

## Artículo Original / Original Article

### El consumo de un extracto de calafate (*Berberis microphylla*) modifica marcadores de respuesta inmune en ratones delgados y obesos

### Consumption of a calafate (*Berberis microphylla*) extract of modifies markers of immune response in lean and obese mice

Francisca Concha F<sup>1</sup>. <https://orcid.org/0000-0003-3590-1629>  
 Vanessa Villanueva V<sup>1</sup>. <https://orcid.org/0000-0002-7781-0517>  
 Karla Vasquez<sup>1</sup>. <https://orcid.org/0000-0003-2764-575X>  
 Juan Francisco Orellana<sup>1,2</sup>. <https://orcid.org/0000-0001-8033-0621>  
 Lucas Escobillana<sup>2</sup>. <https://orcid.org/0000-0003-2035-7827>  
 Aline Mendez<sup>2</sup>. <https://orcid.org/0000-0002-1059-8515>  
 Misare Soto<sup>2</sup>. <https://orcid.org/0000-0001-8233-7931>  
 Andres Stevenson<sup>2</sup>. <https://orcid.org/0000-0002-1343-6570>  
 Paz Meneses<sup>2</sup>. <https://orcid.org/0000-0002-5137-6492>  
 Valentina Cid<sup>2</sup>. <https://orcid.org/0000-0001-9965-4984>  
 Monserrat Delgado M<sup>2</sup>. <https://orcid.org/0000-0001-6279-5126>  
 Loreto F Fuenzalida<sup>3</sup>. <https://orcid.org/0000-0002-9570-6043>  
 Diego F Garcia-Diaz<sup>\*</sup>. <https://orcid.org/0000-0002-7551-0553>

1. Departamento de Nutrición, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, Santiago, Chile.
2. Escuela de Nutrición, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, Santiago, Chile.
3. Instituto de Ciencias Biomédicas, Universidad Autónoma de Chile, Santiago, Chile.

\*Dirigir correspondencia: Diego F García-Díaz,  
 Facultad de Medicina, Universidad de Chile,  
 Av. Independencia, Independencia, Santiago, Chile.  
 E-mail: digarcia@uchile.cl; dgarcia@med.uchile.cl

Este trabajo fue recibido el 26 de mayo de 2020.  
 Aceptado con modificaciones: 07 de septiembre de 2020.  
 Aceptado para ser publicado: 27 de octubre de 2020.

#### RESUMEN

La obesidad ha sido identificada como factor de riesgo de severidad de infecciones respiratorias. Apoyar la respuesta inmune en sujetos obesos es de interés. El presente trabajo evaluó el efecto del consumo de un extracto de calafate sobre marcadores de respuesta inmune en ratones delgados y obesos. Ratones C57BL/6J machos fueron expuestos por 82 días a dieta estándar (DE) y alta en grasas (DAG). A un subgrupo de ambos grupos, se les administró 50 y 100 mg [polifenoles totales]/kg peso de animal/día, de extracto, en las últimas dos semanas. Se evaluó expresión génica y secreción de marcadores de respuesta inmune, en tejido pulmonar y plasma. Se observó un efecto del tratamiento con extracto en la expresión de IFN- $\gamma$ . Se observaron efectos inducidos por la DAG y el tratamiento con extracto de manera independiente, en la expresión de IL-12. Se observó un efecto global de la DAG sobre IFN- $\gamma$  plasmático, específicamente una disminución en animales alimentados con DAG. Se observó una interacción entre la dieta y el tratamiento con extracto sobre IL-12 plasmática. El tratamiento utilizado modula marcadores que activan la respuesta inmune ante infecciones respiratorias principalmente de origen viral, en animales delgados y obesos. Palabras clave: Obesidad; Polifenoles; Respuesta anti-viral.

#### ABSTRACT

Obesity has been identified as a risk factor for severity of respiratory infections. Thus, the support of the immune response in obese subjects is of interest. The present work evaluated the effect of the consumption of a calafate extract on markers

*of the immune response in lean and obese mice. Male C57BL/6J mice were exposed for 82 days to a standard or a high-fat diet (HFD). A subgroup of both groups was given 50 and 100 mg [total polyphenols]/kg body weight/day of extract in the last two weeks. Gene expression and secretion of immune response markers were evaluated in lung tissue and plasma. An effect of extract treatment on IFN- $\gamma$  expression was observed. Effects induced by the HFD and treatment with extract were observed independent of the expression of IL-12. An overall effect of the HF diet on plasma IFN- $\gamma$  was observed, specifically a decrease in animals fed the HFD. An interaction between diet and extract treatment was observed over plasma IL-12. The treatment used modulates markers that activate the immune response to respiratory infections, mainly of viral origin, in lean and obese animals.*

*Keywords: Anti-viral response; Obesity; Polyphenols.*

## INTRODUCCIÓN

Uno de los aspectos que más afectan al diario vivir de cada individuo es el aumento del peso corporal. A pesar de que el ser humano necesita de la presencia de tejido graso en su organismo, cuando éste se desarrolla de forma excesiva se acarrea consecuencias muy perjudiciales para la salud<sup>1</sup>. El tejido adiposo se vuelve disfuncional, aumentando considerablemente la secreción de ácidos grasos libres al sistema, junto con la desregulación de la liberación de otras moléculas que actúan a nivel auto-, para- y endocrino<sup>2</sup>. El desajuste en la secreción de estas sustancias determina el establecimiento de un estado pro-inflamatorio dañino para las células de este tejido, y que se ha descrito clave para el desarrollo de co-morbilidades<sup>3</sup>.

