

TRABAJO FIN DE MÁSTER
MÁSTER UNIVERSITARIO EN BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA
CURSO 2019-20
UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ DE ELCHE

Inhibición del estrés del retículo
endoplasmático inducido por
glucotoxicidad en adipocitos 3T3-L1
mediante polifenoles de *Lippia citriodora* e
Hibiscus sabdariffa

Autor: Rut López Boix

Tutora académica: Prof. Dra. María Dolores Herranz López

Co-tutora: Dra. María Dolores Olivares Vicente

Dña. María Herranz López, Profesora Asociada del Dpto. de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad Miguel Hernández de Elche

Dña. María Dolores Olivares Vicente, Doctora en Biología Molecular y Celular, de la Universidad Miguel Hernández de Elche

CERTIFICA

Que el presente trabajo titulado:

“Inhibición del estrés del retículo endoplasmático inducido por glucotoxicidad en adipocitos 3T3-L1 mediante polifenoles de *Lippia citriodora* e *Hibiscus sabdariffa*”

y que constituye la Memoria del Trabajo Fin de Máster en Biotecnología y Bioingeniería, que presenta:

Srta. Rut López Boix

ha sido realizado bajo su supervisión en el Instituto de Biología Molecular y Celular, cumpliendo todos los requisitos necesarios.

Y para que así conste, se expide y firma el presente certificado en Elche a 11 de septiembre de 2020

Fdo.: Prof. María Herranz López

Fdo.: Dra. María Dolores Olivares Vicente

AGRADECIMIENTOS

Después de un intenso período de diez meses escribo este apartado de agradecimientos para finalizar mi trabajo de fin de máster. Ha sido un período de aprendizaje intenso, no solo en el campo científico, sino también a nivel personal con toda la situación que estamos viviendo en todo el mundo con la aparición del Covid-19. Realizar este trabajo ha tenido un gran impacto en mí y es por eso que me gustaría agradecer a todas aquellas personas que me han ayudado y apoyado durante este proceso.

Me gustaría agradecer tanto a la universidad como a todos mis profesores durante este año por haber fomentado mi curiosidad y por su esfuerzo para hacer posible que en medio de esta pandemia mundial tuviéramos la formación y los conocimientos planteados en este máster.

Pero en especial me gustaría agradecerle a todo el equipo del laboratorio de Vicente Micol por su ayuda, por su acompañamiento, su energía y su apoyo durante todo este año. Me gustaría mencionar a mi tutora María López Herranz, su ayuda me ha facilitado tanto el aprendizaje como la elaboración de este trabajo y ha hecho que este proceso fuera ameno y didáctico. Agradecer también a la Dra. Veronica Ruiz Torres presente en el equipo de laboratorio por todos sus consejos y ayudas a lo largo de todo el año.

Finalmente, me gustaría hacer una mención especial para mi co-tutora Maria Dolores Olivares Vicente por haber sido mi guía y mi estímulo durante todo el TFM. Definitivamente me ha brindado todas las herramientas necesarias que han estado en su mano para ayudarme en todo momento, realizando un trabajo que nunca se podrá valorar lo suficiente.

RESUMEN

La obesidad es un trastorno nutricional que representa un problema mundial que afecta a más de 650 millones de personas. La obesidad está asociada con el desarrollo del estrés en el retículo (ERE) y la activación de sus respuestas al estrés en tejidos metabólicamente activos. El ERE en el adipocito se produce como consecuencia de un exceso de ácidos grasos y glucosa afectando negativamente a la homeostasis funcional del RE. En los últimos años, el uso de polifenoles para regular el ERE y revertir las alteraciones metabólicas asociadas a la obesidad está incrementando. Estudios de este grupo de investigación han comprobado que la mezcla de extractos LC-HS es capaz de mejorar el perfil lipídico, los niveles de glucosa y la tolerancia, disminuir la expresión de citocinas proinflamatorias, etc. Sin embargo, se desconoce si podrían también modular el estrés metabólico a través de la inhibición del ERE.

Por ello el objetivo del presente trabajo fue determinar el efecto de la mezcla polifenólica LC-HS y sus metabolitos sobre el ERE y la apoptosis en adipocitos 3T3-L1 hipertróficos a través de la determinación de la expresión y/o activación de diversos marcadores de ERE. Se evaluó la expresión de pIRE1- α /IRE1- α , ATF6, PERK, CHOP y PARP debido que son las principales vías de activación de la UPR durante el ERE, en el caso de CHOP y PARP, por ser marcadores de apoptosis durante el ERE. Finalmente, se comprobó si la modulación en la expresión de estos marcadores se traducía en cambios de la masa del RE en un modelo de adipocitos hipertróficos inducidos por alta concentración de glucosa. Se observó que el extracto y algunos metabolitos ejercían una regulación negativa en la expresión de estos marcadores y la masa del RE se redujo significativamente. Por lo tanto, estos resultados abren nuevas vías para continuar la investigación del efecto de estos compuestos sobre las proteínas estudiadas y su implicación en las rutas metabólicas, así como nuevas posibilidades terapéuticas en el tratamiento de la obesidad.

Palabras clave: 3T3-L1; apoptosis; estrés; obesidad; retículo endoplásmico.

ABSTRACT

Obesity is a nutritional disorder being a global problem that affects more than 650 million people. Obesity is associated with the development of endoplasmic reticulum stress (ERE) and the activation of responses to stress in metabolically active tissues. ERE in the adipocyte is produced as a consequence of an excess of fatty acids and glucose, which affects the functional homeostasis of the ER. In recent years, the use of polyphenols to regulate ERE and reverse metabolic disorders associated with obesity is increasing. Studies by this group of investigation have shown that the LC-HS extract mixture improves the lipid profile, glucose levels and tolerance, reduces the expression of pro-inflammatory cytokines, etc. However, it is unknown the if it could also modulate metabolic stress through ERE inhibition.

Therefore, the objective of the present work was to determine the effect of the LC-HS and their metabolites on ERE and apoptosis in hypertrophic 3T3-L1 adipocytes through the determination of the expression and / or activation of various ERE markers. The expression of pIRE1- α / IRE1- α , ATF6, PERK, CHOP and PARP was evaluated because they are the main activation pathways of UPR during ERE, in the case of CHOP and PARP, was because they are markers of apoptosis during ERE. Finally, it was verified if these modulation in the expression of markers translates into changes in ER mass in a model of hypertrophic adipocytes induced by high glucose concentration. The extract and some metabolites exerted a negative regulation in the expression of these markers and the mass of the ER was significantly reduced. Therefore, these results can be used for the potential use of these compounds as modulators of the proteins studied and their implication in the metabolic pathways as well as the effects of these compounds in the amelioration of the obese condition.

Keywords: 3T3-L1; apoptosis; stress; obesity; endoplasmic reticulum.

ABREVIATURAS

AMPK (proteína quinasa activada por AMP), **ATF4** (factor de transcripción activador 4), **ATF6** (factor de transcripción 6), **BiP** (proteína de unión a inmunoglobulina), **CHOP** (proteína homóloga C/EBP), **DMEM** (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), **DMSO** (dimetilsulfóxido), **DXMT** (dexametasona), **eIF2 α** (subunidad α del factor de iniciación de la traducción eucariota 2), **ERAD** (degradación asociada al retículo endoplasmático), **ERE** (estrés en el retículo endoplasmático), **HS** (*Hibiscus sabdariffa*), **IBMX** (3-isobutil-1-metilxantina), **IL** (interleucinas), **IRE1** (enzima que requiere inositol-1) **JNK** (quinasa c-Jun N-terminal), **LC** (*Lippia citriodora*), **MD1** (medio de diferenciación 1), **IRS** (sustrato del receptor de insulina) **MD2** (medio de diferenciación 2), **MetS** (síndrome metabólico), **NF- κ B** (factor nuclear kappa B), **Nrf** (factor nuclear eritroide), **OMS** (Organización Mundial de la Salud), **PARP** (poli ADP-ribosa polimerasas), **PERK** (proteína quinasa del RE de tipo R quinasa), **PI3K** (fosfatidilinositol 3-quinasa), **pIRE1** (IRE1 fosforilado), **PBS** (tampón fosfato salino), **PPAR- γ** (receptor gamma activado por el proliferador de peroxisomas), **Q** (quercetina), **QG** (quercetina-3-glucurónido), **RE** (retículo endoplasmático), **RNasa** (dominio endoribonucleasa), **ROS** (especies reactivas de oxígeno), **SBF** (suero bovino fetal), **TLR4** (receptor 4 tipo Toll), **TNF- α** (factor de necrosis tumoral alfa), **TRAF2** (factor 2 asociado al receptor de TNF α), **UPR** (respuesta a proteínas desplegadas), **VB** (verbascósido).

ÍNDICE

RESUMEN.....	3
ABSTRACT	4
ABREVIATURAS.....	5
INTRODUCCIÓN.....	8
1. OBESIDAD Y SÍNDROME METABÓLICO.....	8
2. ALTERACIONES METABÓLICAS EN EL TEJIDO ADIPOSO.....	8
3. ESTRÉS DEL RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO.....	10
3.1. Vía de la UPR.....	11
3.2. Papel del ERE en la obesidad.....	13
3.3. Papel de la poli-ADP-ribosa polimerasa (PARP) en obesidad.....	14
4. MODELO DE OBESIDAD <i>IN VITRO</i>	15
5. MODULACIÓN DEL ERE MEDIANTE POLIFENOLES COMO ESTRATEGIA TERAPÉUTICA EN OBESIDAD	16
ANTECEDENTES.....	17
OBJETIVOS.....	18
PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL	19
1. MATERIALES.....	19
2. CULTIVO CELULAR.....	19
2.1. Diferenciación de la línea celular 3T3-L1.....	20
2.2. Modelo de adipocitos hipertróficos 3T3-L1.....	20
2.3. Cuantificación por Western Blotting de PARP, ATF6, PERK, CHOP, IRE 1- α y P-IRE 1- α	21
2.4. Cuantificación de la masa del RE por ER-Tracker.....	22
3. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS.....	22
RESULTADOS	23
Objetivo 1: Efecto de LC-HS y sus metabolitos sobre el ERE.....	23
Objetivo 2: Efecto de LC-HS y sus metabolitos en la inducción de la apoptosis celular en adipocitos hipertróficos.....	25
Objetivo 3: Efecto del extracto y sus metabolitos sobre la masa del RE.....	26
DISCUSIÓN.....	27

CONCLUSIONES.....31
BIBLIOGRAFÍA.....32

INTRODUCCIÓN

1. OBESIDAD Y SÍNDROME METABÓLICO.

La obesidad es un trastorno nutricional que ocurre debido a una acumulación excesiva de grasa corporal en una situación de desequilibrio entre la ingesta alimentaria y el gasto energético, afectando negativamente a la salud [1]. La sobrealimentación y la falta de actividad física son las principales causas de este desequilibrio calórico.

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), la prevalencia mundial de la obesidad se ha triplicado en los últimos años, llegando a más de 650 millones de personas obesas en 2016 y afecta a todos los orígenes socioeconómicos y etnias.

La obesidad es un factor clave del síndrome metabólico (MetS), un cuadro clínico que engloba una serie de trastornos metabólicos que incluyen disfunción del tejido endotelial, aumento de la masa del tejido adiposo, dislipidemia, hipertensión, aterosclerosis e insulinoresistencia [2-4]. Todo ello contribuye al riesgo de padecer ciertas enfermedades como diabetes mellitus tipo II, complicaciones cardiovasculares y varios tipos de cáncer [5].

2. ALTERACIONES METABÓLICAS EN EL TEJIDO ADIPOSO.

El tejido adiposo es un tipo de tejido conectivo laxo compuesto por células llenas de lípidos (adipocitos) rodeadas por una matriz de fibras de colágeno, vasos sanguíneos, fibroblastos y células inmunes [6]. Los adipocitos son las células predominantes en el tejido adiposo [7] y su función principal es acumular energía en forma de grasa, desempeñando así un papel importante en el control del equilibrio energético y la homeostasis de los lípidos y la glucosa [4].

