

Estudio *in vitro* del efecto de triterpenos de *Eucalyptus tereticornis* sobre la respuesta bioenergética celular

DANIEL BERNARDO RAMÍREZ OSORIO

PREGRADO EN BIOLOGÍA

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ESCUELA DE CIENCIAS

UNIVERSIDAD EAFIT

Medellín, 11 de mayo de 2020

Estudio *in vitro* del efecto de triterpenos de *Eucalyptus tereticornis* sobre la respuesta bioenergética celular

DANIEL BERNARDO RAMÍREZ OSORIO

Trabajo de grado presentado como requisito para optar al título de Biólogo

Asesor: Luis Alejandro Gómez Ramírez, Ph.D.

MEDELLÍN

UNIVERSIDAD EAFIT

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ESCUELA DE CIENCIAS

DEDICATORIA Y AGRADECIMIENTOS

Este trabajo de grado es dedicado a mi familia, mi padre, mi madre y hermano, quienes me han acompañado y apoyado desde el inicio y durante todo mi proceso de formación profesional, gracias por su confianza en mí, confianza que me han impulsado a alcanzar mis metas.

Agradezco a la Universidad EAFIT por el apoyo, en especial a mi asesor el Doctor Luis Alejandro Gómez, por su compromiso, disposición y confianza brindada durante el tiempo de la realización de mi tesis; también quiero agradecer al Doctor Sergio Acín Martínez y al Doctor Norman Balcaraz Morales del grupo genética molecular de La Sede De Investigación De La Universidad de Antioquia, quienes muy amablemente pusieron a mi disposición los insumos requeridos y las instalaciones para la realización del proyecto; agradezco a mis compañeros en La SIU y en EAFIT, Diana Muñoz, Laura Betancur, Sofía Quintero y Ana Vélez por su ayuda durante el desarrollo del trabajo experimental. Finalmente agradezco a mi novia Laura Guzmán, quien ha sido fuente de luz y apoyo incondicional en todo momento.

CONTENIDO

1. RESUMEN.....	6
2. INTRODUCCIÓN	7
3. JUSTIFICACIÓN.....	9
4. OBJETIVOS.....	11
4.1 OBJETIVO GENERAL.....	11
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	11
5. MARCO TEORICO	12
5.1 La obesidad como patología de las civilizaciones.....	12
5.2 Origen molecular de la obesidad inflamatoria y algunas de sus comorbilidades asociadas.	12
5.3 Fármacos y productos naturales cómo tratamiento de la obesidad inflamatoria y sus condiciones metabólicas asociadas.....	13
5.4 Importancia clínica de triterpenos pentacíclicos (TP) aislados de fuentes naturales....	15
5.4.1 Importancia clínica del ácido ursólico (AU):	15
5.4.2 Importancia clínica del ácido oleanólico (AO).....	16
5.4.3 Importancia clínica de la lactona del ácido ursólico (3B-Hydroxy-urs-11-en-28,13B-olido): 16	
5.5 Rol de la respuesta bioenergética mitocondrial en la obesidad y sus enfermedades metabólicas asociadas.....	16
5.6 Respiración mitocondrial como posible biomarcador para la prospección de nuevos fármacos y patologías metabólicas producto de la obesidad.....	17
6. MÉTODOS Y MATERIALES	20
6.1 Obtención del extracto de <i>Eucalyptus tereticornis</i> (Et).....	20
6.2 Cultivo celular y diseño de experimentos para tratamientos y controles	21
6.3 Preparación, obtención y conteo de células viables para los ensayos de bioenergética mitocondrial.....	22
6.4 Determinación de condiciones óptimas para los ensayos de respirometría de alta resolución.	22
6.5 Análisis de respirometría de alta resolución en células intactas.....	22
6.6 Evaluación de modulación de la respuesta bioenergética mitocondrial en células intactas.....	23
6.7 Análisis estadístico	23
7. RESULTADOS	24
7.1 Evaluación de las condiciones óptimas para la respiración celular en fibroblastos 3T3-L1 y mioblastos C2C12.	24
7.2 Caracterización bioenergética en macrófagos J774 no inflamatorios (un resultado preliminar).	25