Por otro lado, las infecciones respiratorias agudas (IRA) son una de las enfermedades infecciosas más frecuentes del ser humano, representando una importante causa de morbilidad tanto en pediatría como en adultos mayores y pacientes inmunodeprimidos, a pesar de los notables avances en los agentes terapéuticos, herramientas diagnósticas y modalidades de cuidados intensivos. Estudios recientes han demostrado tanto en adultos<sup>4</sup>, como en niños<sup>5</sup>, que la obesidad induce la disfunción de las respuestas en el tracto respiratorio, aumentando la susceptibilidad a infecciones bacterianas y virales, así como también a un curso más grave de estas enfermedades. De esta forma, el rápido aumento de la prevalencia de la obesidad probablemente dará como resultado morbilidad asociada con infecciones. Poco se conoce acerca de los mecanismos que sustentan el aumento de la susceptibilidad a consecuencias graves de pacientes obesos con agentes infecciosos. Por un lado, se sabe que la obesidad afecta negativamente la mecánica pulmonar, comprometiendo principalmente la estructura y función de músculos respiratorios, la capacidad ventilatoria y la función inmune<sup>6</sup>. Sin embargo, pruebas recientes sugieren que el efecto inmunomodulador de la obesidad puede desempeñar un rol significativo en el resultado de una infección respiratoria viral. Así, la inflamación descrita durante el desarrollo de obesidad parece jugar un rol fundamental para un peor curso clínico de la enfermedad respiratoria. El sobrecrecimiento del tejido adiposo blanco (TAB) lleva a una desregulación en la producción de compuestos endógenos del tejido, los cuales a menudo presentan propiedades pro-inflamatorias, como por ejemplo TNF- $\alpha$ , IL-6, resistina, leptina, óxido nítrico y MCP-1. Además, el crecimiento excesivo del TAB lleva a la inhibición en la secreción de productos anti-inflamatorios, como la adiponectina<sup>7</sup>.

Así, el desarrollo de obesidad comprende un importante componente inmunomodulador, por lo que no es difícil pensar en la asociación entre esta patología y la enfermedad respiratoria. Frente a una infección viral, tanto el sistema inmune adaptativo como el innato son vitales para proveer una respuesta efectiva, especialmente la respuesta innata, si se consideran patógenos de cepas con que previamente el organismo no se ha visto infectado. Tras el reconocimiento del patógeno por patrones celulares vía receptor, como el receptor tipo toll (TLR) y el receptor tipo Rig-1 (RLR), se produce la liberación de moléculas proinflamatorias antivirales (IFNs). Estas últimas inducen la expresión de genes para proteger las células infectadas y no infectadas. Por lo tanto, un estado atenuado de IFN predispondría a una peor evolución por infección viral. Individuos con asma, por ejemplo, se han descrito que presentan mayor predisposición de infección por rinovirus, sufriendo síntomas más severos y duraderos<sup>8</sup>, y esto se ha relacionado con un déficit en IFN $\alpha$ /b e IFN- $\gamma$  en células epiteliales bronquiales de estos individuos. De esta forma, un estado deficiente de IFN podría explicar la relación entre enfermedades respiratorias y variados factores de riesgo, entre ellos, posiblemente obesidad.

Smith y colaboradores infectaron ratones con obesidad inducida por dieta con una cepa de virus de influenza A, y observaron una mayor mortalidad en los animales obesos respecto a los delgados, además de patología pulmonar<sup>9</sup>. Esto se correlacionó con menor citotoxicidad de células natural killers, y una menor expresión génica de IFN $\alpha$ /b, de citoquinas proinflamatorias (IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ ) y quimioattractantes (MCP-1 y RANTES).

Por otro lado, también se ha descrito que el estado nutricional afecta a la presencia y comportamiento de células del sistema inmune adaptativo<sup>10</sup>, lo que se ha relacionado con menores niveles de receptor de IL-2, de granzima B e IFN- $\gamma$ . Estas observaciones sugieren que la obesidad puede resultar efectivamente en un menoscabo de la defensa del hospedero. Toda esta evidencia llama al diseño de diversas estrategias novedosas, siendo una de estas el desarrollo de herramientas paliativas para poder dar frente a la conexión de la "inmunodepresión" inducida por obesidad y la presencia y gravedad de enfermedades respiratorias.

En este sentido, se ha descrito previamente las propiedades inmunomoduladoras de compuestos antioxidantes. Por ejemplo, se han reportado posibles efectos beneficiosos de algunas especies antioxidantes como la vitamina E y el resveratrol<sup>11,12</sup>. De hecho, respecto a la influenza, numerosas

publicaciones han emergido en donde se han reportado efectos inmunomoduladores (potenciadores) del consumo de polifenoles específicos o extractos ricos en estos compuestos<sup>13</sup>. Por lo tanto, la evidencia existente indica que principalmente polifenoles (y también matrices alimentarias ricas en estos compuestos), tienen un alto potencial para ser considerados en profilaxis o tratamiento para atenuar incidencia o gravedad de enfermedad respiratoria. Se ha reportado que extractos de calafate (*Berberis microphylla*) presentan un importante contenido de polifenoles, especialmente antocianinas, las que se han correlacionado con un alto potencial antioxidante<sup>14</sup>. El calafate es perteneciente a la familia berberidaceae, y es nativo de la Patagonia Chilena y Argentina. Es un arbusto o árbol pequeño, siempre verde o semi-siempre verde, que crece en una amplia gama de condiciones ambientales. Sus frutos son de color púrpura oscuro, negro o azulado<sup>15</sup>. Se ha comparado el contenido de polifenoles del fruto del calafate con el de otros berries nativos de Chile, que crecen en las mismas zonas, y con la mayoría de las frutas y verduras consumidas en nuestro país, siendo el fruto de esta especie el que posee el mayor contenido estos compuestos<sup>14</sup>.

