.
- **DIRKX, R.; SOLIMENA, M.** 2012. Cholesterol-enriched membrane rafts and insulin secretion. *J. Diabetes Investig.* 4(3):339-346.
- **DONG, S.; ZHAO, S.; WU, Z.; YANG, J.; XIE, X.; YU, B.; NIE, S.** 2011. Curcumin promotes cholesterol efflux from adipocytes related to PPAR γ -LXR α -ABCA1 passway. *Mol. Cell. Biochem.* 358(1-2):281-285.

- **EGERT, S.; BOSY-WESTPHAL, A.; SEIBERL, J.; KÜRBITZ, C.; SETTLER, U.; PLATCHA-DANIELZIK, S.; WAGNER, A.; FRANK, J.; SCHREZENMEIR, J.; RIMBACH, G.; WOLFFRAM, S.; MÜLLER, M. 2009.** Quercetin reduces systolic blood pressure and plasma oxidised low-density lipoprotein concentrations in overweight subjects with a high-cardiovascular disease risk phenotype: a double-blinded, placebo-controlled cross-over study. *Br. J. Nutr.* 102(7):1065-1074. (citado por Kelly, G.S. 2011. Quercetin. *Monograph. Altern. Med. Rev.* 16(2):172-194).
- **FRYIRS, M.; BARTER, P.; RYE, K. 2009.** Cholesterol metabolism and pancreatic beta-cell function. *Curr. Opin. Lipidol.* 20(3):159-164.
- **FUENTES, E.; GUZMÁN, L.; MOORE, R.; PALOMO, I. 2013.** Role of PPARs in inflammatory processes associated with metabolic syndrome. *Mol. Med. Rep.* 8:1611-1616.
- **GARCÍA, P.; ANTARAMIAN, A.; SHIMADA, A.; VILLARROYA, F.; MORA, O. 2008.** Papel del coactivador PGC-1a en el balance energético. Importancia en la producción de bovinos de engorda. *Arch. Latinoam. Prod. Anim.* 16(2):64-77.
- **GLAUSER, D.; SCHLEGEL, W. 2007.** The emerging role of FOXO transcription factors in pancreatic beta cells. *J. Endocrinol.* 193:195-207.
- **GRYGIEL-GORNIK, B. 2014.** Peroxisome proliferator-activated receptors and their ligands: nutritional and clinical implications- a review. *Nutr. J.* 13:17-27.
- **GYLLENHAMMER, L.E.; ALDERETE, T.L.; TOLEDO-CORRAL, C.M.; WEIGENBERG, M.; GORAN, M.I. 2015.** Saturation of subcutaneous adipose tissue expansion and accumulation of ectopic fat associated with metabolic dysfunction during late and post-pubertal growth. *Int. J. Obes. (Lond).* 40(4):601-606.
- **HAEMMERLE, G.; MOUSTAFA, T.; WOELKART, G.; BÜTTNER, S.; SCHMIDT, A.; VAN DER WEIJER, T.; HESSELINK, N.; JAEGER, D.; KIENESBERGER, P.; ZIELER, K.; SCHREIBER, R.; EICHMANN, T.; KOTZBECK, P.; SCHWEIGER, M.; KUMARI, M.; EDER, S.; SCHOISWOHL, G.; WONGSIRIROJ, N.; POLLAK, N.; RADNER, F.; PREISS-LANDL, K.; KOLBE, T.; RÜLICHE, T.; PIESKE, B.; TRAUNER, M.; LASS, A.; ZIMMERMANN, R.; HOEFLER, G.; CINTI, S.; KERSHAW, E.; SCHRAUWEN, P.; MADEO, F.; MAYER, B.; ZECHNER, R. 2011.** ATGL-mediated fat catabolism regulates cardiac mitochondrial function via PPAR- α and PGC-1. *Nat. Med.* 17(9):1076-1085.