Numerosos estudios evidencian que, en la obesidad, el tejido adiposo se ve afectado, produciéndose un aumento del número de adipocitos (hiperplasia) y/o del tamaño de los mismos (hipertrofia) [8]. Sin embargo, en la edad adulta, la capacidad para aumentar la masa del tejido adiposo por hiperplasia es limitada, por lo que las complicaciones de la obesidad se asocian en mayor medida a la hipertrofia de los adipocitos [9].

En la obesidad, la sobrecarga de nutrientes prolongada desencadena un estado de hipertrofia en el adipocito acompañado con disfunción mitocondrial que produce un aumento de

especies reactivas de oxígeno (ROS) produciendo estrés oxidativo, hipoxia, estrés en el retículo endoplasmático (ERE), aumento de la autofagia y apoptosis. Todo ello desencadena en una desregulación en la secreción de adipocinas proinflamatorias y ácidos grasos libres, llegando a los tejidos metabólicos y modificando las respuestas inflamatorias [10] (Figura 1). Estos cambios generan una inflamación tisular crónica de bajo grado donde las células del sistema inmune innato produciendo citoquinas y otros factores proinflamatorios como, la proteína quimiotáctica de monocitos (MCP)-1, factor de necrosis tumoral (TNF)- α , interleucinas como, (IL) -1, IL-6 e IL-8 que, son capaces de deteriorar la señalización de la insulina [11-13].

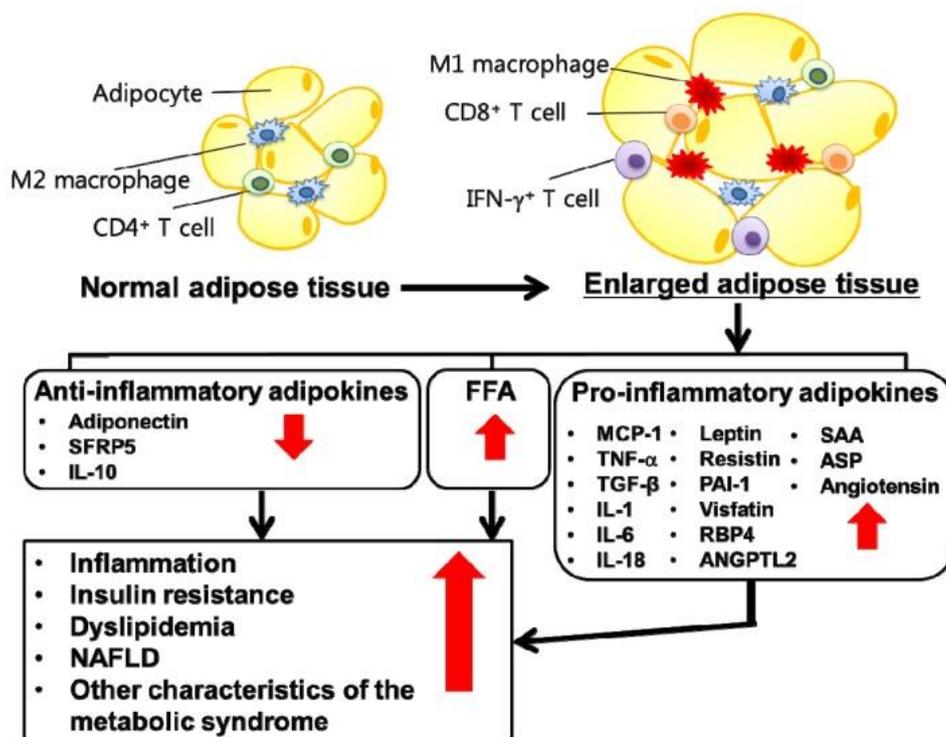


Figura 1: En la obesidad, el aumento del tejido adiposo conduce a una secreción desregulada de adipocinas proinflamatorias y a una mayor liberación de ácidos grasos libres dirigiéndose a tejidos metabólicos, incluidos el músculo esquelético y el hígado, modificando el metabolismo de la glucosa y los lípidos, contribuyendo a la aparición del síndrome metabólico. Extraído de [10].

En última instancia, en el tejido adiposo se produce una desregulación y disfunción de la capacidad de almacenamiento de grasa en el adipocito. La hipertrofia de los adipocitos subcutáneos abdominales conlleva a que los lípidos pasen a almacenarse en tejidos como el hígado, los músculos, la zona intraabdominal o depósitos adiposos viscerales [9].

Dicha saturación en la capacidad de almacenamiento de lípidos en el tejido adiposo y la deposición de grasa ectópica prolongada junto con un microambiente proinflamatorio en el tejido adiposo contribuye a la aparición de otras patologías como la resistencia a la insulina, desencadenando en diabetes tipo 2, esteatohepatitis, enfermedades cardiovasculares y el desarrollo de la inflamación crónica. [14-17].

3. ESTRÉS DEL RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO.

El retículo endoplasmático (RE) es uno de los orgánulos más grandes en las células eucariotas. Es una red de túbulos ramificados y sacos aplanados interconectados a través de un espacio cerrado llamado lumen del RE que está separado del citosol por una bicapa lipídica intracelular. Esta bicapa recibe el nombre de “membrana del RE” siendo un límite entre el citosol y la luz del RE, gobernando el paso de moléculas entre estos dos compartimentos. La región del RE más cercana al aparato de Golgi, rica en vesículas y túbulos, es el compartimento intermedio ER-Golgi (ERGIC), donde los lípidos y las proteínas del lumen destinadas a la superficie celular u otros orgánulos se transfieren y modifican bioquímicamente [18, 19].

El RE es un sitio importante de síntesis y transporte de proteínas a través de ribosomas, que se encarga del plegamiento de proteínas [20], la síntesis de hormonas esteroideas, la regulación de la concentración de glucosa, la homeostasis del calcio y el metabolismo de los lípidos [21].

En el RE, las chaperonas y diferentes enzimas presentan un papel esencial en el correcto plegamiento de proteínas, en su secreción y en la modificación de proteínas transmembrana después de la traducción y en su maduración [22]. Las proteínas recién sintetizadas deben sufrir modificaciones postraduccionales y un correcto plegamiento en la luz del RE. Solo las proteínas plegadas adecuadamente se dirigen al aparato de Golgi, núcleo y al citosol. En cambio, las proteínas mal plegadas se dislocan del RE al citosol y se degradan por la maquinaria de degradación asociada al RE (ERAD) o por autofagia. Sin embargo, hay ocasiones en las que hay un desequilibrio en la homeostasis de proteínas, como una acumulación de proteínas mal plegadas, activando la respuesta a proteínas desplegadas (UPR), desencadenando ERE. La vía de la UPR regula la expresión de numerosos genes manteniendo la homeostasis en el RE o induciendo la apoptosis (Figura 2) [23]. En condiciones de ERE se ha visto que el RE aumenta su masa debido a que necesita procesar una cantidad inusualmente

grande de proteínas mal plegadas. Además, las proteínas permanecen más tiempo en el RE antes de que se plieguen o degraden correctamente. Parece razonable que se necesite un RE más grande en estas circunstancias para acomodar cantidades mayores de proteínas del RE [24]. Numerosos estudios realizados han demostrado que el ERE y la vía de la UPR están estrechamente relacionados con la inflamación en varias patologías humanas como trastornos autoinmunes, infecciosos, neurodegenerativos y metabólicos [25]. Durante obesidad se produce un desequilibrio de los niveles de calcio en el RE, privación de glucosa y energía e hipoxia que, junto con el exceso de grasa, aumenta los niveles de ROS en el adipocito que desencadena en un mal plegamiento de proteínas ocasionando ERE [26].

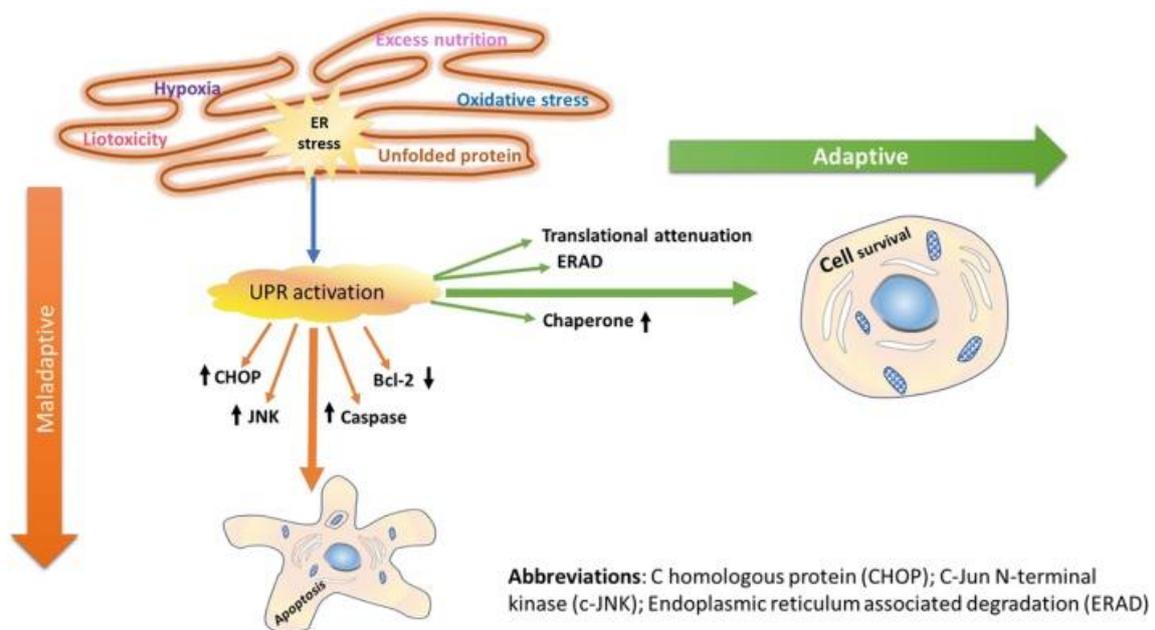


Figura 2: Mecanismos adaptativos y no adaptativos de señalización de la UPR. En condiciones normales, la activación de la vía de la UPR lleva a una disminución de la traducción de proteínas, a la degradación de proteínas mal plegadas (ERAD) y a la síntesis de chaperonas en el lumen del RE restableciendo así la homeostasis del RE y garantizando la supervivencia celular. Cuando se produce un ERE prolongado, se activan una serie de factores de transcripción como CHOP, JNK y caspasas y se inhibe la actividad de la proteína anti-apoptótica Bcl-2 induciendo la muerte de la célula por apoptosis. Extraído de [1].

3.1 Vía de la UPR.

La vía de la UPR consiste en una red reguladora que consta de tres cascadas de señalización mediadas por tres componentes transmembrana, el factor de transcripción 6 (ATF6), la proteína quinasa del RE de tipo R quinasa (PERK) y la enzima que requiere inositol-1 (IRE)-1,

que regulan la expresión de diferentes genes para disminuir el ERE o inducir apoptosis [27]. En ausencia de ERE, la proteína de unión a inmunoglobulina (BiP), también referida como GRP78, se encarga de mantener estas tres vías en su forma inactiva al unirse a los dominios transmembrana de estas proteínas en el lumen (Figura 3) [28].