Actualmente a nivel nacional, no existen aproximaciones respecto a su uso para protección frente a enfermedad respiratoria. En trabajos realizados en nuestro laboratorio, hemos reportado que extractos del fruto del calafate presenta importantes propiedades de tipo inmune, inhibiendo la expresión y secreción de marcadores de inflamación en macrófagos y adipocitos<sup>16,17</sup>, y en animales obesos<sup>18</sup>. El presente estudio busca evaluar el efecto de un tratamiento con un extracto de calafate, rico en polifenoles, sobre marcadores de capacidad de respuesta inmune en ratones delgados y obesos.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Preparación del extracto de calafate

El extracto de calafate se preparó con muestras proveídas por el Laboratorio de Fisiología y Genética del Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA, Chile). Las muestras corresponden de plantas mantenidas en condiciones controladas, con la mejor proyección de manejo agrícola, lo cual asegura la homogeneidad en la muestra procesada. Se masaron aprox. 500 g de fruta fresca los cuales fueron secados a 40 °C por 72 horas. Una vez secos, fueron pulverizados y pesados. Posteriormente se efectuó la extracción mediante una solución de metanol/agua (50/50 v/v) a razón 5:1 en relación a los gramos de fruta seca pesada. Se maceró por 24 horas con agitación constante, luego el metanol fue evaporado con rotavapor (Buchi R-300, Ciudad de Mexico, Mexico) a 40 °C. El extracto fue cargado a una columna de Amberlite XAD7HP (Sigma-Aldrich, San Luis, EE.UU.). Para su purificación fue pre-aclimatado con agua acidificada al 0,1% HCl. Los compuestos fenólicos fueron eluidos con metanol acidificado al 0,01% con HCl. El extracto eluido fue concentrado en un rotavapor a 40 °C, a una velocidad de 100 rpm hasta eliminar completamente el alcohol y, finalmente, fue resuspendido en un volumen conocido con agua desionizada y almacenado a -20 °C para uso posterior. Todos los protocolos fueron efectuados de acuerdo a Reyes-Farias y cols<sup>17</sup>, con modificaciones. Se cuantificó el contenido de polifenoles totales

del extracto obtenido por método colorimétrico<sup>19</sup> y expresado como miligramos de equivalente de ácido gálico (mg EAG), registrando una concentración de 1026,1 mg EAG/100 g peso seco de la muestra en el extracto utilizado. Previamente nuestro grupo de investigación ha descrito el contenido de antocianinas totales (31,5 ± 0,8 mg cianidin-3-glucósido/100 peso seco), capacidad antioxidante (por FRAP: 11,7 mg Fe<sup>+2</sup>/100 g peso seco), y contenido de antocianinas principales (21,6 mg/100 g peso seco de petunidina-3-glucosido, 14,7 mg/100 g peso seco de delphinidina-3-glucosido, y 1,7 mg/100 g peso seco de cianidina-3-glucosido, y otros) en extractos de frutos de esta misma especie<sup>16,17</sup>.

### Mantenimiento y tratamiento de animales

Los animales fueron mantenidos de acuerdo a lo descrito previamente<sup>18</sup>. Ratones C57BL/6J machos de ocho semanas de edad (n= 50; de alrededor de 20 g de peso corporal), fueron obtenidos desde el Bioterio del Departamento de Nutrición. Los animales fueron mantenidos en condiciones controladas de temperatura (21–23 °C) con ciclos de luz/oscuridad de 12 h (lucos se apagan a las 8 pm), en jaulas de acrílico en una densidad no mayor a cuatro animales/jaula. Los animales fueron distribuidos en seis grupos: 1) alimentados con dieta estándar (DE, Champion; 26% grasa) por todo el periodo experimental (n= 7); 2) alimentados con DE por todo el periodo experimental, y en paralelo suministrados con 50 mg [polifenoles totales]/kg de peso de animal/día de extracto de calafate en el agua de bebida en las últimas dos semanas de tratamiento (n= 7); 3) alimentados con DE por todo el periodo experimental, y en paralelo suministrados con 100 mg (polifenoles totales (PT))/kg de peso de animal/día de extracto de calafate en las últimas dos semanas de tratamiento (n= 8); 4) alimentados con dieta alta en grasas (DAG, 62% grasa<sup>18</sup>) por todo el periodo experimental (n= 9); 5) alimentados con DAG por todo el periodo experimental, y en paralelo suministrados con 50 mg [polifenoles totales]/kg de peso de animal/día de extracto de calafate en las últimas dos semanas de tratamiento (n=9); 6) alimentados con DAG por todo el periodo experimental, y en paralelo suministrados con 100 mg (PT)/kg de peso de animal/día de extracto de calafate en las últimas dos semanas de tratamiento (n= 10). Los animales tratados con calafate tuvieron acceso *ad libitum* a la bebida con el extracto. La ingesta de bebida fue registrada cada dos días. Con esta información, junto con el peso corporal, se ajustó la dosis recibida de extracto por cada jaula, por las dos semanas de tratamiento. Tras el periodo experimental (82 días), los animales fueron anestesiados y sacrificados. Muestras de sangre y tejidos fueron obtenidos para estudios posteriores.

### Expresión génica

Al finalizar el tratamiento, los pulmones de los animales fueron aislados en forma aséptica. El ARN total de dicho tejido fue extraído de cada muestra mediante el uso de Trizol (Invitrogen). El ARN purificado fue tratado con ADNasa I (DNAfree kit; Ambion) y se utilizó para generar ADNc (Applied Biosystems). El ADNc resultante fue amplificado para la detección de los niveles de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-2, IL-6, IL-12 mediante

PCR a tiempo real utilizando tecnología SYBR Green (Agilent Technologies), con partidores y condiciones de PCR descritas previamente<sup>20</sup>. La PCR a tiempo real fue desarrollada en un equipo Stratagene Mx3000P System (Agilent Technologies) según las instrucciones del fabricante. Todos los niveles de expresión fueron normalizados por la expresión del gen de  $\beta$ -actina como control interno. El cambio en la expresión de los genes fue calculado mediante el método del  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ .

### Análisis de secreción de marcadores

Finalmente, se evaluaron las concentraciones séricas de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-2, IL-6, IL-12 través de tecnología Luminex (Merckmillipore; disponible en el Departamento de Virología, Universidad de Chile).

### Análisis estadístico

Los datos de peso corporal inicial, final y pesos de tejidos adiposos, entre los grupos de animales alimentados con DE y los animales alimentados con DAG, fueron analizados con t de Student. Los datos de expresión génica y de presencia de proteínas en suero, para los 6 grupos experimentales, fueron analizados con ANOVA 2x2, con posthoc de Sidak para analizar diferencias entre los grupos de animales alimentados con dietas distintas bajo la misma dosis de extracto, y con posthoc de Dunnett para analizar diferencias entre las dosis de extracto en cada grupo de animales alimentados con dieta diferente. Adicionalmente, se realizó un ANOVA de una vía en los grupos de animales alimentados con DE y los animales alimentados con DAG de forma independiente, seguido de posthoc de Dunnett. En todos los casos determinó una probabilidad de  $p < 0,05$  para identificar diferencias estadísticamente significativas. El análisis fue realizado utilizando el paquete estadístico Graphpad prism 8.0 (San Diego, EE.UU.).

## RESULTADOS

Al finalizar el experimento, los animales alimentados con DAG respecto a los controles presentaron mayor peso final ( $p < 0,01$ ), glicemia en ayunas ( $p < 0,001$ ), y peso de distintos depósitos de tejido adiposo blanco (epididimal, retroperitoneal y subcutáneo; todos  $p < 0,001$ ), lo que confirma la obtención del modelo de obesidad (Tabla 1).

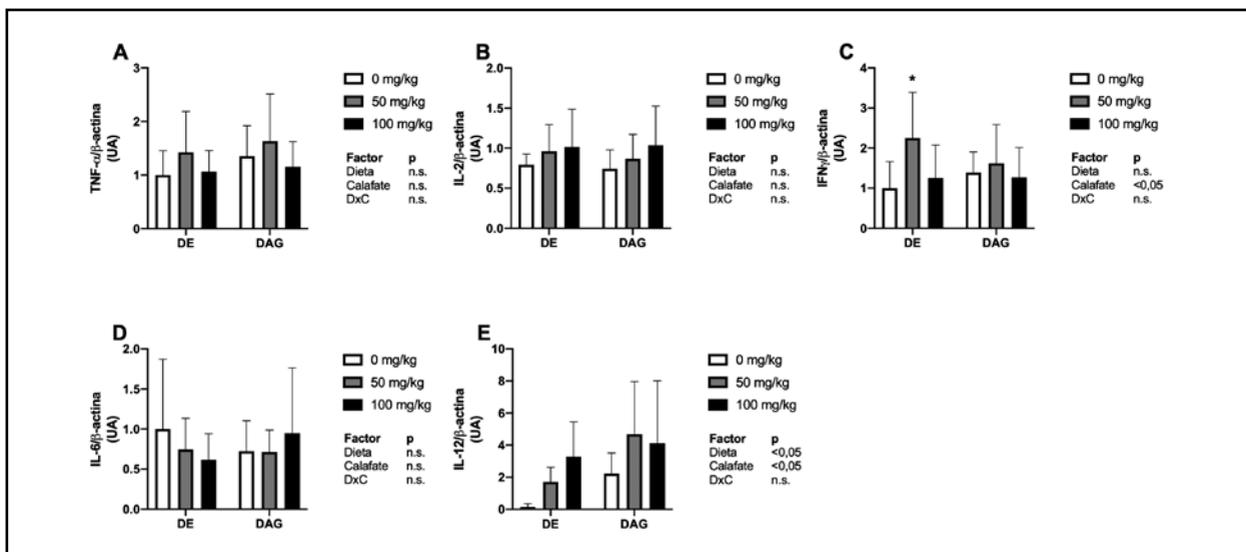
En relación a los niveles de expresión génica de marcadores de respuesta inmune en pulmón (Figura 1), se observó un efecto global del tratamiento con extracto en la expresión de IFN- $\gamma$  ( $p < 0,05$ ) (Figura 1C). Este efecto fue probablemente debido al aumento significativo de expresión en los animales controles tratados con 50 mg [PT]/kg peso de animal, de extracto, respecto a los animales controles sin tratamiento ( $p < 0,01$ , posthoc Dunnett). También se observaron efectos significativos inducidos por la DAG ( $p < 0,05$ ) y el tratamiento con extracto ( $p < 0,05$ ) de manera independiente, en la expresión de IL-12 (Figura 1E), probablemente debido al alza en los niveles inducidos por ambos tratamientos. Adicionalmente, al realizar un ANOVA de una vía de manera independiente en los animales alimentados con DE, se observa un aumento significativo de los animales tratados con 100 mg [PT]/kg peso de animal, de extracto, respecto a los animales sin tratamiento ( $p < 0,01$ ). No se observan diferencias significativas en los otros genes analizados.

Finalmente, respecto a los niveles séricos de estos marcadores de respuesta inmune incluidos en el presente estudio (Figura 2), se observó un efecto global de la DAG sobre la presencia de IFN- $\gamma$  ( $p < 0,01$ ) (Figura 2C). Este hecho se confirmó al realizar el posthoc para comprobar efectos de la dieta en cada concentración de extracto, observándose una disminución significativa en los niveles de este marcador en los animales alimentados con DAG (sin tratamiento con extracto) versus animales alimentados con DE (sin tratamiento con extracto) ( $p < 0,01$ , posthoc Sidak). Al analizar el efecto particular del extracto se observó una disminución significativa en los animales controles tratados con 100 mg [PT]/kg peso de animal, de extracto, en relación a los animales controles sin tratamiento de extracto ( $p < 0,05$ , posthoc Dunnett). Adicionalmente se realizó un ANOVA de una vía de manera independiente en cada grupo de animales alimentados con DE y DAG, detectándose solamente una tendencia ( $p = 0,06$ ) en los animales alimentados con DAG. Además, se observó un efecto global significativo en los niveles de IL-6 ( $p < 0,05$ ), sin diferencias particulares entre grupos (Figura 2D). Finalmente, se observó una interacción entre los efectos del tratamiento con dieta y el tratamiento con extracto ( $p < 0,05$ ), en los niveles de IL-12 (Figura 2E), nuevamente sin detectarse diferencias particulares entre los grupos experimentales.