- **HAMMES, T.O.; COSTA, C.D.; ROHDEN, F.; MARGIS, R.; DE ALMEIDA, J.C.; PADOIN, A.V; MOTTIN, C.C.; GUARAGNA, R.M. 2012.** Parallel down-regulation of Foxo1, PPARy and adiponectin mRNA expression in visceral adipose tissue of class II obese individuals. *Obes. Facts.* 5(3):452-459.

- **HAN, J.; HAO, J.; KIM, C.; HONG, J.; AHN, H.; LEE, Y. 2009.** Quercetin prevents cardiac hypertrophy induced by pressure overload in rats. *J. Vet. Med. Sci.* 71(6):737-743. (citado por Kelly, G.S. 2011. Quercetin. Monograph. *Altern. Med. Rev.* 16(2):172-194).
- **HEILBRONN, L.; SMITH, S.R.; RAVUSSIN, E. 2004.** Failure of fat cell proliferation, mitochondrial function and fat oxidation results in ectopic fat storage, insulin resistance and type II diabetes mellitus. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* 28(4):S12-S21.
- **HERTOG, M.; HOLLMAN, P.; KATAN, M. 1992.** Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of 28 vegetables and 9 fruits commonly consumed in the Netherlands. *J. Agric. Food Chem.* 40(12):2379-2383. (citado por Carrasco-Pozo, C.; Castillo, R.L.; Beltrán, C.; Miranda, A.; Fuentes, J.; Gotteland, M. 2016. Molecular mechanisms of gastrointestinal protection by quercetin against indomethacin-induced damage: role of NF- κ B and Nrf2. *J. Nutr. Biochem.* 27:289-298).
- **HOSICK, P.; STEC, D. 2012.** Heme oxygenase, a novel target for the treatment of hypertension and obesity?. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 302(2):R207–R214.
- **HOSICK, P.A.; AHMED, E.K.; GOUSSET, M.U.; GRANGER, J.P.; STEC, D.E. 2014.** Inhalation of carbon monoxide is ineffective as a long-term therapy to reduce obesity in mice fed a high fat diet. *BMC Obes.* 1:6.
- **HUANG, J.Y.; CHIANG, M.T.; CHAU, L.Y. 2013.** Adipose overexpression of Heme Oxygenase-1 does not protect against high fat diet-induced insulin resistance in mice. *PLoS One.* 8(2):e55369.
- **HUANG, J.D.; CHEN, S.L.; LYU J.J.; LIU, C.; ZENG, Q.Y. 2016.** Correlation between uncoupling protein 2 expression and myocardial mitochondrial injury in rats with sepsis induced by lipopolysaccharide. *Zhongguo Dang Dai Er Ke Za Zhi [Chinese Journal of Contemporary Pediatrics].* 18(2):159-64.
- **HUBBARD, G.; WOLFFRAM, S.; LOVEGROVE, J.; GIBBINS, M. 2004.** Ingestion of quercetin inhibits platelet aggregation and essential components of the collagen-stimulated platelet activation pathway in humans. *J. Thromb. Haemost.* 2(12):2138-2145. (citado por Kelly, G.S. 2011. Quercetin. Monograph. *Altern. Med. Rev.* 16(2):172-194).

- **JAIS, A.; EINWALLNER, E.; SHARIF, O.; GOSENS, K.; LU T.T.; SOYAL, S.M.; MEDGYESI, D.; NEUREITER, D.; PAIER-POURANI, J.; DALGAARD, K.; DUVIGNEAU, J.C.; LINDROOS-CHRISTENSEN, J.; ZAPF, T.C.; AMANN, S.; SALUZZO, S.; JANTSCHER, F.; STIEDL, P.; TODORIC, J.; MARTINS, R.; OBERKOFER, H.; MÜLLER, S.; HAUSER-KRONBERGER, C.; KENNER, L.; CASANOVA, E.; SUTTERLÜTY-FALL, H.; BILBAN, M.; MILLER, K.; KOZLOV, A.V.; KREMPER, F.; KNAPP, S.; LUMENG, C.N.; PATSCH, W.; WAGNER, O.; POSPISILIK, J.A.; ESTERBAUER, H.** 2014. Heme oxygenase-1 drives metaflammation and insulin resistance in mouse and man. *Cell*. 158(1):25-40.