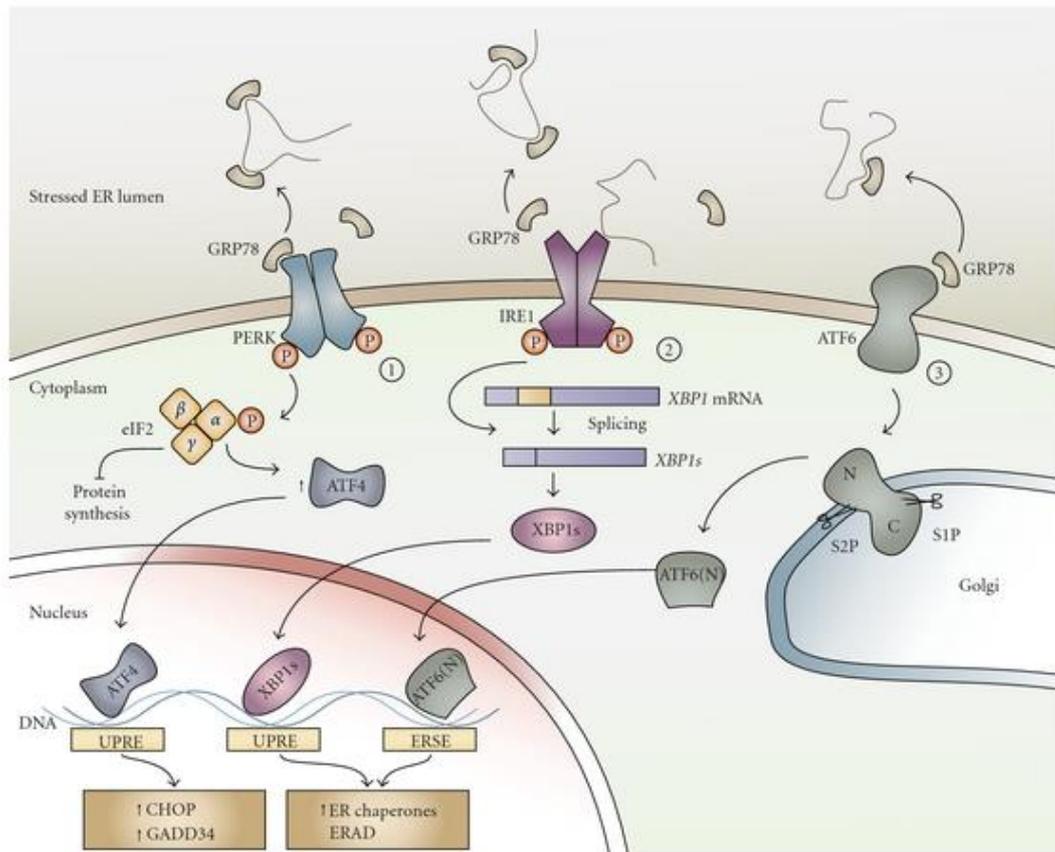


Figura 3: ERE y activación de las vías de señalización de la UPR. La acumulación de agregados proteicos mal plegados o desplegados en el lumen del RE, que da como resultado ERE, conduce a la activación de tres ramas de señalización mediadas por proteínas transmembrana en el RE: PERK, IRE1 y ATF6. Adaptado de [29].

La cascada de señalización más conservada de UPR es IRE1, una proteína transmembrana de tipo I con un dominio Ser/Thr quinasa y un dominio endoribonucleasa (RNasa) en su porción citosólica. Cuando se libera el dominio luminal de IRE1 α tras darse la disociación con GRP78/BiP, sufre una homo-oligomerización y trans-autofosforilación dando como resultado la activación del dominio RNasa. Mediante su actividad RNasa, IRE1 α es capaz de eliminar un intrón del ARNm del factor de transcripción XBP1 para generar una variante empalmada que se llama sXBP1, que está implicado en la activación de genes que regulan el plegamiento y tráfico de proteínas en el RE, la biosíntesis de fosfolípidos, la expansión de la membrana del

RE y la vía de la ERAD [30]. Además, durante el estrés celular se da una interacción de IRE1 α -XBP1 donde, IRE1 α se une al factor 2 asociado al receptor de TNF α (TRAF2) en el citoplasma, conduciendo a su fosforilación y la activación del factor nuclear kappa B (NF- κ B) y la quinasa c-Jun N-terminal (JNK), dando lugar a señales inflamatorias y pro-apoptóticas en la célula [29].

Otra cascada de señalización de la UPR involucra a PERK, una proteína transmembrana de tipo I con un dominio Ser/Thr quinasa en su porción citosólica. Al igual que IRE1 α , tras la liberación de BiP en situaciones de ERE, PERK dimeriza y se trans-autofosforila. De esta manera, se activa y fosforila el residuo Ser51 de la subunidad α del factor de iniciación de la traducción eucariota 2 (eIF2 α), el cual se inactiva llevando a una reducción de la síntesis de proteínas. eIF2 α también aumenta la expresión del factor de transcripción activador 4 (ATF4), el cual induce la respuesta inflamatoria, ROS, autofagia y la activación de la proteína homóloga C/EBP (CHOP), un factor de transcripción que promueve el estrés oxidativo y la apoptosis [21]. Sin embargo, ATF4 es capaz de activar las vías de supervivencia cuando el ERE se encuentra en una fase temprana, solo cuando el ERE se ve prolongado en el tiempo, ATF4 inicia los programas transcripcionales proapoptóticos aumentando la expresión de CHOP [31]. PERK también juega un papel importante en la detección de ROS siendo capaz de fosforilar el factor nuclear eritroide 2 (Nrf2) que conlleva a la expresión de genes que codifican enzimas antioxidantes [32].

La tercera vía de señalización de la UPR es la mediada por ATF6. Este factor de transcripción es una proteína transmembrana de tipo II de 90 kDa con un dominio N-terminal en el citosol y un dominio C-terminal en el lumen del RE que es capaz de ejercer la respuesta adaptativa que se produce en la fase inicial de la UPR restableciendo la homeostasis del plegamiento de proteínas. En situaciones de estrés, ATF6 es capaz de detectar cuando hay un plegamiento incorrecto de las proteínas y se transloca al aparato de Golgi por la disociación de GRP78/ BiP del extremo N-terminal de ATF6. Posteriormente, se escinde en un fragmento citosólico de 50 kDa dirigiéndose al núcleo donde se une a los elementos de respuesta ATF / cAMP (CRE) y regula la expresión de genes implicados en la ERAD como XBP1, CHOP y GRP78/BiP [33, 34].

3.2 Papel del ERE en la obesidad.

Diferentes estudios han comprobado que la obesidad está asociada con el desarrollo del ERE y la activación de sus respuestas al estrés en tejidos metabólicamente activos. El ERE es el

mecanismo central en la pérdida de la homeostasis energética [35]. En la obesidad, el ERE en el adipocito se produce principalmente como consecuencia de un estado de “sobrenutrición” inducida por un exceso de ácidos grasos y glucosa afectando negativamente a la homeostasis funcional del RE [36, 37].

Existe un interés creciente en las contribuciones del ERE tanto en la inflamación como en la resistencia a la insulina ya que afecta a enfermedades metabólicas, como la obesidad y la diabetes tipo 1 y tipo 2.

El ERE y la UPR están estrechamente relacionados con las principales vías de señalización inflamatorias como la activación de NF- κ B. Se ha comprobado que NF- κ B juega un papel importante en la inflamación de los adipocitos en modelos humanos y experimentales de estrés metabólico, siendo el principal factor de transcripción en la inflamación mediada por estrés del RE [17].

Además se ha observado que el ERE conduce a la supresión de la señalización del receptor de insulina a través de la hiperactivación de JNK mediada por IRE1 α que es capaz de producir la inhibición del sustrato del receptor de insulina (IRS) 1 y 2 contribuyendo a la aparición de enfermedades como la diabetes [1].

3.3 Papel de la poli-ADP-ribosa polimerasa (PARP) en obesidad.

Las poli (ADP-ribosa) polimerasas (PARP o ARTD), descritas originalmente como factores de reparación del ADN [38], son unas enzimas nucleares que catalizan la transferencia de múltiples moléculas de ADP-ribosa del dinucleótido de nicotinamida adenina (NAD⁺) a varias proteínas, promoviendo la interacción proteína-proteína y la modulación de las funciones de las proteínas. PARP-1, PARP-2 y PARP-7 están relacionados con enfermedades metabólicas como la diabetes, siendo capaces de participar en la regulación metabólica modulando el metabolismo de los lípidos, las oscilaciones circadianas y la secreción y señalización de insulina [39].

PARP-1 es el principal miembro de la superfamilia y es capaz de regular la expresión de genes inflamatorios, como NF- κ B, TNF- α , IL-1 β , IL-6 y el receptor 4 tipo Toll (TLR4) [40] e interactuar con numerosos factores de transcripción como, por ejemplo, Nrf1 y Nrf2 y la quinasa activada

por AMP (AMPK) [41]. Se ha comprobado que la activación de AMPK aumenta con la activación de PARP-1 fosforilándola [42].

PARP-1 también interviene en mecanismos de autofagia mediados por la vía de AMPK/mTOR que es especialmente importante en los trastornos relacionados con el metabolismo que conducen al MetS [43].

En la obesidad, cuando en el ERE la activación de la UPR se ve prolongada aumentan las vías de señalización apoptóticas y se produce la activación de caspasas específicas de aspartato como la caspasa-3. En estas condiciones el daño producido en el ADN es extenso y se produce la escisión de PARP-1 de su forma completa de 114 kDa a un fragmento de 89 kDa específico de caspasa-3. Su escisión se produce para que la energía se recupere para otras células en el tejido a través de la apoptosis. Además, es una señal de que la célula no puede hacer frente a una lesión de saturación del ADN, que surge de la fragmentación de la cromatina derivada de la apoptosis. PARP-1 se caracteriza por ayudar a las células a mantener su viabilidad, sin embargo, cuando se produce su escisión se da su pérdida de función actuando así como un marcador de células que sufren apoptosis [44, 45].

4. MODELO DE OBESIDAD *IN VITRO*.

Para estudiar el proceso de la adipogénesis y la función de los adipocitos *in vitro* se utilizan dos clases de modelos celulares principalmente. El primer grupo está compuesto de fibroblastos pluripotentes que son capaces de diferenciarse en varios tipos de células, miocitos, condrocitos y adipocitos. El segundo grupo incluye preadipocitos similares a fibroblastos que se diferencian en adipocitos. Esta segunda clase es la más empleada para llevar a cabo estudios de adipogénesis [7].

La línea celular de preadipocitos 3T3-L1 es una de las más utilizadas, habiendo sido usada en más de 5000 artículos en estudios de adipogénesis y bioquímica de adipocitos [46]. En esta línea celular se induce la diferenciación de su fenotipo fibroblástico en adipocitos, mediante mitógenos y agentes hormonales como la insulina, la dexametasona, que es un glucocorticoide sintético, y agentes que conducen a un aumento de cAMP como la 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX). Estos agentes son capaces de inducir la expresión de factores de transcripción implicados en la diferenciación del adipocito [47, 48].

Cuando se incuban estas células en presencia de altas concentraciones de glucosa se induce en los adipocitos un estado de hipertrofia y resistencia a la insulina[49]. Se ha demostrado que en este modelo de hipertrofia inducido por alta glucosa se produce ERE y se activa la UPR expresando marcadores propios del ERE como CHOP[50]. De esta forma, se presenta como un modelo válido para el estudio de las alteraciones metabólicas que tienen lugar en el tejido adiposo obeso.

5. MODULACIÓN DEL ERE MEDIANTE POLIFENOLES COMO ESTRATEGIA TERAPÉUTICA EN OBESIDAD.

Los polifenoles son metabolitos secundarios sintetizados exclusivamente por plantas que se caracterizan por la presencia de grupos fenoles en sus estructuras, lo que les confiere propiedades antioxidantes [51].

Los polifenoles pueden clasificarse en flavonoides y no flavonoides (Figura 4), o subdividirse en muchas subclases dependiendo del número de unidades de fenol dentro de su estructura molecular, grupos sustituyentes y / o el tipo de enlace entre las unidades de fenol [52]. Normalmente se presentan en su forma de glucósidos o agliconas y su diversidad estructural surge de las variaciones en el patrón de hidroxilación y el estado de oxidación que dan como resultado una amplia gama de compuestos [53].