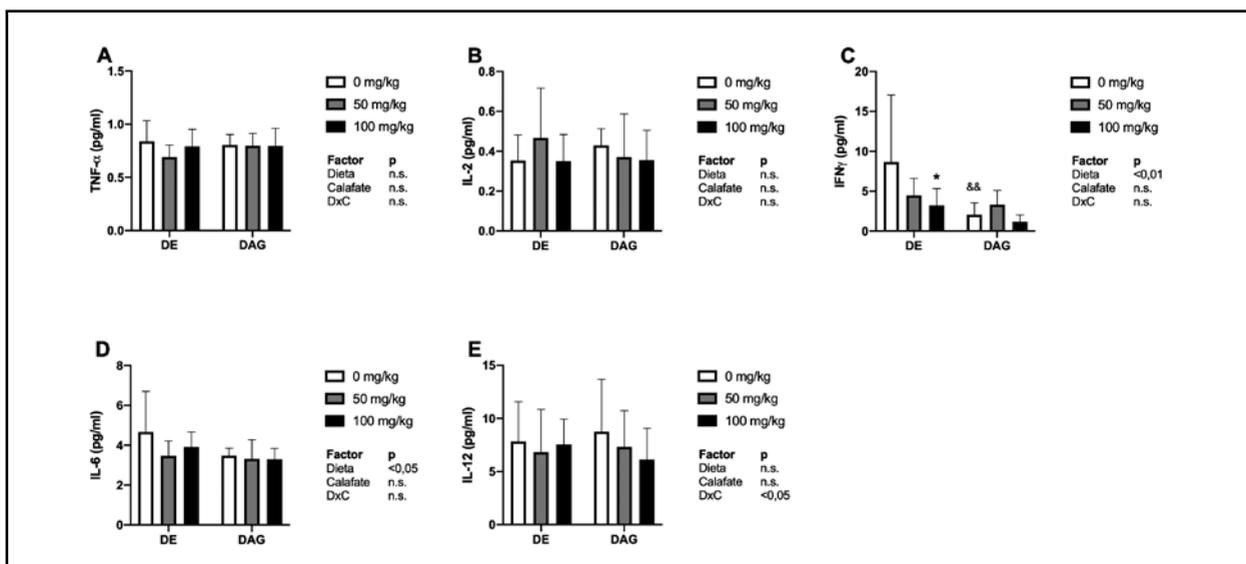
**Tabla 1.** Peso corporal inicial, final y pesos de tejidos adiposos de los animales.

	DE	DAG
Peso inicial (g)	20,7 $\pm$ 0,4	21,0 $\pm$ 3,0
Peso final (g)	29,1 $\pm$ 1,9	32,2 $\pm$ 4,3**
Glicemia en ayunas (mg/dl)	147,5 $\pm$ 27,8	182,1 $\pm$ 33,8***
Tejido adiposo epididimal (mg)	276,7 $\pm$ 85,1	919,6 $\pm$ 477,3***
Tejido adiposo retroperitoneal (mg)	33,9 $\pm$ 13,3	161,4 $\pm$ 103,1***
Tejido adiposo subcutáneo (mg)	79,3 $\pm$ 19,4	201,8 $\pm$ 102,7***

n= 22-28; DE, dieta estándar; DAG, dieta alta en grasas; \*\*,  $p < 0,01$ ; \*\*\*,  $p < 0,001$  (t Student)



**Figura 1:** Análisis de expresión génica de marcadores de inflamación en pulmón de los animales. Los niveles de expresión génica de los marcadores de inflamación TNF- $\alpha$  (A), IL-2 (B), IFN- $\gamma$  (C), IL-6 (D) e IL-12 (E), fueron analizados por RT-PCR. Todos los niveles de expresión fueron corregidos por  $\beta$ -actina. Datos: n = 7-10 por grupo, fueron analizados con ANOVA 2x2, con posthoc de Sidak para analizar diferencias entre los grupos de animales alimentados con dietas distintas bajo la misma dosis de extracto de calafate, y con posthoc de Dunnett para analizar diferencias entre las dosis de extracto en cada grupo de animales alimentados con dieta diferente de forma independiente (en relación al respectivo control sin dosis de extracto). DE, dieta estándar; DAG, alta en grasas; UA, unidades arbitrarias; D, dieta; C, calafate; n.s., no significativo; \*, p<0,05 (Dunnett).



**Figura 2:** Análisis de niveles proteicos en suero de marcadores de inflamación de los animales. Los niveles séricos de marcadores de inflamación TNF- $\alpha$  (A), IL-2 (B), IFN- $\gamma$  (C), IL-6 (D) e IL-12 (E) (todos en pg/ml), fueron analizados por LUMINEX. Datos: n = 7-10 por grupo, fueron analizados con ANOVA 2x2, con posthoc de Sidak para analizar diferencias entre los grupos de animales alimentados con dietas distintas bajo la misma dosis de extracto de calafate, y con posthoc de Dunnett para analizar diferencias entre las dosis de extracto en cada grupo de animales alimentados con dieta diferente de forma independiente (en relación al respectivo control sin dosis de extracto). DE, dieta estándar; DAG, alta en grasas; UA, unidades arbitrarias; D, dieta; C, calafate; n.s., no significativo; \*, p<0,05 (Dunnett); &&, p<0,01 (Sidak).