- **JUZWIAK, S.; WÓJCICKI, J.; MOKRZYCKI, K.; MARCHLEWICZ, M.; BIALECKA, M.; WENDA-RÓZEWICKA, L.; GAWRONSKA-SZKLARZ, B.; DROZDZIK, M.** 2005. Effect of quercetin on experimental hyperlipidemia and atherosclerosis in rabbits. *Pharmacol. Rep.* 57:604-609. (citado por Kelly, G.S. 2011. Quercetin. Monograph. *Altern. Med. Rev.* 16(2):172-194).
- **KALOFOUTIS, C.; PIPERL, C.; KALOFOUTIS, A.; HARRIS, F.; PHOENIX, D.; SINGH, J.** 2007. Type II diabetes mellitus and cardiovascular risk factors: Current therapeutic approaches. *Exp. Clin. Cardiol.* 12:17-28. (citado por Bahadoran, Z.; Mirmiran, P.; Azizi, F. 2013. Dietary polyphenols as potential nutraceutical in management of diabetes: a review. *J. Diabetes Metab. Disord.* 12(1):43).
- **KARIN, M.; TAKAHASHI, T.; KAPAHI, P.; DELHASE, M.; CHEN, Y.; MAKRIS, C.; ROTHWARF, D.; BAUD, V.; NATOLI, G.; GUIDO, F.; LI, N.** 2001. Oxidative stress and gene expression: the AP-1 and NF-kappaB connections. *Biofactors.* 15(2-4):87-89.
- **KELLY, G.S.** 2011. Quercetin. Monograph. *Altern. Med. Rev.* 16(2):172-194.
- **KIM, J.; LI, P.; HUNTLEY, J.; CHANG, C.; ARDEN, K.; OLEFSKY, J.** 2009. FOXO1 haploinsufficiency protects against high-fat diet-induced insulin resistance with enhanced peroxisome proliferator-activated receptor γ activation in adipose tissue. *Diabetes.* 58(6): 1275-1282.
- **KIM, O.; LEE, S.; DO, H.; MOON, J.; LEE, K.; CHA, Y.; SHIN, M.** 2012. Influence of quercetin-rich onion peel extracts on adipokine expression in the visceral adipose tissue of rats. *Phytother. Res.* 26(3):432-437.
- **KIM, S.J.; JUNG, J.Y.; KIM, H.W.; PARK, T.** 2008. Anti-obesity effects of *Juniperus chinensis* extract are associated with increased AMP-activated protein kinase expression and phosphorylation in the visceral adipose tissue of rats. *Biol. Pharm. Bull.* 31(7):1415-1421.
- **KLAUS, S.; PÜLTZ, S.; THÖNE-REINEKE, C.; WOLFRAM, S.** 2005. Epigallocatechin gallate attenuates diet-induced obesity in mice by decreasing energy absorption and increasing fat oxidation. *Int. J. Obes. (Lond).* 29(6):615-623.

- **KOBORI, M.; MASUMOTO, S.; AKIMOTO, Y.; TAKAHASHI, Y.** 2009. Dietary quercetin alleviates diabetic symptoms and reduces streptozotocin-induced disturbance of hepatic gene expression in mice. *Mol. Nutr. Food Res.* 53(7):859-868. (citado por Kelly, G.S. 2011. Quercetin. *Monograph. Altern. Med. Rev.* 16(2):172-194).