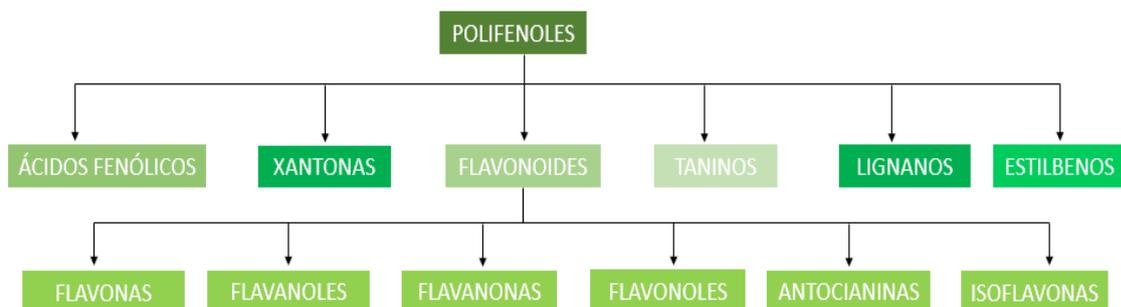


Figura 4: Clasificación de los polifenoles en flavonoides y no-flavonoides.

Además de actuar como agentes antioxidantes, los polifenoles presentan múltiples propiedades polifarmacológicas beneficiosas como actividades antiinflamatorias, antialérgicas, hepatoprotectoras, antitrombóticas, antivirales, anticancerígenas e incluso antilipogénicas [54].

Otros polifenoles han sido utilizados para regular el ERE, la inflamación y la autofagia mediadas por PARP1 como el hidrato de morina, un flavonoide aislado de *Maclura pomifera*, *Maclura tinctoria* y de las hojas de *Psidium guajava* debido a su efecto antiinflamatorio, anti-apoptótico y anti- autofagia [55].

Además de los polifenoles, otros compuestos naturales han sido dirigidos al ERE y la vía de la UPR, ya que son capaces de modular las vías de señalización de la insulina y el estrés oxidativo e inflamatorio. Berberino, Bisoprolol y el ácido alfa lipoico (ALA), son compuestos naturales antioxidantes y capaces de eliminar de radicales libres e inhibir la vía de la UPR [1].

ANTECEDENTES

Resultados anteriores del grupo de investigación de acogida, han demostrado que algunos polifenoles pueden revertir las alteraciones metabólicas asociadas a la obesidad.

El fenilpropanoide verbascósido (VB), compuesto mayoritario y principal metabolito plasmático de la *Lippia citriodora* (LC) [56], la quercetina (Q) y la quercetina-3-glucurónido (QG), flavonoles que han sido identificados como metabolitos plasmáticos tras la ingesta de un extracto de *Hibiscus sabdariffa* (HS) en ratas [57] (Figura 5), son capaces de reducir la acumulación de triglicéridos y de revertir el estrés metabólico en adipocitos 3T3-L1 hipertróficos y en ratones hiperlipidémicos a través de la modulación de proteínas implicadas en el metabolismo de los lípidos, como FASN y PPAR γ , o la activación de AMPK [58-60].

Estudios previos del grupo, junto con otros grupos de investigación, demuestran que la combinación de estos dos extractos en la proporción 65:35 (p/p) de LC-HS presenta un efecto sinérgico beneficioso, comercializándose como un nutracéutico llamado Metabolaid. Ensayos clínicos en voluntarios con sobrepeso y obesidad demostraron que el consumo diario de la mezcla polifenólica de LC-HS es capaz de disminuir el peso corporal, el porcentaje de grasa corporal, la frecuencia cardíaca y la presión arterial sistólica [2, 61], así como regular el apetito [2].

Además, la mezcla de extractos LC-HS es capaz de mejorar el perfil lipídico, los niveles de glucosa y la tolerancia a la glucosa, reducir el aumento de peso corporal, disminuir la expresión de citocinas proinflamatorias como TNF- α e IL-6 y la expresión de genes relacionados con la adipogénesis, como C/EBP α , PPAR γ , SREBP1c y FASN en ratones obesos [62]. Sin embargo,

hoy en día se desconoce si estos compuestos podrían también modular el estrés metabólico a través de la inhibición del ERE.

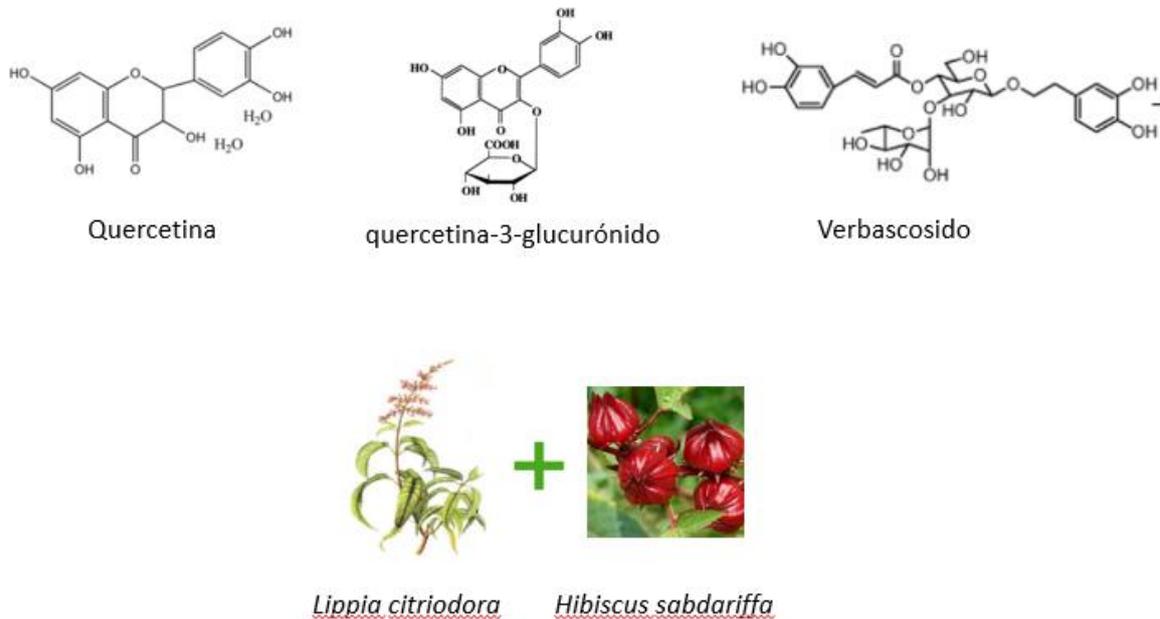


Figura 5: Estructuras químicas del VB, Q, QG e imagen de la mezcla polifenólica LC-HS. Imágenes extraídas de [62-65]

OBJETIVOS

De acuerdo con las evidencias científicas anteriormente expuestas y la contribución del ERE en la patogénesis de la obesidad, se propone estudiar si los metabolitos de *Lippia citriodora* e *Hibiscus sabdariffa* son capaces de reducir el estrés metabólico asociado a la obesidad a través de la inhibición del ERE en el adipocito. Para abordar este objetivo general, se plantean los siguientes objetivos específicos:

- Estudiar el efecto de la mezcla polifenólica LC-HS y sus metabolitos (VB, Q y QG) sobre el ERE en adipocitos 3T3-L1 hipertróficos a través de la determinación de la expresión y/o activación de diversos marcadores de ERE: las proteínas transmembrana de la vía de la UPR (IRE1 α , PERK y ATF6) y el factor transcripcional proapoptótico CHOP.
- Evaluar el efecto de la mezcla polifenólica LC-HS y sus metabolitos en la inducción de la apoptosis celular en adipocitos hipertróficos estudiando la escisión del marcador de apoptosis PARP-1.

- Determinar el efecto de la mezcla polifenólica LC-HS y sus metabolitos sobre la masa del RE en adipocitos hipertróficos.

PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

1. MATERIALES.

La línea celular 3T3-L1 se adquirió de American Type Culture Collection (Manassas, VA, EEUU). Los medios de cultivos DMEM, la mezcla de antibióticos (penicilina-estreptomicina) y tripsina al 0.25% fueron comprados a Gibco (Grand Island, NY, EEUU). Dexametasona, 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX), insulina y dimetilsulfóxido (DMSO) fueron adquiridos de Sigma-Aldrich (Madrid, España). El suero bovino fetal (SBF) y el suero de ternera se compraron a Fisher Scientific (Utah, EEUU). El tampón fosfato salino (PBS) se obtuvo de Biowest (Nuaille, Francia). El nutracéutico MetabolAid se compró a Monteloeder, S.L. (Elche, Alicante, España), el verbascósido (VB) se obtuvo de Extrasynthese (Genay, Francia) y la quercetina (Q) y quercetina-3-glucurónido (QG) fueron adquiridos de Sigma-Aldrich (Barcelona, España). Los filtros de acetato de celulosa de 0,2 μm para la esterilidad de compuestos y medios se obtuvieron de GE Healthcare Life Sciences (Buckinghamshire, Reino Unido). Los anticuerpos primarios utilizados, PARP (#9532), ATF-6 (#65880), CHOP (#2895), IRE 1- α (#3294), PERK (#3192), fueron comprados a Cell Signaling Technology (Danvers, MA, EEUU) y el anticuerpo primario P-IRE 1- α (ab124945) se adquirió en Abcam (Cambridge, Reino Unido). El anticuerpo de β -actina anti-ratón se obtuvo de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EEUU). Los anticuerpos secundarios anti-rabbit-HRP (#A0545) y anti-mouse-HRP (#A9044) fueron adquiridos de Sigma-Aldrich (Barcelona, España). El kit de ensayo de proteínas BCA Pierce (BCA-Pierce) se compró a Thermo Scientific (Massachusetts, EEUU). Las membranas utilizadas en la transferencia fueron adquiridas en Bio-Rad Laboratories, S.A. (Madrid, España).

2. CULTIVO CELULAR.

La línea de preadipocitos 3T3-L1, mantenida con un número de pases bajos, se cultivó en DMEM con bajo contenido en glucosa (5 mM) y piruvato sódico enriquecido con glutamina

estable y complementado con suero de ternera al 10%, y estreptomicina y penicilina al 1% (medio completo).

Las células se cultivaron y se dejaron crecer en frascos de cultivo con el medio completo y se realizaron cambios de medio cada 2-3 días. Una vez que las células llegaron a una confluencia de un 70-80%, los preadipocitos se desprendieron de los frascos de cultivo con una disolución de tripsina al 0.25%. Se trabajó en condiciones de esterilidad durante la manipulación de las células utilizando una cabina de flujo laminar y una incubadora a 37°C con una atmósfera humidificada al 5% de CO₂ y 95% de aire.

2.1 Diferenciación de la línea celular 3T3-L1.

Los preadipocitos 3T3-L1 fueron diferenciados utilizando protocolos estándar [60]. Se sembraron los preadipocitos en placas de cultivo de 6 pocillos con medio completo y se dejaron crecer hasta alcanzar la confluencia. A continuación, se indujo la diferenciación de los preadipocitos incubando con medio de diferenciación 1 (MD1) durante 48 h. El MD1 contiene DMEM con alta glucosa (25 mM) suplementado con suero bovino fetal (SBF) al 10% y agentes adipogénicos como insulina 10 µg / ml, dexametasona 1 µM e IBMX 5 mM. Seguidamente, las células se mantuvieron con medio de diferenciación 2 (MD2), que contiene DMEM con alta glucosa (25 mM) suplementado con SBF al 10% e insulina. El MD2 se cambió cada 2-3 días durante 8 días, obteniendo así adipocitos maduros. Para confirmar la inducción del ERE en adipocitos hipertróficos, se emplearon adipocitos maduros diferenciados con medio bajo en glucosa (5 mM) como control.

2.2 Modelo de adipocitos hipertróficos 3T3-L1.

Tras la diferenciación celular y la obtención de adipocitos maduros, se indujo ERE a través de la incubación de los adipocitos maduros con MD2 alto en glucosa (25mM) durante 9 días, hasta llegar al estado hipertrófico celular, renovando el medio cada 2-3 días.