7.3 Consumo de oxígeno rutinario y asociado a la discriminación bioenergética mitocondrial en fibroblastos 3T3-L1 y mioblastos C2C12.	26
7.4 Comparativa entre las respuestas bioenergéticas de fibroblastos 3T3-L1 y adipocitos diferenciados.	28
7.5 Comparativa entre las respuestas bioenergéticas de mioblastos C2C12 y miotubos diferenciados.	30
7.6 Comparativa entre los parámetros bioenergéticos asociados a la respiración mitocondrial de adipocitos 3T3-L1 diferenciados (control) y adipocitos tratados con extracto de Et.	33
7.7 Comparativa entre los parámetros bioenergéticos asociados a la respiración mitocondrial de miotubos diferenciados C2C12 (control) y miotubos tratados con extracto de Et.	35
7.8 Evaluación de la reserva bioenergética en adipocitos 3T3-L1 y miotubos tratados con 50 ug/mL de extracto de Eucalyptus Tereticornis.	38
8. DISCUSIÓN	40
8.1 Características respiratorias asociada a la diferenciación celular.	40
8.2 Rol de la bioenergética mitocondrial en sistemas celulares afectados por la obesidad.	41
8.3 Efecto del extracto rico en TPs de hojas de Eucalyptus tereticornis en la modulación bioenergética de adipocitos 3T3-L1 y miotubos C2C12.	43
9. CONCLUSIONES	46
10. BIBLIOGRAFÍA	47

1. RESUMEN

La obesidad es una fisiopatología producto de un desequilibrio energético entre calorías consumidas y gastadas. En la época actual donde el índice de sedentarismo tiende a crecer y la ingesta de productos con alto contenido calórico es más asequible para la humanidad, se genera un ambiente propicio para el aumento en la adiposidad, esto conlleva a que la obesidad alcance proporciones epidémicas a nivel global, convirtiéndose así en uno de los principales problemas de salud pública en países desarrollados y en vías de desarrollo. Esta enfermedad genera un aumento en los gastos públicos nacionales, ya que su diagnóstico se encuentra directamente relacionado con la aparición de otras complicaciones de salud asociadas a ella, disfunciones metabólicas como la diabetes tipo 2 y síndromes inflamatorios crónicos.

Los medicamentos aprobados para el tratamiento de la obesidad, tiene efectos secundarios que solo permiten su uso intermitente y los procedimientos bariátricos son costosos y no son la solución más viable a un problema de carácter global, es por lo anterior, que los científicos buscan activamente nuevos fármacos derivados de componentes naturales o metabolitos secundarios de plantas para controlar la obesidad y sus comorbilidades con un bajo grado de efectos adversos para los individuos que la padecen. Desde la medicina tradicional china, hasta nuestros antepasados en occidente, existen registro de productos naturales ya investigados con potenciales antiinflamatorios y antiglicémicos, que parecen ser lo suficientemente seguros como opciones farmacológicas. Extractos de triterpenos pentacíclicos de tipo ursano y oleano presentes en hojas de *Eucalyptus tereticornis* parece ser una alternativa, ya que estudios recientes confirman que disminuyen la inflamación y la grasa visceral en modelos murinos obesos suplementados con el extracto; modelos in vitro permitirían dilucidar todos los posibles mecanismos de los triterpenos a nivel celular, es por esto que el objetivo de este proyecto fue identificar los efectos del extracto rico en triterpenos de *E. tereticornis* sobre células intactas desde una perspectiva bioenergética mitocondrial, caracterizando en términos respiratorios la acción de las moléculas bioactivas sobre modelos celulares, usando el equipo Oxygraph-2k. Nuestros resultados indican que para dos líneas celulares, adipocitos 3T3-L1 y miotubos C2C12, aunque existe una disminución tanto en la velocidad de consumo de oxígeno rutinaria, como en la reserva bioenergética de células tratadas con el extracto de Et, dicha baja no es estadísticamente significativa comparada con los controles diferenciados no tratados de las líneas celulares mencionadas, además la caracterización bioenergética en células C2C12 y 3T3-L1 en proceso de diferenciación, indica un cambio en el fenotipo respiratorio que implica una mayor tasa metabólica dependiente de la fosforilación oxidativa en adipocitos y miotubos comparados con sus estados no diferenciados de fibroblastos y mioblastos respectivamente. Cabe agregar que para macrófagos J774 no inflamatorios, resultados preliminares sugieren una baja actividad respiratoria, lo que explicaría su poca dependencia metabólica de la fosforilación oxidativa.