- **KOBORI, M.; MASUMOTO, S.; AKIMOTO, Y.; OIKE, H.** 2011. Chronic dietary intake of quercetin alleviates hepatic fat accumulation associated with consumption of a Western-style diet in C57/BL6J mice. *Mol. Nutr. Food Res.* 55(4):530-540. (citado por Kelly, G.S. 2011. Quercetin. *Monograph. Altern. Med. Rev.* 16(2):172-194).
- **KOBUCHI, H.; ROY, S.; SEN, C.; NGUYEN, H.; PACKER, L.** 1999. Quercetin inhibits inducible ICAM-1 expression in human endothelial cells through the JNK pathway. *Am. J. Physiol.* 277(3 Pt 1):C403-411.
- **KOPELMAN, P.G.** 2000. Obesity as a medical problem. *Nature.* 404(6778):635-643. (citado por Arias, N.; Macarulla, M.; Aguirre, L.; Martínez-Castaño, M.; Portillo, M. 2014. Quercetin can reduce insulin resistance without decreasing adipose tissue and skeletal muscle fat accumulation. *Genes Nutr.* 9(1):361).
- **KOUSTENI, S.** 2011. FoxO1: a molecule for all seasons. *J. Bone. Miner. Res.* 26(5):912-917.
- **LASKOWSKI, K.R.; RUSSELL, R.R.** 2008. Uncoupling proteins in heart failure. *Curr. Heart Fail. Rep.* 5(2):75-79.
- **LEE, M.J.; WU, Y.; FRIED, S.K.** 2013. Adipose tissue heterogeneity: Implications of depot differences in adipose tissue for obesity complications. *Mol. Aspects Med.* 34(1):1-11.
- **LEHR, S.; HARTWIG, S.; LAMERS, D.; FAMULLA, S.; MULLER, S.; HANISCH, F.; CUVELIER, C.; RUIGE, J.; ECKARDT, K.; OUWENS, D.; SELL, H.; ECKEL, J.** 2012. Identification and validation of novel adipokines released from primary human adipocytes. *Mol. Cell. Proteomics.* 11(1):M111.010504.
- **LIN, J.; HANDSCHIN, C.; SPIEGELMAN, B.** 2005. Metabolic control through the PGC-1 family of transcription coactivators. *Cell. Metab.* 1(6):361-370.
- **LÓPEZ, I.; MARTI, A.; MILAGRO, F.; ZULET, L.; MORENO-ALIAGA, M.; MARTINEZ, J.; DE MIGUEL, C.** 2003. DNA microarray analysis of genes differentially expressed in diet-induced (cafeteria) obese rats. *Obes. Res.* 11(2):188-194.

- **MAHADIK, S.; LELE, R.; SARANATH, D.; SETH, A.; PARIKH, V.** 2012. Uncoupling protein-2 (UCP2) gene expression in subcutaneous and omental adipose tissue of Asian Indians: Relationship to adiponectin and parameters of metabolic syndrome. *Adipocyte*. 1(2): 101-107.
- **MAIESE, K.** 2015. Foxo transcription factors and regenerative pathways in diabetes mellitus. *Curr. Neurovasc. Res.* 12(4):404-413.
- **MANACH, C.; SCALBERT, A.; MORAND, C.; REMESY, C.; JIMENEZ, L.** 2004. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am. J. Clin. Nutr.* 79:727-747.
- **MARTI, A.; MORENO-ALIAGA, M.J.; ZULET, M.A.; MARTINEZ, J.A.** 2005. Avances en nutrición molecular: nutrigenómica y/o nutrigenética. *Nutr. Hosp.* 20(3):157-164.
- **MEYDANI, M.; HASAN, S.T.** 2010. Dietary polyphenols and obesity. *Nutrients*. 2(7):737-751.
- **MINISTERIO DE SALUD. GOBIERNO DE CHILE. (MINSAL).** 2010. Encuesta nacional de salud. Chile 2009-2010. [en línea]. <<http://web.minsal.cl/portal/url/item/bcb03d7bc28b64dfe040010165012d23.pdf>> [consulta: 24-08-2015].