Una vez obtenido el modelo de adipocitos hipertróficos se incubaron los compuestos durante 24 horas. Se prepararon a tres concentraciones diferentes para cada compuesto. El LC-HS se preparó a 350 y 500 µM y VB, Q y QG a 50 y 100 µM. Los compuestos se disolvieron previamente en DMSO, a concentraciones que no superaron el 0,5% de DMSO en las células, y se filtraron a través de filtros de 0,2 µm para su esterilidad.

2.3 Cuantificación por Western Blotting de PARP, ATF6, PERK, CHOP, IRE 1- α y P-IRE 1- α .

Para cuantificar la expresión de los diferentes marcadores del ERE y la apoptosis, se obtuvo el extracto de proteína de los adipocitos hipertróficos tratados con LC-HS, VB, Q y QG.

Para la preparación del extracto de proteína, los adipocitos se lisaron con un tampón de lisis RIPA (0.5 M Tris, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Triton, 0.1% Sodium Dodecyl Sulphate, 1M NaF, 1M Na₃VO₄, Roche, Complete mini. Sigma, #11836153001). Seguidamente, las muestras se congelaron a -80° C, al menos 20 min y se centrifugaron a 4° C, 13.200 rpm durante 20 min para eliminar los restos celulares.

La concentración de proteína de los lisados celulares se cuantificó utilizando el método BCA-Pierce siguiendo las instrucciones del fabricante. Posteriormente, se llevó a cabo la electroforesis en geles de poliacrilamida Tris-Gly 10% para PERK, IRE1 α y P-IRE1 α , Tris-Gly 8% para PARP, Tris-Gly 12% para ATF6 y CHOP, cargando 40 μ g de proteína/gel. Las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa utilizando el sistema de transferencia Trans-Blot® Turbo™. Una vez realizada la transferencia, se bloquearon las membranas con leche o BSA al 5% en PBS-TWEEN al 0.1 % durante 1h a temperatura ambiente en agitación. A continuación, se incubaron los anticuerpos primarios PARP (1:1000), ATF6 (1:1000), P-IRE1 α (1:1000), IRE1 α (1:1000), CHOP (1:700), PERK (1:1000) toda la noche a 4 °C.

Seguidamente, se lavaron las membranas con PBS-TWEEN 0.1 % 3 veces, 5 min y se incubaron los anticuerpos secundarios durante 3 h en agitación. La detección de la señal quimioluminiscente se llevó a cabo empleando el sustrato SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity (Thermo Scientific) y las membranas se analizaron en el sistema ChemiDoc (Bio-Rad, Madrid, España). Los niveles de proteína se cuantificaron por densitometría de banda normalizando a la señal de la β -actina. La forma activada de IRE 1- α (p IRE 1- α) se normalizó con la expresión total de IRE 1- α y la escisión de PARP-1 se hizo normalizando el fragmento grande (89 kDa) producido por la escisión de caspasas respecto a la longitud completa total (116 kDa) y a su vez se normalizó frente a la β -actina usando el software Image Lab (Version 4.1, Bio-Rad).

2.4 Cuantificación de la masa del RE por ER-Tracker.

Para la cuantificación de la masa del RE de los adipocitos hipertróficos se utilizó la sonda comercial ER-Tracker (Thermo Scientific). Es una tinción de células vivas que penetra en la célula y es altamente selectiva para el RE. Este tinte consta del tinte verde fluorescente BODIPY® TR y de glibenclamida. La glibenclamida (gliburida) se une a los receptores de sulfonilurea de canales K⁺ sensibles al adenosín trifosfato (ATP) que son prominentes en RE.

Cuando los adipocitos alcanzaron el estadio de hipertrofia, se incubaron los compuestos durante 24 horas. Seguidamente, se retiró el sobrenadante, se lavaron las células con PBS y se agregó la sonda junto con una disolución de Hoechst (Thermo Scientific), que es un colorante fluorescente de ADN empleado para poder visualizar núcleos. Ambos tintes se dejaron durante 30' a 37°C. Transcurrido ese tiempo se reemplazó la tinción con medio fresco sin rojo fenol y se procedió a cuantificar la masa del RE normalizando la masa respecto al número de núcleos usando el lector Cytation 3 (Biotek Instruments, Winooski, EE.UU) excitando a 587nm y emitiendo a 615nm y se realizaron fotografías con objetivo de 20 aumentos.

3. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Los resultados se expresan como media \pm desviación estándar. Las diferencias entre dos o más grupos se comparan mediante métodos no paramétricos y se consideran estadísticamente significativas cuando $p < 0,05$. Los efectos estimulantes o inhibidores de los compuestos puros en comparación con los controles se analizaron mediante un test de ANOVA unidireccional (one-way ANOVA) y el test de Tukey de comparaciones múltiples, que compara las muestras entre sí y con el control. Los análisis estadísticos realizados y las representaciones gráficas se realizaron empleando el software GraphPad Prism 7 (GraphPad, San Diego, CA). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ y ***** $p < 0.00001$ indican diferencias estadísticamente significativas frente al control tratado con alta concentración de glucosa (hipertrofia).

RESULTADOS

Objetivo 1: Efecto de LC-HS y sus metabolitos sobre el ERE

Con el fin de estudiar el efecto de la mezcla de extractos LC-HS y sus metabolitos VB, Q y QG sobre el ERE inducido por glucotoxicidad en adipocitos 3T3-L1 hipertróficos, se estudió la activación/expresión de marcadores del ERE (IRE1 α , ATF6, PERK y CHOP).

Tras el tratamiento de adipocitos con LC-HS (350-500 μ M), VB (50-100 μ M), Q (50-100 μ M) y QG (50-100 μ M) durante 24 horas, se determinaron los niveles de activación de IRE1- α (Figura 6A), la expresión ATF6 (Figura 6B), PERK (6C), la expresión de CHOP (6D) mediante un análisis por Western Blotting.

Se observó que LC-HS junto con los metabolitos disminuyeron significativamente la activación de IRE1- α observándose así, niveles inferiores de pIRE- α en todas las concentraciones ensayadas respecto al control de adipocitos hipertróficos incubados en alta glucosa (Figura 6A).

Respecto a ATF6, la mezcla de extractos LC-HS junto con los metabolitos VB y QG disminuyeron sus niveles de expresión. Sin embargo, la Q no ejerció ningún efecto sobre la expresión de ATF6 respecto a los adipocitos hipertróficos (Figura 6B).

La mezcla polifenólica de extractos disminuye significativamente la expresión de PERK respecto al control de adipocitos hipertróficos incubados en alta glucosa. Entre los metabolitos de LC-HS evaluados, VB en todas las concentraciones ensayadas y la QG a 50 μ M redujeron significativamente la respuesta de PERK (Figura 6C).

Por último, los niveles de expresión de CHOP disminuyeron con la mezcla de extractos LC-HS, y los metabolitos VB a ambas concentraciones y QG a 50 μ M, respecto al control de adipocitos hipertróficos. Por el contrario, la Q aumentó los niveles de expresión de CHOP.

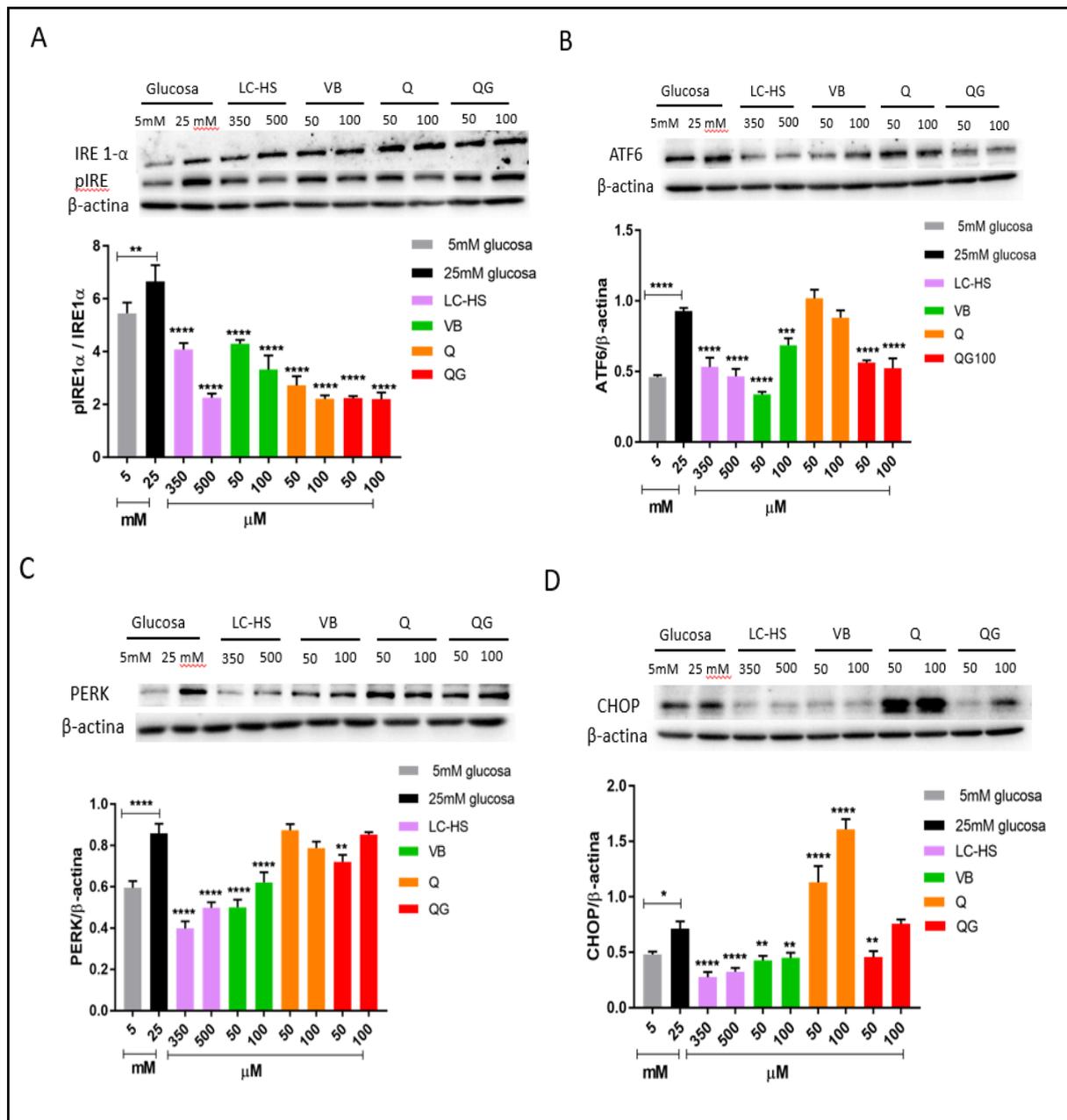


Figura 6. Efecto de LC-HS y sus metabolitos sobre la activación y/o expresión de marcadores del ERE en adipocitos hipertróficos 3T3-L1. Los adipocitos se incubaron con los compuestos durante 24 horas y se determinaron los niveles de pIRE 1- α , IRE 1- α , ATF6, PERK, CHOP y β -actina mediante Western Blotting. **($p < 0,005$), *** ($p < 0,001$) y **** ($p < 0,0001$) indican diferencias significativas respecto a los adipocitos hipertróficos.

Objetivo 2: Efecto de LC-HS y sus metabolitos en la inducción de la apoptosis celular en adipocitos hipertróficos.

Para poder evaluar el efecto del extracto y sus metabolitos en la inducción de la apoptosis en adipocitos hipertróficos se estudió la escisión del marcador de apoptosis PARP-1. LC-HS, VB, Q y QG se incubaron a las mismas concentraciones que el objetivo 1 durante 24 horas en adipocitos hipertróficos 3T3-L1 inducidos con alta concentración de glucosa. El efecto sobre la escisión de PARP-1 se evaluó mediante Western Blotting.

La glucotoxicidad inducida en adipocitos hipertróficos aumentó significativamente la escisión de PARP-1 respecto a los adipocitos maduros (5 mM). Además, la incubación con Q mostró un aumento de la apoptosis estadísticamente significativa respecto a los adipocitos hipertróficos. Tanto el extracto como los metabolitos VB y QG presentaron menor porcentaje de escisión de la proteína PARP-1 respecto al control de adipocitos hipertróficos, disminuyendo la apoptosis en las células (Figura 7).