## DISCUSIÓN

Se ha descrito a la obesidad como factor de riesgo de gravedad y duración de enfermedad respiratoria<sup>5</sup>. Aparentemente el estado de inflamación crónica presente en obesidad parece ser el link con esta predisposición<sup>21</sup>. Se ha descrito que el consumo crónico de una dieta alta en grasas efectivamente induce la activación de mecanismos moleculares de inflamación, especialmente relacionados con el aumento de actividad del factor nuclear κB (NFκB)<sup>22</sup>. En este sentido, la búsqueda de herramientas naturales con propiedades anti-inflamatorias, cobra un alto interés. El fruto del calafate, especie nativa de nuestro país, se ha descrito como una fuente rica en compuestos antioxidantes con propiedades anti-inflamatorias<sup>16,17</sup>. En el presente trabajo se analizó la capacidad de un tratamiento con un extracto de calafate, en ratones delgados y obesos, de modular marcadores de respuesta anti-viral.

Respecto a nuestros datos, no se observan efectos de la dieta administrada sobre la expresión génica de marcadores de inflamación en tejido pulmonar. No obstante, sí se observa una disminución significativa de los niveles en sangre de IFN-γ en los animales alimentados con DAG respecto a los animales alimentados con DE. De acuerdo a lo descrito por literatura previa, la disminución en los niveles de IFN-γ aparece como el marcador más recurrente que indica respuesta inmune deteriorada<sup>23</sup>. Es conocido que un aumento en la adiposidad corporal es habitualmente acompañado de un estado de inflamación crónica de bajo grado en el tejido adiposo<sup>24</sup>. Aparentemente este estado puede modificar el estado de defensa del hospedero<sup>10</sup>. Se ha descrito que sujetos obesos presentan niveles disminuidos de linfocitos T CD8+ e incrementados o disminuidos de T CD4+, comparados con sujetos normopesos en la circulación<sup>25</sup>. Más aún, se ha descrito que animales genéticamente obesos presentan atrofia a nivel del timo, por lo tanto, una disminución en las poblaciones de células T circulares y en el bazo<sup>26</sup>, además de una reducción en la actividad NK y, por tanto, una disminución en la respuesta frente a la presentación de antígenos<sup>27</sup>. También, se ha descrito que la exposición crónica a proteínas pro-inflamatorias derivadas de TAB puede derivar en una desensibilización de células inmunes a estímulos pro-inflamatorios durante una infección<sup>28</sup>. Este estado atenuado de IFN-γ predispondría a una peor evolución por infección viral. Por otro lado, también se ha descrito que el estado nutricional afecta a la presencia y comportamiento de células del sistema inmune adaptativo. Karlsson y colaboradores<sup>26</sup> evaluaron cómo se comportaron ratones BL6 con obesidad inducida por el consumo de dieta alta en grasas tras desafío con virus influenza AH1N1 2009. Observaron que estos ratones presentaron un 25% más de mortalidad, 25% más de patología pulmonar y entre 10-100 veces más títulos virales en el pulmón que sus contrapartes delgadas. También observaron menor respuesta IFN-γ y menor número de linfocitos T CD8+ específicos para influenza. Al aislar estas células, reportaron que presentaban una respuesta menor frente a células

presentadoras de antígenos de influenza *in vitro*, en términos de liberación de IFN-γ.

Se ha reportado que extractos de calafate presentan un importante contenido de polifenoles, especialmente antocianinas, las que se han correlacionado con un alto potencial antioxidante (29). Se ha descrito que los compuestos fenólicos mayoritarios en el fruto del calafate son principalmente antocianinas en sus formas glicosiladas<sup>29,30</sup>. El alto contenido de estos compuestos se ha correlacionado con una gran capacidad antioxidante. De hecho, el ORAC para este fruto se ha determinado en 25662±3322 μmol ET/100 g de peso fresco, lo que destaca importantemente por sobre el resto de alimentos de origen vegetal consumidos en Chile<sup>14</sup>. Por otro lado, se ha descrito ampliamente en el panorama científico internacional las propiedades inmunomoduladoras de compuestos antioxidantes<sup>31</sup>. Como ya se comentó, los flavonoides podrían reducir la incidencia de las infecciones respiratorias del tracto superior. Por lo tanto, es debido al alto contenido de estos compuestos en el calafate, lo que lo hace merecedor de estudio en estos aspectos. En el presente estudio, se observó un aumento significativo inducido por el tratamiento con extracto en la expresión de ARNm de IFN-γ e IL-12 en pulmón. En este sentido, se ha descrito ampliamente el potencial de especies polifenólicas frente a infecciones respiratorias. Dentro de estas especies, el resveratrol ha sido el más analizado. Por ejemplo, se ha descrito que posee propiedades anti-inflamatorias tras infección con VRS, inhibiendo una respuesta descontrolada frente al virus *in vitro*<sup>32</sup> y en ratón BALB/c<sup>33</sup>. Por otro lado, González-Gallego y colaboradores proponen que los flavonoides podrían reducir la incidencia de las infecciones respiratorias del tracto superior debido a una gama de efectos fisiológicos en humanos, incluyendo efectos antivirales, anti-inflamatorios, citotóxicos, antimicrobianos y antioxidantes<sup>34</sup>. Además, algunos estudios proponen que los flavonoides tienen tanto un efecto antiproliferativo como antireplicativo sobre virus comunes de este tipo de infecciones<sup>35</sup>. Estos mecanismos, podrían tener el potencial de disminuir la incidencia de la infección respiratoria, que hace de los polifenoles un campo de interés actual en inmunidad<sup>36,37</sup>.