- **MIRANDA, A.M.; ROSSONI, J.V.; SILVA, L.S.; DOS SANTOS, R.C.; SILVA, M.E.; PEDROSA, M.L.** 2016. *Agaricus brasiliensis* (sun mushroom) affects the expression of genes related to cholesterol homeostasis. *Eur. J. Nutr.* pp 1-11.
- **MITRA, R.; NOGEE, D.; ZECHNER, J.; KYUNGMOO, Y.; GIERASCH, C.; KOVACS, A.; MEDEIROS, D.; KELLY, D.; DUNCAN, J.** 2012. The transcriptional coactivators, PGC-1 α and β , cooperate to maintain cardiac mitochondrial function during the early stages of insulin resistance. *J. Moll. Cell Cardiol.* 52(3):701-710.
- **MORRIS, B.J.; WILLCOX, D.C.; DONLON, T.A.; WILLCOX, B.J.** 2015. FOXO3: a major gene for human longevity – a mini review. *Gerontology*. 61:515-525.
- **NAKAE, J.; KITAMURA, T.; KITAMURA, Y.; BIGGS, W.H.; ARDEN, K.C.; ACCILI, D.** 2003. The forkhead transcription factor Foxo1 regulates adipocyte differentiation. *Dev. Cell*. 4(1):119 –129.
- **ORGANIZACION MUNDIAL DE LA SALUD (OMS).** 2013. Cardiovascular diseases (CVDs). Geneva, Switzerland. Fact Sheet No. 317. [en línea] <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en/>> [consulta:15-01-2015]. (citado por Miranda, A.M.; Rossoni, J.V.; Silva, L.S.; Dos Santos, R.C.; Silva, M.E.; Pedrosa, M.L. 2016. *Agaricus brasiliensis* (sun mushroom) affects the expression of genes related to cholesterol homeostasis. *Eur. J. Nutr.* pp. 1-11.)

- **OROPEZA, D.; JOUVET, N.; BOUYAKDAN, K.; PERRON, G.; RINGUETTE, L.; PHILIPSON, L.; KISS, R.; POITOUT, V.; ALQUIER, T.; ESTALL, J.** 2014. PGC-1 coactivators in β -cells regulate lipid metabolism and are essential for insulin secretion coupled to fatty acids. *Mol. Metab.* 4(11):811-822.
- **OVASKAINEN, M.; TÖRRÖNEN, R.; KOPONEN, J.; SINKKO, H.; HELLSTRÖM, J.; REINIVUO, H.; MATTILA, P.** 2008. Dietary intake and major food sources of polyphenols in finnish adults. *J. Nutr.* 138:252-256. (citado por Carrasco-Pozo, C.; Castillo, R.L.; Beltrán, C.; Miranda, A.; Fuentes, J.; Gotteland, M. 2016. Molecular mechanisms of gastrointestinal protection by quercetin against indomethacin-induced damage: role of NF- κ B and Nrf2. *J. Nutr. Biochem.* 27:289-298).
- **PANCHAL, S.; POUDYAL, H.; BROWN, L.** 2012. Quercetin ameliorates cardiovascular, hepatic, and metabolic changes in diet-induced metabolic syndrome in rats. *J. Nutr.* 142(6):1026-1032.
- **PANG, J.; CHOI, Y.; PARK, T.** 2008. *Ilex paraguariensis* extract ameliorates obesity induced by high-fat diet: potential role of AMPK in the visceral adipose tissue. *Arch. Biochem. Biophys.* 476(2):178-85.
- **PEREZ-JIMENEZ, J.; FEZEU, L.; TOUVIER, M.; ARNAULT, N.; MANACH, C.; HERCBERG, S.; GALAN, P.; SCALBERT, A.** 2011. Dietary intake of 337 polyphenols in French adults. *Am. J. Clin. Nutr.* 93:1220-1228. (citado por Carrasco-Pozo, C.; Castillo, R.L.; Beltrán, C.; Miranda, A.; Fuentes, J.; Gotteland, M. 2016. Molecular mechanisms of gastrointestinal protection by quercetin against indomethacin-induced damage: role of NF- κ B and Nrf2. *J. Nutr. Biochem.* 27:289-298).