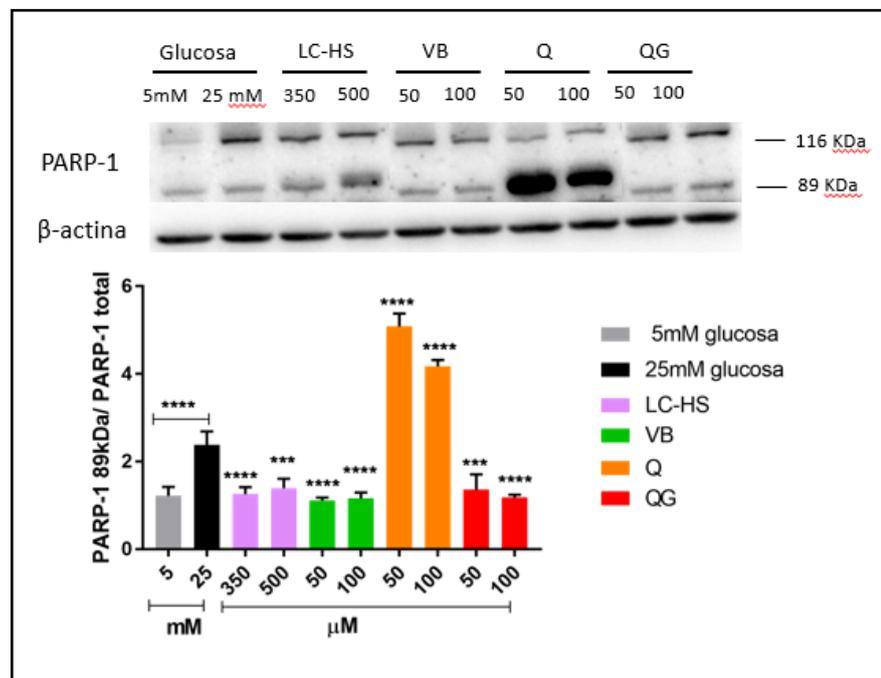


Figura 7. Efecto de LC-HS y sus metabolitos en la inducción de la apoptosis celular en adipocitos hipertróficos 3T3-L1 mediante la escisión del marcador de apoptosis PARP-1. Los adipocitos se incubaron con los compuestos durante 24 h y se determinaron los niveles de expresión de PARP-1 a 116kDa y 89kDa para poder determinar los niveles de escisión de la proteína apoptótica. Se normalizaron mediante la β -actina por Western Blotting.

($p < 0,005$), * ($p < 0,001$) y **** ($p < 0,0001$) indican diferencias significativas respecto a los adipocitos hipertróficos.

Objetivo 3: Efecto del extracto y sus metabolitos sobre la masa del RE

Con el objetivo de determinar el efecto del extracto y sus metabolitos sobre la masa del RE se trataron adipocitos hipertróficos 3T3-L1 con LC-HS, VB, Q y QG a las mismas concentraciones que el objetivo 1 durante 24 horas.

La glucotoxicidad inducida en adipocitos hipertróficos mostró un aumento de la masa del RE comparado con los adipocitos maduros. Respecto al extracto y sus metabolitos, LC-HS a $500\mu\text{M}$ y QG a $100\mu\text{M}$ disminuyeron de forma significativa la masa del RE en comparación con los adipocitos hipertróficos. Por el contrario, la Q a $100\mu\text{M}$ indujo un aumento significativo de la masa del RE (Figura 8B).

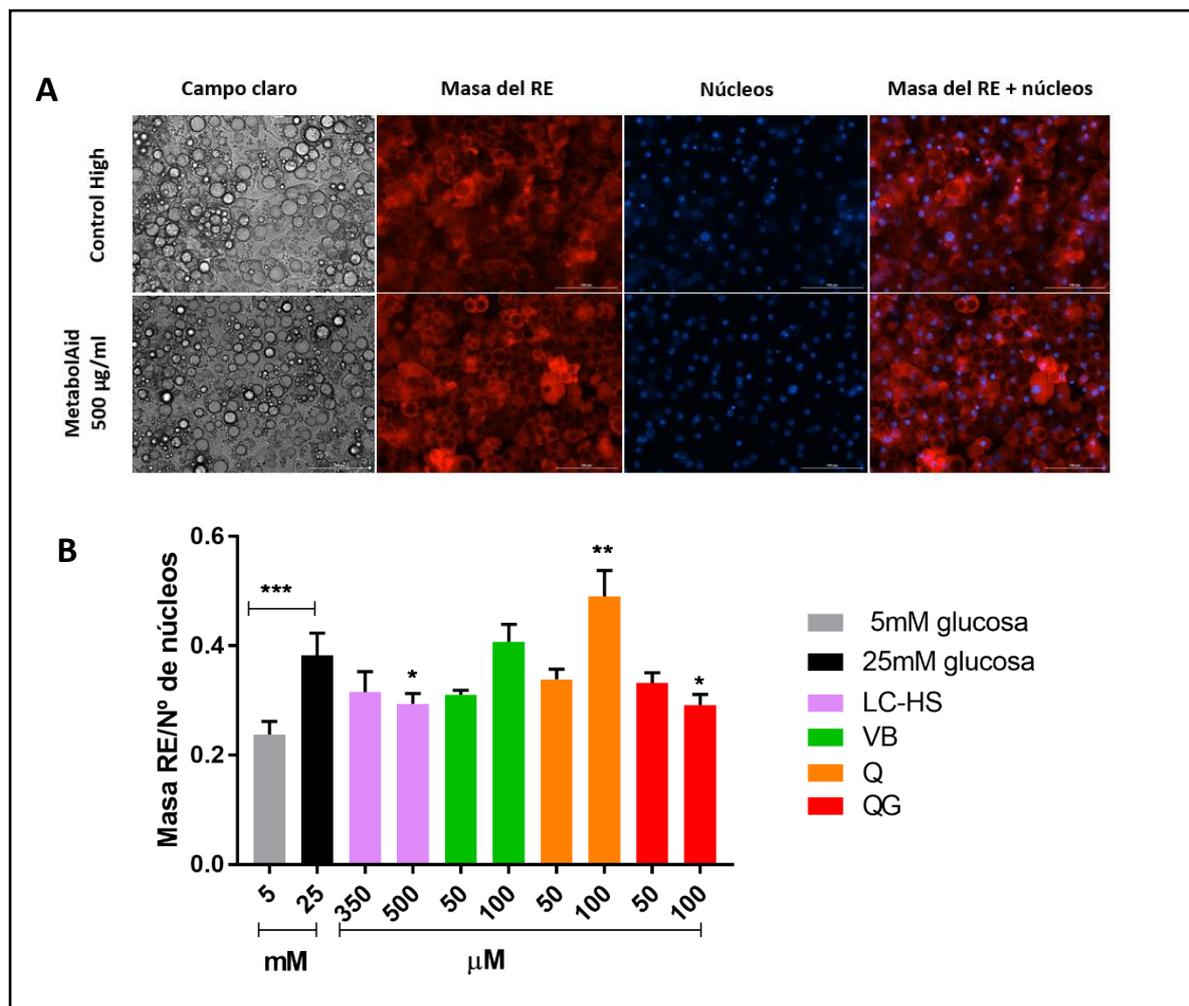


Figura 8. Efecto de la mezcla de extractos LC-HS y sus metabolitos sobre la masa del RE en adipocitos hipertróficos 3T3-L1 mediante el uso de la sonda fluorescente comercial ER-Tracker™ Red y normalizando respecto al número de núcleos usando la tinción de ácido nucleico Hoechst. **($p < 0,005$), *** ($p < 0,001$) y **** ($p < 0,0001$) indican diferencias significativas respecto al control de adipocitos hipertróficos.

Según los resultados obtenidos en este trabajo, se plantea que la mezcla LC-HS son capaces de inhibir el ERE a través de la modulación de las vías de la UPR e inhibe la apoptosis a través de la modulación directa o indirecta de PARP-1. Esta hipótesis se recoge en la Figura 9.

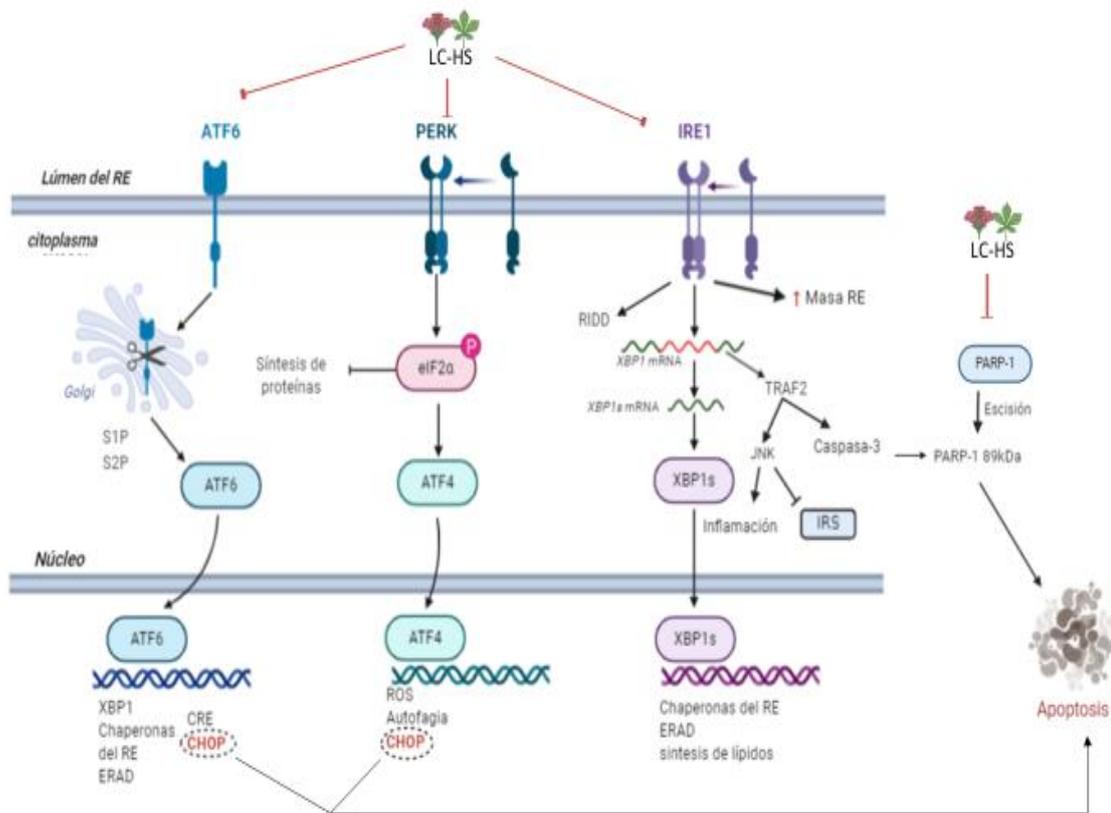


Figura 9. Efecto de la mezcla de extractos LC-HS en los marcadores de la UPR y en PARP-1 durante el ERE.

DISCUSIÓN

La obesidad es uno de los principales problemas de salud pública a escala global, estando asociada con una mayor incidencia de una serie de enfermedades como la diabetes, las enfermedades cardiovasculares o el cáncer [66].

Actualmente, es necesario desarrollar y promover iniciativas de salud para abordar la obesidad. A pesar de las restricciones calóricas a través de una dieta o al aumento del gasto calórico por medio del ejercicio físico, muchos individuos presentan enormes dificultades para perder peso y / o mejorar los parámetros metabólicos. Esto se debe a que el tejido adiposo no se limita solo a almacenar energía, sino que, mediante la secreción de adipoquinas y hormonas relacionadas con el apetito, participa en la regulación del mismo y en la gestión del gasto energético [2]. Otra alteración en la obesidad es la inflamación en el tejido adiposo como consecuencia de una hiperglucemia sostenida, provocando más daño al tejido [67].