Palabras claves: Obesidad, adipocitos, miotubos, macrófagos, respuesta bioenergética, reserva bioenergética, fosforilación oxidativa, extracto de Et, triterpenos pentacíclicos, velocidad de consumo de oxígeno, respiración celular.

2. INTRODUCCIÓN

Cambios culturales y ambientales asociados a desequilibrios dietarios, derivados del desarrollo socioeconómico de las naciones, ha generado desde la década de los 70 un aumento preocupante de la obesidad y el sobrepeso en la población mundial, ya que, en aproximadamente 40 años hasta la fecha actual, estimados de la prevalencia de esta enfermedad se ha triplicado, donde el número total de niños, jóvenes y adultos con esta patología oscilan entre los 800 millones, que para el año 2016 representaban el 13% de la población mundial. Sumado a lo antepuesto, el 39% de la población adulta padece de sobrepeso, es decir que existe un número mucho mayor de personas propensas a contraer obesidad en algún momento de su vida [1]. Como caso particular, Colombia se encuentra dentro de los estimados de esta peligrosa tendencia nutricional, ya que, para el 2015 el 56,4% de la población joven y adulta del país tenía exceso de peso [2].

Entre los graves problemas de la obesidad, que ciertamente presenta proporciones epidémicas, se encuentra que esta enfermedad está directamente relacionada con un aumento en la mortalidad por todas las causas, es decir, la obesidad aumenta el índice de mortalidad, que en muchos casos es prematura, por el desarrollo de diferentes comorbilidades tales como: enfermedades cardiovasculares, enfermedades metabólicas como la diabetes mellitus tipo 2 (DM2), algunos tipos de cáncer, como el de próstata y mama, entre otras [1, 3].

El reto a los gobiernos y sus ministerios de salud pública para esta condición clínica global, representa cuantiosos gastos de dinero, de forma directa, en servicio hospitalario e indirecta, al reducirse la fuerza laboral de quien padece la enfermedad [4]; lo anterior implica desde un impacto directo, un gasto 190 millones de dólares/año solo en EUA, es decir, un 20% de sus gastos hospitalarios anuales; y desde la perspectiva indirecta, los gastos acumulados para todas las personas que padecen sobrepeso u obesidad puede estar alrededor de los 5 billones de dólares/año [5, 6].

La principal enfermedad asociada a la obesidad es la diabetes mellitus tipo 2, una patología metabólica producto de la resistencia a la insulina y el desequilibrio glucémico. Estadísticas recientes, sugieren que un individuo obeso es 90 veces más propenso a contraer diabetes que una persona con bajo índice de adiposidad visceral [7]. Al igual que la obesidad, la DM2 ha aumentado dramáticamente desde comienzos del siglo XX, factores asociados al bajo índice de ejercicio físico y al consumo de alimentos hipercalóricos puede provocar que la incidencia de la enfermedad sea el doble para el 2025, pasando de 194 millones de casos en el año 2000 a 344 millones de personas, donde China, India y EUA, serán los países más afectados con más del 30% de los casos totales a nivel mundial [8].