Por otro lado, se ha descrito que el extracto de propóleo (rico en antocianinas) puede estimular el sistema inmune<sup>38</sup>. Sin embargo, no se recomienda su aplicación en niños pequeños, pacientes con asma (pacientes que tienen infecciones respiratorias recurrentes) y en personas alérgicas a los productos de las abejas. Según estudios, el propóleo sería un potente alérgeno y agente sensibilizador en niños<sup>39,40</sup>. También se han realizado diversas investigaciones en los últimos años en relación al extracto de *Pelargonium sidoides* (Kaloba) respecto a sus propiedades sobre prevención de desarrollo de enfermedades respiratorias, específicamente de origen bacteriano<sup>41,42</sup>. Por último, existe un producto comercializado en Noruega (extracto rico en antocianinas) distribuido como potenciador del sistema inmune, inhibidor de la actividad viral y bloqueador de daño tisular frente a

una infección por influenza<sup>43</sup>.

En conclusión, el tratamiento con un extracto de calafate modula la expresión de marcadores relacionados con defensa antiviral en animales delgados y con obesidad inducida por el consumo de una dieta alta en grasas. Más estudios son necesarios para dilucidar el interesante rol que podría jugar este tipo de tratamiento en enfermedades respiratorias. En este sentido, estudios sobre modelos desafiados con agentes infecciosos parecen ser el paso a seguir.

**Fuente de financiamiento:** Proyecto sochinut-nestlé 2017 (schnut201).

## BIBLIOGRAFÍA

1. Bray GA. Medical consequences of obesity. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004; 89: 2583-2589.
2. Iyer A, Fairlie DP, Prins JB, Hammock BD, Brown L. Inflammatory lipid mediators in adipocyte function and obesity. *Nat Rev Endocrinol.* 2010; 6:71-82.
3. Pi-Sunyer X. The medical risks of obesity. *Postgrad Med.* 2009; 121: 21-33.
4. Jain S, Chaves SS. Obesity and influenza. *Clin Infect Dis.* 2011; 53: 422-424.
5. Arias-Bravo G, Valderrama G, Inostroza J, Reyes-Farías M, García-Díaz DF, Zorondo-Rodríguez F, et al. Overnutrition in infants is associated with high level of leptin, viral coinfection and increased severity of respiratory infections: A cross-sectional study. *Front Pediatr.* 2020; 8: 44.
6. DeMeo MT, Van de Graaff W, Gottlieb K, Sobotka P, Mobarhan S. Nutrition in acute pulmonary disease. *Nutr Rev.* 1992; 50: 320-328.
7. Ferrante AW, Jr. Obesity-induced inflammation: A metabolic dialogue in the language of inflammation. *J Intern Med.* 2007; 262: 408-414.
8. Corne JM, Marshall C, Smith S, Schreiber J, Sanderson G, Holgate ST, et al. Frequency, severity, and duration of rhinovirus infections in asthmatic and non-asthmatic individuals: a longitudinal cohort study. *Lancet.* 2002; 359: 831-834.
9. Smith AG, Sheridan PA, Harp JB, Beck MA. Diet-induced obese mice have increased mortality and altered immune responses when infected with influenza virus. *J Nutr.* 2007; 137: 1236-1243.
10. Paich HA, Sheridan PA, Handy J, Karlsson EA, Schultz-Cherry S, Hudgens MC, et al. Overweight and obese adult humans have a defective cellular immune response to pandemic H1N1 influenza A virus. *Obesity (Silver Spring).* 2013; 21: 2377-2386.
11. Bou Ghanem EN, Clark S, Du X, Wu D, Camilli A, Leong JM, et al. The alpha-tocopherol form of vitamin E reverses age-associated susceptibility to streptococcus pneumoniae lung infection by modulating pulmonary neutrophil recruitment. *J Immunol.* 2015; 194: 1090-1099.
12. Cerqueira AM, Khaper N, Lees SJ, Ulanova M. The antioxidant resveratrol down-regulates inflammation in an in-vitro model of *Pseudomonas aeruginosa* infection of lung epithelial cells. *Can J Physiol Pharmacol.* 2013; 91: 248-255.
13. Fioravanti R, Celestino I, Costi R, Cuzzucoli Crucitti G, Pescatori L, Mattiello L, et al. Effects of polyphenol compounds on influenza A virus replication and definition of their mechanism of action. *Bioorg Med Chem.* 2012; 20: 5046-5052.
14. Speisky H, Lopez-Alarcon C, Gomez M, Fuentes J, Sandoval-Acuna C. First web-based database on total phenolics and oxygen radical absorbance capacity (ORAC) of fruits produced and consumed within the south Andes region of South America. *J Agric Food Chem.* 2012; 60: 8851-8859.
15. Fredes C, Parada A, Salinas J, Robert P. Phytochemicals and traditional use of two southernmost Chilean berry fruits: Murta (*Ugni molinae* Turcz) and calafate (*Berberis buxifolia* Lam.). *Foods.* 2020; 9: 54.
16. Reyes-Farías M, Vasquez K, Ovalle-Marin A, Fuentes F, Parra C, Quiral V, et al. Chilean native fruit extracts inhibit inflammation linked to the pathogenic interaction between adipocytes and macrophages. *J Med Food.* 2015; 18: 601-608.
17. Reyes-Farías M, Vasquez K, Fuentes F, Ovalle-Marin A, Parra-Ruiz C, Zamora O, et al. Extracts of Chilean native fruits inhibit oxidative stress, inflammation and insulin-resistance linked to the pathogenic interaction between adipocytes and macrophages. *J Funct Foods.* 2016; 27: 69-83.
18. Soto-Covasich J, Reyes-Farías M, Torres RF, Vasquez K, Duarte L, Quezada J, et al. A polyphenol-rich calafate (*Berberis microphylla*) extract rescues glucose tolerance in mice fed with cafeteria diet. *J Funct Foods.* 2020; 67: 103856.
19. Singleton V, Rossi J. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagent. *Am J Enol Vitic.* 1965; 16: 144-158.
20. Kawase M, He F, Miyazawa K, Kubota A, Yoda K, Hiramatsu M. Orally administered heat-killed *Lactobacillus gasserii* TMC0356 can upregulate cell-mediated immunity in senescence-accelerated mice. *FEMS Microbiol Lett.* 2012; 326: 125-30.
21. Fuenzalida L, García Díaz DF. Obesity as a risk factor for complications during acute respiratory infections in children. *Rev Med Chile.* 2016; 144: 1177-1184.
22. Illesca P, Valenzuela R, Espinosa A, Echeverría F, Soto-Alarcon S, Ortiz M, et al. Hydroxytyrosol supplementation ameliorates the metabolic disturbances in white adipose tissue from mice fed a high-fat diet through recovery of transcription factors Nr1f2, SREBP-1c, PPAR-gamma and NF-kappaB. *Biomed Pharmacother.* 2019; 109: 2472-2481.
23. Chen YP, Zhang JH, Li CQ, Sun QX, Jiang XH. Obesity enhances Th2 inflammatory response via natural killer T cells in a murine model of allergic asthma. *Int J Clin Exp Med.* 2015; 8: 15403-15412.
24. Hevener AL, Febbraio MA, Stock Conference Working G. The 2009 stock conference report: inflammation, obesity and metabolic disease. *Obes Rev.* 2010; 11: 635-644.
25. O'Rourke RW, Kay T, Scholz MH, Diggs B, Jobe BA, Lewinsohn DM, et al. Alterations in T-cell subset frequency in peripheral blood in obesity. *Obes Surg.* 2005; 15: 1463-1468.
26. Karlsson EA, Sheridan PA, Beck MA. Diet-induced obesity impairs the T cell memory response to influenza virus infection. *J Immunol.* 2010; 184: 3127-3133.
27. Talbot HK, Coleman LA, Crimin K, Zhu Y, Rock MT, Meece J, et al. Association between obesity and vulnerability and serologic response to influenza vaccination in older adults. *Vaccine.* 2012; 30: 3937-3943.
28. Ziegler-Heitbrock HW, Wedel A, Schraut W, Strobel M, Wendelgass P, Sternsdorf T, et al. Tolerance to lipopolysaccharide involves mobilization of nuclear factor kappa B with predominance of p50 homodimers. *J Biol Chem.* 1994; 269: 17001-17004.
29. Ruiz A, Hermosin-Gutiérrez I, Mardones C, Vergara C, Herlitz E, Vega M, et al. Polyphenols and antioxidant activity of calafate (*Berberis microphylla*) fruits and other native berries from