- **PORTER, S.A.; MASSARO, J.M.; HOFFMANN, U.; VASAN, R.S.; O'DONNELL, C.J.; FOX, C.S.** 2009. Abdominal subcutaneous adipose tissue: a protective fat depot?. *Diabetes care.* 32(6):1068-1075.
- **POWELL, E.; KUHN, P.; XU, W.** 2007. Nuclear receptor cofactors in PPAR γ -mediated adipogenesis and adipocyte energy metabolism. *PPAR Res.* 2007:53843.
- **PUIGSERVER, P.; SPIEGELMAN, B.** 2003. Peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator 1 α (PGC-1 α): transcriptional coactivator and metabolic regulator. *Endocr. Rev.* 24(1):78-90.
- **RELLING, D.; ESBERG, L.; FANG, C.; JOHNSON, W.; MURPHY, E.; CARLSON, E.; SAARI, J.; REN, J.** 2006. High-fat diet-induced juvenile obesity leads to cardiomyocyte dysfunction and upregulation of Foxo3a transcription factor independent of lipotoxicity and apoptosis. *J. Hypertens.* 24:549-561.
- **ROMACHO, T.; ELSÉN, M.; RÖHRBORN, D.; ECKEL, J.** 2014. Adipose tissue and its role in organ crosstalk. *Acta Physiol.* 210(4): 733–753.

- **RONG, J.; QIU, Y.; HANSEN, M.; ZHU, L.; ZHANG, V.; XIE, M.; OKAMOTO, Y.; MATTIE, M.; HIGASHIYAMA, H.; ASANO, S.; STRUM, J.; RYAN, T.** 2007. Adipose mitochondrial biogenesis is suppressed in db/db and high-fat diet-fed mice and improved by rosiglitazone. *Diabetes*. 56(7):1751-1760.
- **RONNEBAUM, S.; PATTERSON, C.** 2010. The FoxO family in cardiac function and dysfunction. *Annu. Rev. Physiol.* 72:81-94.
- **SCALBERT, A.; MANACH, C.; MORAND, C.; REMESY, C.; JIMENEZ, L.** 2005. Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 45(4):287-306.
- **SANHUEZA, J.; VALENZUELA, A.** 2012. Nutrigenómica: revelando los aspectos moleculares de una nutrición personalizada. *Rev. Chil. Nutr.* 39(1):71-85.
- **SAVAGE, D.** 2005. PPAR γ as a metabolic regulator: insights from genomics and pharmacology. *Expert. Rev. Mol. Med.* 7(1):1-16.
- **SEMPLE, R.; CROWLEY, V.; SEWTER, C.; LAUDES, M.; CHRISTODOULIDES, C.; CONSIDINE, R.; VIDAL-PUIG, A.; O'RAHILLY, S.** 2004. Expression of the thermogenic nuclear hormone receptor coactivator PGC-1 α is reduced in the adipose tissue of morbidly obese subjects. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* 28(1):176-179.
- **SENGUPTA, A.; MOLKENTIN, J.; PAIK, J.; DEPINHO, R.; YUTZEY, K.** 2011. FoxO transcription factors promote cardiomyocyte survival upon induction of oxidative stress. *J. Biol. Chem.* 286(9):7468-7478.
- **SHAKERI-MANESCH, S.; ZEYDA, M.; HUBER, J.; LUDVIK, B.; PRAGER, G.; STULNIG, T.** 2009. Diminished upregulation of visceral adipose heme oxygenase-1 correlates with waist-to-hip ratio and insulin resistance. *Int. J. Obes. (Lond).* 33(11):1257-1264.