Los datos más recientes sobre la situación actual en Colombia, proporcionados por el ministerio de salud indican que el 18,7% de los habitantes del país padecen obesidad, y más de la mitad de los adultos colombianos entre 18 y 64 años, se encuentran en riesgo de sufrir esta patología, lo anterior implica que el panorama nacional sigue la tendencia de esta difícil situación global [9]. Los números de DM2 en Colombia tampoco son alentadores, ya que, el análisis de la situación de salud (ASIS) de 2017 ha revelado que esta enfermedad, junto con afecciones del sistema vascular y respiratorio, son las principales causas de muerte en un país donde el 11,2% de los adultos mayores afiliados al sistema nacional de salud ha sido diagnosticado alguna vez con diabetes [10], lo anterior implica, una reducción sustancial de 0,24% en la expectativa de vida de los colombianos afectados [11].

Las alternativas farmacológicas se han quedado cortas en el mundo y en Colombia para controlar la obesidad, medicamentos como la sibutramina que genera sensación neuronal de

sacidad, pierde su efectividad a largo plazo [12] y el orlistat, que promueve la lipólisis puede generar insuficiencias hepáticas si los tratamientos se prolongan más de lo debido [13].

En primera instancia se deben implementar estrategias que permitan un aumento en el índice de actividad física, en conjunto con una dieta saludable [14], pero en un mundo cada vez más globalizado, es un reto controlar enfermedades de escala mundial, solo con medidas preventivas. Es necesario la investigación de nuevas dianas farmacológicas derivadas de productos naturales que puedan controlar los procesos inflamatorios de bajo grado y así evitar desencadenar enfermedades más graves, producidas por una adiposidad descontrolada.

Existe registros de muchos productos naturales con potencial antiinflamatorio y antiobesidad; moléculas derivadas del isopreno como los triterpenos, polifenoles, flavonas y resinas entre otros, pueden ser propuestos como nuevos tratamientos para el control de la obesidad y las enfermedades metabólicas [15–18]; ya que estos productos pueden generar cambios en los niveles de moléculas señalizadores de inflamación, generando a su vez, cambios en los perfiles de respiración mitocondrial [19].

Comprendiendo la necesidad real de nuevas alternativas, el grupo de investigación de genética molecular de la Universidad de Antioquia en asociación con el grupo de química orgánica de productos naturales, ha logrado un extracto beneficioso de hojas de *Eucalyptus tereticornis* rico en triterpenos con efectos hipoglucemiantes confirmados en un modelo animal obeso [20]. Si bien, estos posibles efectos terapéuticos se ven reflejados en un modelo in vivo, el mecanismo de acción de este extracto es desconocido a nivel celular donde confluyen diferentes vías de señalización asociadas a la condición mórbida he inflamatoria de la obesidad, ya que, estas vías que involucran factores como NF – kB, TNF alfa entre otros, modulan la función celular promoviendo la aparición de las complicaciones implicadas con el exceso de peso, deteriorando por ejemplo el metabolismo asociado a la fosforilación oxidativa e inclusive perturbando la función y la respiración mitocondrial completa [21–23]. Lo anterior implica que, aunque existen afecciones a diferentes procesos celulares relacionados con la señalización inflamatoria o con el metabolismo oxidativo, muchos de estos procesos involucran a la mitocondria; es por esto, que nuestro grupo de investigación sugiere como hipótesis, que parte del efecto de los triterpenos se puede explicar a la luz de una modulación o cambio en la respuesta bioenergética celular.

En este orden de ideas y teniendo en cuenta la hipótesis anterior, el objetivo de este trabajo es realizar una caracterización bioenergética in vitro sobre líneas celulares en presencia de este extracto, para confirmar un posible mecanismo de acción desde una perspectiva que ha sido poco usada en estudios de esta índole y que puede convertirse en una alternativa prometedora para el establecimiento médico - terapéutico de metabolitos promisorios.