- Southern Chile. *J Agric Food Chem.* 2010; 58: 6081-6089.
30. Pomilo A. Anthocyanins in fruits of *Berberis buxifolia*. *Phytochemistry.* 1973; 12: 218-220.
  31. Amir Aslani B, Ghobadi S. Studies on oxidants and antioxidants with a brief glance at their relevance to the immune system. *Life Sci.* 2016; 146: 163-173.
  32. Xie XH, Zang N, Li SM, Wang LJ, Deng Y, He Y, et al. Resveratrol Inhibits respiratory syncytial virus-induced IL-6 production, decreases viral replication, and downregulates TRIF expression in airway epithelial cells. *Inflammation.* 2012; 35: 1392-1401.
  33. Liu T, Zang N, Zhou N, Li W, Xie X, Deng Y, et al. Resveratrol inhibits the TRIF-dependent pathway by upregulating sterile alpha and armadillo motif protein, contributing to anti-inflammatory effects after respiratory syncytial virus infection. *J Virol.* 2014; 88: 4229-4236.
  34. Gonzalez-Gallego J, Garcia-Mediavilla MV, Sanchez-Campos S, Tunon MJ. Fruit polyphenols, immunity and inflammation. *Br J Nutr.* 2010; 104: S15-S27.
  35. Peluso I, Miglio C, Morabito G, Ioannone F, Serafini M. Flavonoids and immune function in human: A systematic review. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2015; 55: 383-395.
  36. Formica IV, Regelson W. Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids. *Food Chem Toxicol.* 1995; 33: 1061-1080.
  37. Kim SY, Chang YJ, Cho HM, Hwang YW, Moon YS. Non-steroidal anti-inflammatory drugs for the common cold. *Cochrane Database Syst Rev.* 2015: CD006362.
  38. Sforcin JM. Propolis and the immune system: A review. *J Ethnopharmacol.* 2007; 113: 1-14.
  39. Basavaiah ND, Suryakanth DB. Propolis and allergic reactions. *J Pharm Bioallied Sci.* 2012; 4: 345.
  40. Czarnobilska E, Obtulowicz K, Dyga W, Spiewak R. The most important contact sensitizers in Polish children and adolescents with atopy and chronic recurrent eczema as detected with the extended European Baseline Series. *Pediatr Allergy Immunol.* 2011; 22: 252-256.
  41. Janecki A, Kolodziej H. Anti-adhesive activities of flavan-3-ols and proanthocyanidins in the interaction of group A-streptococci and human epithelial cells. *Molecules.* 2010; 15: 7139-7152.
  42. Bao Y, Gao Y, Koch E, Pan X, Jin Y, Cui X. Evaluation of pharmacodynamic activities of EPs(R) 7630, a special extract from roots of *Pelargonium sidoides*, in animals models of cough, secretolytic activity and acute bronchitis. *Phytomedicine.* 2015; 22: 504-509.
  43. Corredor M. Multiple effects of anthocyanins inhibiting influenza (flu) virus infectivity. 2015. <https://www.biolink.no/archive/multiple-effects-of-anthocyanins-inhibiting-influenza-flu-virus-infectivity-article104-330.html>.