El RE es un orgánulo principal responsable del manejo de la energía y los nutrientes. Su disfunción se ha visto en el contexto de la obesidad y los trastornos metabólicos relacionados. El estrés y la disfunción crónica del RE es un factor clave en la obesidad y que contribuye a la inflamación, la acción hormonal anormal y el metabolismo alterado de ciertos sustratos como la glucosa en los tejidos metabólicos, como el hígado y los adipocitos [67]. Diferentes estudios han comprobado que la modulación del estrés del RE puede ser una estrategia terapéutica para disminuir la inflamación y la disfunción adiposa en enfermedades como la obesidad y diabetes [68]. Sin embargo, los enfoques terapéuticos para mejorar la adaptación al RE y el balance energético sistémico en la obesidad son limitados. Actualmente se buscan compuestos que puedan ser de ayuda para controlar algunas de estas alteraciones metabólicas. Teniendo en cuenta la evidencia acumulada sobre los efectos de los polifenoles en las alteraciones asociadas a la obesidad, se han diseñado algunos nutracéuticos específicamente basados en extractos polifenólicos que pueden ayudar a combatir la obesidad [2]. La mayoría de los polifenoles vegetales actúan como antioxidantes, pero recientemente se ha comprobado que estos compuestos son capaces de actuar como moléculas de señalización en el RE y en las vías enzimáticas involucradas en el equilibrio energético [55].

Estudios anteriores han comprobado que la mezcla polifenólica LC-HS junto con los metabolitos VB, Q y QG es capaz de revertir alteraciones producidas durante la obesidad, ampliamente demostrado en modelos celulares, animales e incluso en humanos [2, 58, 60].

Para el estudio del efecto de estos compuestos polifenólicos en la obesidad es necesario un modelo celular hipertrófico que exhibe un estado de inflamación, estrés oxidativo y resistencia

a la insulina característico del tejido adiposo en la obesidad [49]. Se ha comprobado que cuando los adipocitos 3T3-L1 se exponen a niveles elevados de glucosa hasta inducir la hipertrofia, se produce un estado de glucotoxicidad en las células provocando un aumento de marcadores del ERE [50] así como un aumento de la apoptosis [69]. De esta forma, se presenta como un modelo válido para el estudio de las alteraciones metabólicas que tienen lugar en el tejido adiposo obeso.

En este estudio se observó el papel modulador de la mezcla polifenólica LC-HS a 350-500 μM en el ERE, fue capaz de disminuir la expresión de las tres vías principales de la UPR; IRE1, ATF6 y PERK junto con el marcador de apoptosis CHOP aguas abajo. Otros autores han demostrado el papel modulador que los polifenoles pueden llegar a ejercer en la actividad del ERE, siendo capaces de modular la expresión de marcadores involucrados en la vía de la UPR [70].

Los adipocitos incubados con LC-HS mostraron una disminución de la activación de IRE1 debido a la inhibición de la fosforilación de IRE1 α en los adipocitos estimulados con alta glucosa. Además, se observó una correlación positiva entre la disminución de la expresión de las vías de ATF6 y PERK con la regulación negativa de CHOP, siendo las encargadas de regular la expresión de CHOP durante el ERE en la UPR. Otros autores han informado dicha correlación, se ha demostrado que la activación prolongada de la vía PERK puede conducir a la muerte celular producida por la sobreexpresión de ATF4 y la consiguiente inducción de CHOP [71] y que cuando se dan niveles más bajos de expresión de ATF6, la expresión de CHOP también se ve disminuida durante el ERE en pacientes que sufren obesidad [72].

LC-HS también mostró una disminución en la escisión PARP-1, marcador de apoptosis. PARP-1 se caracteriza por ayudar a las células a mantener su viabilidad. Sin embargo, cuando se produce su escisión se pierde su función y se facilita el desensamblaje celular sirviendo como marcador de células que sufren apoptosis. Por lo que si la mezcla de extractos LC-HS es capaz de reducir la expresión de PARP-1, es indicativo de que hay menos apoptosis, posiblemente debido a que se está revirtiendo el daño celular al reducir la actividad de marcadores propios del ERE. Otros autores han informado el efecto de flavonoides en la inhibición de PARP-1 en concentraciones μM , postulándose como útiles agentes terapéuticos [73]. Esto pone de manifiesto la utilidad de este extracto como modulador de la actividad de PARP-1 que, además de ser un marcador de apoptosis es capaz de participar en la regulación metabólica

modulando el metabolismo de los lípidos, la secreción y señalización de insulina e interactúa con numerosos factores de transcripción metabólicos como (NRF)-1 y NRF-2 [74], las vías de la fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K)-Akt-glucógeno sintasa quinasa-3 (GSK3) y AMPK[42].

Finalmente, las alteraciones de la morfología del RE asociadas con ERE se confirmaron, las células demostraron expansión del RE después haber sido incubadas con altas concentraciones de glucosa respecto a los adipocitos incubados en baja glucosa. Por el contrario, las células 3T3-L1 hipertróficas que habían sido incubadas con LC-HS a la concentración más alta respecto al resto de condiciones, presentaron un menor porcentaje de masa del RE. De esta forma, se pone de manifiesto nuevamente el papel de LC-HS en la regulación del RE bajo condiciones de estrés.

Los metabolitos VQ y QG presentaron un comportamiento similar al extracto LC-HS a lo largo de todo el estudio. Ambos disminuyeron la expresión de los diferentes marcadores implicados en el ERE y disminuyeron la apoptosis en las células ya que eran capaces de regular negativamente la escisión de PARP-1. Esto sugiere que estos dos metabolitos son los principales responsables del efecto del extracto en la regulación del ERE.

La Q únicamente disminuyó la activación IRE1, regulando negativamente su expresión. Se observó una inducción de la apoptosis a través de la sobreexpresión de marcadores apoptóticos como CHOP y PARP-1 cuando los adipocitos hipertróficos se incubaron a concentraciones de 25 mM de glucosa. Este resultado se correlacionó con un aumento de la masa del RE, que se genera como una respuesta a un aumento de ERE, lo que pone de manifiesto que la Q a concentraciones de 50-100 μ M es capaz de inducir apoptosis a través del aumento de ERE. Este efecto se ha observado con otros compuestos, como los marinos, donde algunos extractos son capaces de inducir ROS, daño en el ADN, activación de caspasas desencadenando en apoptosis en células tumorales [75].

Con todo ello, el extracto y sus metabolitos postulan como candidatos para continuar las investigaciones en modelos animales representativos de obesidad y corroborar si su capacidad para modular la vía de la UPR en condiciones de ERE está relacionada in vivo con la reversión de las alteraciones metabólicas de las patologías asociadas a la obesidad. Además, se pone de manifiesto que tanto una disminución como un aumento del ERE en una situación

de glucotoxicidad puede conducir a un restablecimiento de la homeostasis en el retículo ante una situación de estrés metabólico.

Dada la prevalencia y la naturaleza devastadora de las enfermedades en las que está involucrada la apoptosis inducida por estrés por RE, y el hecho de que muchas de estas enfermedades se ven favorecidas por las tendencias cada vez más prevalentes de aumento de la longevidad, disminución de la actividad física y la sobrenutrición. El avance en esta área es fundamental para lograr una comprensión más global de este tema y optimizar el diseño de nuevas estrategias terapéuticas.

CONCLUSIONES

Con base en los resultados obtenidos en este trabajo, se plantean las siguientes conclusiones:

1. La mezcla polifenólica de extractos LC-HS es capaz de revertir el estrés metabólico asociado a la glucotoxicidad y mejorar la viabilidad de los adipocitos a través de la inhibición de marcadores de la vía de la UPR asociados al ERE.
2. Se propone que los principales metabolitos responsables del efecto inhibitorio de la mezcla LC-HS son el VB y la QG. Sin embargo, si la Q participa en dicho efecto a una menor concentración requiere de futuras investigaciones.
3. La mezcla de extractos LC-HS, a través de VB y QG, reduce la masa del RE en condiciones de ERE, lo cual podría venir determinado por la inhibición de IRE1, que inicia la expansión de la membrana del RE en condiciones de estrés.
4. Los resultados de este trabajo demuestran que la mezcla de LC-HS podría ser un buen candidato para revertir las alteraciones propias de la obesidad a través de la reducción del ERE.

BIBLIOGRAFÍA

1. Amen, O.M., et al., *Endoplasmic Reticulum Stress Activates Unfolded Protein Response Signaling and Mediates Inflammation, Obesity, and Cardiac Dysfunction: Therapeutic and Molecular Approach*. Front Pharmacol, 2019. **10**: p. 977.
2. Boix-Castejón, M., et al., *Correction: Hibiscus and lemon verbena polyphenols modulate appetite-related biomarkers in overweight subjects: a randomized controlled trial*. Food Funct, 2018. **9**(7): p. 4037.
3. O'Neill, S. and L. O'Driscoll, *Metabolic syndrome: a closer look at the growing epidemic and its associated pathologies*. Obes Rev, 2015. **16**(1): p. 1-12.
4. Alicka, M. and K. Marycz, *The Effect of Chronic Inflammation and Oxidative and Endoplasmic Reticulum Stress in the Course of Metabolic Syndrome and Its Therapy*. Stem Cells Int, 2018. **2018**: p. 4274361.
5. Stafeev, I.S., et al., *Chemical Inducers of Obesity-Associated Metabolic Stress Activate Inflammation and Reduce Insulin Sensitivity in 3T3-L1 Adipocytes*. Biochemistry (Mosc), 2019. **84**(5): p. 553-561.
6. Mohamed-Ali, V., J.H. Pinkney, and S.W. Coppel, *Adipose tissue as an endocrine and paracrine organ*. Int J Obes Relat Metab Disord, 1998. **22**(12): p. 1145-58.
7. Sarjeant, K. and J.M. Stephens, *Adipogenesis*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2012. **4**(9): p. a008417.
8. Couillard, C., et al., *Hyperleptinemia is more closely associated with adipose cell hypertrophy than with adipose tissue hyperplasia*. Int J Obes Relat Metab Disord, 2000. **24**(6): p. 782-8.
9. Klötting, N. and M. Blüher, *Adipocyte dysfunction, inflammation and metabolic syndrome*. Rev Endocr Metab Disord, 2014. **15**(4): p. 277-87.
10. Jung, U.J. and M.S. Choi, *Obesity and its metabolic complications: the role of adipokines and the relationship between obesity, inflammation, insulin resistance, dyslipidemia and nonalcoholic fatty liver disease*. Int J Mol Sci, 2014. **15**(4): p. 6184-223.
11. Lackey, D. and J. Olefsky, *Regulation of metabolism by the innate immune system*. Nature Reviews Endocrinology, 2016. **12**(1): p. 15-28.

12. Rotter, V., I. Nagaev, and U. Smith, *Interleukin-6 (IL-6) induces insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes and is, like IL-8 and tumor necrosis factor-alpha, overexpressed in human fat cells from insulin-resistant subjects*. J Biol Chem, 2003. **278**(46): p. 45777-84.
13. Hotamisligil, G.S., N.S. Shargill, and B.M. Spiegelman, *Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance*. Science, 1993. **259**(5091): p. 87-91.
14. Gustafson, B. and U. Smith, *Regulation of white adipogenesis and its relation to ectopic fat accumulation and cardiovascular risk*. Atherosclerosis, 2015. **241**(1): p. 27-35.
15. Bastien, M., et al., *Overview of epidemiology and contribution of obesity to cardiovascular disease*. Prog Cardiovasc Dis, 2014. **56**(4): p. 369-81.
16. Verboven, K., et al., *Abdominal subcutaneous and visceral adipocyte size, lipolysis and inflammation relate to insulin resistance in male obese humans*. Sci Rep, 2018. **8**(1): p. 4677.
17. Ozcan, U., et al., *Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes*. Science, 2004. **306**(5695): p. 457-61.
18. Oakes, S.A. and F.R. Papa, *The role of endoplasmic reticulum stress in human pathology*. Annu Rev Pathol, 2015. **10**: p. 173-94.
19. Fagone, P. and S. Jackowski, *Membrane phospholipid synthesis and endoplasmic reticulum function*. J Lipid Res, 2009. **50 Suppl**: p. S311-6.
20. Schwarz, D.S. and M.D. Blower, *The endoplasmic reticulum: structure, function and response to cellular signaling*. Cell Mol Life Sci, 2016. **73**(1): p. 79-94.
21. Liu, Z., et al., *Protein kinase R-like ER kinase and its role in endoplasmic reticulum stress-decided cell fate*. Cell Death Dis, 2015. **6**: p. e1822.
22. Hetz, C. and S. Saxena, *ER stress and the unfolded protein response in neurodegeneration*. Nat Rev Neurol, 2017. **13**(8): p. 477-491.
23. Walter, P. and D. Ron, *The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation*. Science, 2011. **334**(6059): p. 1081-6.
24. Schuck, S., et al., *Membrane expansion alleviates endoplasmic reticulum stress independently of the unfolded protein response*. J Cell Biol, 2009. **187**(4): p. 525-36.