- **SHARMA, R.; ALONSO, L.** 2014. Lipotoxicity in the pancreatic beta cell: not just survival and function, but proliferation as well?. *Curr. Diab. Rep.* 14(6):492-506.
- **SHEN, Y.; WARD, N.C.; HODGSON, J.M.; PUDDEY, I.B.; WANG, Y.; ZHANG, D.; MAGHZAL, G.J.; STOCKER, R.; CROFT, K.D.** 2013. Dietary quercetin attenuates oxidant-induced endothelial dysfunction and atherosclerosis in apolipoprotein E knockout mice fed a high-fat diet: A critical role for heme oxygenase-1. *Free Radic. Biol. Med.* 65:908-915.
- **SON, Y.; LEE, J.; CHEONG, Y.; CHUNG, H.; PAE, H.** 2013. Antidiabetic Potential of the Heme Oxygenase-1 Inducer Curcumin Analogues. *J. Biomed. Biotechnol.* 2013: 1-7.

- **STEWART, L.; SOILEAU, J.; RIBNICKY, D.; WANG, Z.; RASKIN, I.; POULEV, A.; MAJEWSKI, M.; CEFALU, W.; GETTYS, T. 2008.** Quercetin transiently increases energy expenditure but persistently decreases circulating markers of inflammation in C57BL/6J mice fed a high-fat diet. *Metabolism*. 57:S39-S46.
- **STAVRIC, B. 1994.** Quercetin in our diet: from mutagen to probable anticarcinogen. *Clin. Biochem*. 27(4):245-248. (citado por Carrasco-Pozo, C.; Castillo, R.L.; Beltrán, C.; Miranda, A.; Fuentes, J.; Gotteland, M. 2016. Molecular mechanisms of gastrointestinal protection by quercetin against indomethacin-induced damage: role of NF-kB and Nrf2. *J. Nutr. Biochem*. 27:289-298).
- **TAO, R.; XIONG, X.; DEPINHO, R.; DENG, C.; DONG, X. 2013.** Hepatic SREBP-2 and cholesterol biosynthesis are regulated by FoxO3 and Sirt6. *J. Lipid Res*. 54(10):2745-2753.
- **VIDAL-PUIG, A.; JIMENEZ-LIÑAM, M.; LOWELL, B.; HAMANN, A.; HU, E.; SPIEGELMAN, B.; FLIER, J.; MOLLER, D. 1996.** Regulation of PPAR gamma gene expression by nutrition and obesity in rodents. *J. Clin. Invest*. 97(11):2553-2561.
- **WANG, S.; MOUSTAID-MOUSSA, N.; CHEN, L.; MO, H.; SHASTRI, A.; SU, R.; BAPAT, P.; KWUN, I.; SHEN, C. 2014.** Novel insights of dietary polyphenols and obesity. *J. Nutr. Biochem*. 25(1):1-18.
- **WELTERS, H.; OUAAMARI, A.; KAWAMORI, D.; MEYER, J.; HU, J.; SMITH, D.; KULKARNI, R. 2012.** Rosiglitazone promotes PPAR γ -dependent and – independent alterations in gene expression in mouse islets. *Endocrinology*. 153(10):4593-4599.
- **WU, M.; HO, Y.; YET, S. 2011.** A Central Role of Heme Oxygenase-1 in Cardiovascular Protection. *Antioxid. Redox Signal*. 15(7):1835-1846.
- **YOUL, E.; BARDY, G.; MAGOUS, R.; CROSS, G.; SEJALON, F.; VIRSOLVY, A.; RICHARD, S.; QUIGNARD, J.; GROSS, R.; PETIT, P.; BATAILLE, D.; OIRY, C. 2010.** Quercetin potentiates insulin secretion and protects INS-1 pancreatic b-cells against oxidative damage via the ERK1/2 pathway. *Br. J. Pharmacol*. 161(4):799-814.