25. Cao, S.S., K.L. Luo, and L. Shi, *Endoplasmic Reticulum Stress Interacts With Inflammation in Human Diseases*. J Cell Physiol, 2016. **231**(2): p. 288-94.
26. Yilmaz, E., *Endoplasmic Reticulum Stress and Obesity*. Adv Exp Med Biol, 2017. **960**: p. 261-276.
27. DuRose, J.B., A.B. Tam, and M. Niwa, *Intrinsic capacities of molecular sensors of the unfolded protein response to sense alternate forms of endoplasmic reticulum stress*. Mol Biol Cell, 2006. **17**(7): p. 3095-107.
28. Hetz, C., K. Zhang, and R.J. Kaufman, *Mechanisms, regulation and functions of the unfolded protein response*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2020.
29. Basseri, S. and R.C. Austin, *Endoplasmic reticulum stress and lipid metabolism: mechanisms and therapeutic potential*. Biochem Res Int, 2012. **2012**: p. 841362.
30. Calfon, M., et al., *IRE1 couples endoplasmic reticulum load to secretory capacity by processing the XBP-1 mRNA*. Nature, 2002. **415**(6867): p. 92-6.
31. Groenendyk, J., et al., *Biology of endoplasmic reticulum stress in the heart*. Circ Res, 2010. **107**(10): p. 1185-97.
32. Harding, H.P., et al., *An integrated stress response regulates amino acid metabolism and resistance to oxidative stress*. Mol Cell, 2003. **11**(3): p. 619-33.
33. Glembotski, C.C., *Roles for ATF6 and the sarco/endoplasmic reticulum protein quality control system in the heart*. J Mol Cell Cardiol, 2014. **71**: p. 11-5.
34. Zhang, K. and R.J. Kaufman, *Signaling the unfolded protein response from the endoplasmic reticulum*. J Biol Chem, 2004. **279**(25): p. 25935-8.
35. Ye, Z., et al., *Hypothalamic endoplasmic reticulum stress as a key mediator of obesity-induced leptin resistance*. Obes Rev, 2018. **19**(6): p. 770-785.
36. Hotamisligil, G.S., *Endoplasmic reticulum stress and the inflammatory basis of metabolic disease*. Cell, 2010. **140**(6): p. 900-17.
37. Cai, M., et al., *The signaling mechanisms of hippocampal endoplasmic reticulum stress affecting neuronal plasticity-related protein levels in high fat diet-induced obese rats and the regulation of aerobic exercise*. Brain Behav Immun, 2016. **57**: p. 347-359.

38. CHAMBON, P., J.D. WEILL, and P. MANDEL, *Nicotinamide mononucleotide activation of new DNA-dependent polyadenylic acid synthesizing nuclear enzyme*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1963. **11**: p. 39-43.
39. Szántó, M. and P. Bai, *The role of ADP-ribose metabolism in metabolic regulation, adipose tissue differentiation, and metabolism*. *Genes Dev*, 2020. **34**(5-6): p. 321-340.
40. Kim, J., et al., *Poly(ADP-ribose) polymerase 1 activation is required for cisplatin nephrotoxicity*. *Kidney Int*, 2012. **82**(2): p. 193-203.
41. Bai, P., et al., *Poly(ADP-ribose) polymerase-2 [corrected] controls adipocyte differentiation and adipose tissue function through the regulation of the activity of the retinoid X receptor/ peroxisome proliferator-activated receptor-gamma [corrected] heterodimer*. *J Biol Chem*, 2007. **282**(52): p. 37738-46.
42. Walker, J.W., H.B. Jijon, and K.L. Madsen, *AMP-activated protein kinase is a positive regulator of poly(ADP-ribose) polymerase*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006. **342**(1): p. 336-41.
43. Bursch, W., et al., *Programmed cell death (PCD). Apoptosis, autophagic PCD, or others?* *Ann N Y Acad Sci*, 2000. **926**: p. 1-12.
44. Vida, A., et al., *Metabolic roles of poly(ADP-ribose) polymerases*. *Semin Cell Dev Biol*, 2017. **63**: p. 135-143.
45. Kim, S. and C.H. Woo, *Laminar Flow Inhibits ER Stress-Induced Endothelial Apoptosis through PI3K/Akt-Dependent Signaling Pathway*. *Mol Cells*, 2018. **41**(11): p. 964-970.
46. Poulos, S.P., M.V. Dodson, and G.J. Hausman, *Cell line models for differentiation: preadipocytes and adipocytes*. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2010. **235**(10): p. 1185-93.
47. Zebisch, K., et al., *Protocol for effective differentiation of 3T3-L1 cells to adipocytes*. *Anal Biochem*, 2012. **425**(1): p. 88-90.
48. Morrison, R.F. and S.R. Farmer, *Hormonal signaling and transcriptional control of adipocyte differentiation*. *J Nutr*, 2000. **130**(12): p. 3116S-3121S.
49. Yeop Han, C., et al., *Differential effect of saturated and unsaturated free fatty acids on the generation of monocyte adhesion and chemotactic factors by adipocytes: dissociation of adipocyte hypertrophy from inflammation*. *Diabetes*, 2010. **59**(2): p. 386-96.
50. Tanis, R.M., et al., *The effect of glucose concentration and sodium phenylbutyrate treatment on mitochondrial bioenergetics and ER stress in 3T3-L1 adipocytes*. *Biochim Biophys Acta*, 2015. **1853**(1): p. 213-21.

51. Materska, M. and I. Perucka, *Antioxidant activity of the main phenolic compounds isolated from hot pepper fruit (Capsicum annum L)*. J Agric Food Chem, 2005. **53**(5): p. 1750-6.
52. Durazzo, A., et al., *Polyphenols: A concise overview on the chemistry, occurrence, and human health*. Phytother Res, 2019. **33**(9): p. 2221-2243.
53. Singla, R.K., et al., *Natural Polyphenols: Chemical Classification, Definition of Classes, Subcategories, and Structures*. J AOAC Int, 2019. **102**(5): p. 1397-1400.
54. Kao, E.S., et al., *Polyphenolic extract from Hibiscus sabdariffa reduces body fat by inhibiting hepatic lipogenesis and preadipocyte adipogenesis*. Food Funct, 2016. **7**(1): p. 171-82.
55. Bjørklund, G. and S. Chirumbolo, *Role of oxidative stress and antioxidants in daily nutrition and human health*. Nutrition, 2017. **33**: p. 311-321.
56. Quirantes-Piné, R., et al., *Phenylpropanoids and their metabolites are the major compounds responsible for blood-cell protection against oxidative stress after administration of Lippia citriodora in rats*. Phytomedicine, 2013. **20**(12): p. 1112-8.
57. Fernández-Arroyo, S., et al., *Bioavailability study of a polyphenol-enriched extract from Hibiscus sabdariffa in rats and associated antioxidant status*. Mol Nutr Food Res, 2012. **56**(10): p. 1590-5.
58. Herranz-López, M., et al., *Synergism of plant-derived polyphenols in adipogenesis: perspectives and implications*. Phytomedicine, 2012. **19**(3-4): p. 253-61.
59. Herranz-López, M., et al., *Quercetin metabolites from Hibiscus sabdariffa contribute to alleviate glucolipotoxicity-induced metabolic stress in vitro*. Food Chem Toxicol, 2020. **144**: p. 111606.
60. Herranz-López, M., et al., *Lemon verbena (Lippia citriodora) polyphenols alleviate obesity-related disturbances in hypertrophic adipocytes through AMPK-dependent mechanisms*. Phytomedicine, 2015. **22**(6): p. 605-14.
61. Herranz-López, M., et al., *Differential effects of a combination of Hibiscus sabdariffa and Lippia citriodora polyphenols in overweight/obese subjects: A randomized controlled trial*. Sci Rep, 2019. **9**(1): p. 2999.
62. Lee, Y.S., et al., *Metaboloid*. Nutrients, 2018. **10**(9).
63. Shen, C.Y., et al., *Anti-ageing active ingredients from herbs and nutraceuticals used in traditional Chinese medicine: pharmacological mechanisms and implications for drug discovery*. Br J Pharmacol, 2017. **174**(11): p. 1395-1425.

64. Yoshizumi, M., et al., *Quercetin glucuronide prevents VSMC hypertrophy by angiotensin II via the inhibition of JNK and AP-1 signaling pathway*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002. **293**(5): p. 1458-65.
65. Vertuani, S., et al., *Activity and stability studies of verbascoside, a novel antioxidant, in dermo-cosmetic and pharmaceutical topical formulations*. *Molecules*, 2011. **16**(8): p. 7068-80.
66. Hurt, R.T., et al., *The obesity epidemic: challenges, health initiatives, and implications for gastroenterologists*. *Gastroenterol Hepatol (N Y)*, 2010. **6**(12): p. 780-92.
67. Sikkeland, J., et al., *Inflammation and ER stress differentially regulate STAMP2 expression and localization in adipocytes*. *Metabolism*, 2019. **93**: p. 75-85.
68. Li, A., et al., *Metformin and resveratrol inhibit Drp1-mediated mitochondrial fission and prevent ER stress-associated NLRP3 inflammasome activation in the adipose tissue of diabetic mice*. *Mol Cell Endocrinol*, 2016. **434**: p. 36-47.
69. Alnahdi, A., A. John, and H. Raza, *Augmentation of Glucotoxicity, Oxidative Stress, Apoptosis and Mitochondrial Dysfunction in HepG2 Cells by Palmitic Acid*. *Nutrients*, 2019. **11**(9).
70. Lee, J., et al., *Resveratrol, an activator of SIRT1, improves ER stress by increasing clusterin expression in HepG2 cells*. *Cell Stress Chaperones*, 2019. **24**(4): p. 825-833.
71. Cnop, M., et al., *Selective inhibition of eukaryotic translation initiation factor 2 alpha dephosphorylation potentiates fatty acid-induced endoplasmic reticulum stress and causes pancreatic beta-cell dysfunction and apoptosis*. *J Biol Chem*, 2007. **282**(6): p. 3989-97.
72. López-Domènech, S., et al., *Moderate weight loss attenuates chronic endoplasmic reticulum stress and mitochondrial dysfunction in human obesity*. *Mol Metab*, 2019. **19**: p. 24-33.
73. Dal Piaz, F., et al., *Identification and mechanism of action analysis of the new PARP-1 inhibitor 2''-hydroxygenkwanol A*. *Biochim Biophys Acta*, 2015. **1850**(9): p. 1806-14.
74. Bai, P., et al., *Poly(ADP-ribose) polymerases as modulators of mitochondrial activity*. *Trends Endocrinol Metab*, 2015. **26**(2): p. 75-83.
75. Ruiz-Torres, V., et al., *Marine Invertebrate Extracts Induce Colon Cancer Cell Death via ROS-Mediated DNA Oxidative Damage and Mitochondrial Impairment*. *Biomolecules*, 2019. **9**(12).