3. JUSTIFICACIÓN

La obesidad genera una acumulación acelerada de grasa en exceso (adiposidad), que se asocia con numerosos trastornos metabólicos, como la hiperlipidemia, la diabetes mellitus, la hipertensión arterial y la aterosclerosis, entre otras complicaciones [24]. La evidencia acumulada indica que estas complicaciones asociadas a la obesidad son el resultado de una inflamación crónica mediada por macrófagos que convierte al tejido adiposo en un órgano endocrino, capaz de promover procesos fisiológicos complejos como la diapédesis [25]. Monocitos y macrófagos pro-inflamatorios, inclusive los mismos adipocitos, secretan péptidos señales como citoquinas y hormonas que promueven un aumento notable en la capacidad de contención de grasa en células del tejido adiposo (hipertrofia de adipocitos), este evento es la fuente principal de patologías asociadas a la obesidad como la dislipidemia [25, 26]. En síntesis, este trastorno metabólico y otros como la resistencia a la insulina en DM2 son el resultado de un desequilibrio entre moléculas presentes en vías de señalización mediadas en algunos casos por interleucinas (familia de citoquinas) [26, 27].

Los eventos de hipertrofia adiposa que vienen acompañados de una inflamación sistémica del tejido graso se pueden convertir en un blanco importante para nuevos fármacos, es decir, productos naturales promisorios que puedan modificar el metabolismo celular evitando estos eventos hipertróficos permitirían una reducción notable en la inflamación localizada en el tejido y la cantidad de ácidos grasos libres en el torrente sanguíneo [28]. Una manera de identificar este crecimiento anómalo del adipocito diferenciado, está relacionado en gran medida con su función mitocondrial, ya que, se tiene evidencia de una regulación negativa de la biogénesis de este organelo y además un desacoplamiento marcado en características bioenergéticas como la producción de ATP dependiente del flujo de electrones en la fosforilación oxidativa lo que se asocia con una baja respiratoria mitocondrial [29–31]

Teniendo en cuenta lo anterior, el uso de equipos innovadores de respirometría de alta resolución para analizar la bioenergética mitocondrial de células intactas, permitiría conocer el estado en tiempo real de adipocitos maduros que almacenan triglicéridos, además de identificar también la acción de diferentes compuestos que puedan impactar el metabolismo oxidativo en poblaciones celulares y tejidos involucrados en esta condición clínica. Lo anterior se ve justificado en un creciente número de investigaciones recientes que han encontrado relaciones entre la alteración de la bioenergética mitocondrial y algunas enfermedades metabólicas crónicas aquí mencionadas (obesidad y diabetes) [32, 33], postulando así, a las características respiratorias mitocondrial como un posible bio-marcador de patologías y posibles terapias de origen natural. Este último con una gran relevancia, puesto que, la respiración mitocondrial, producto de la fosforilación oxidativa, puede dar cuenta de cambios en las características adipocíticas del tejido graso, es decir, los adipocitos, pueden cambiar su fenotipo de almacenamiento de grasa (adipocito blanco) a otros fenotipos que permitan liberar esa grasa almacenada (adipocitos marrón) por diferentes vías de señalización mitocondriales, vías de señalización que pueden activadas por moléculas provenientes de plantas o fármacos sintéticos [19, 34].

Si bien hay autores que proponen el uso de caracterizaciones respiratorias mitocondriales, para identificar los cambios fenotípicos en el tejido adiposo [35], se necesitan más investigaciones que promuevan el uso de la bioenergética mitocondrial como una alternativa para explicar en alguna medida, el mecanismo de acción de diferentes pro-fármacos de cualquier origen para el control de las enfermedades metabólicas; como se discutió en el inicio de esta sección, el tejido adiposo hipertrofiado en la obesidad presenta una respuesta bioenergética disminuida comparada con el tejido adiposo diferenciado, inclusive, otro tipo

de células involucradas en la condición inflamatoria crónica de la obesidad como lo son los macrófagos, parecen aumentar su metabolismo oxidativo, lo que implica un alza en la respiración celular como respuesta fenotípica asociada al gasto energético dependiente de su estado inflamatorio [29, 36], cabe destacar que estas caracterizaciones, son el resultado de la implementación de equipos como el Oxygraph 2k, su uso también puede ser extrapolado a metabolitos promisorios que generando cambios en la bioenergética mitocondrial eviten alcanzar un estado inflamatorio e hipertrofiado en tejidos involucrados en la patología de la obesidad.

Es por esto por lo que, el uso de extractos de hojas de *Eucalyptus tereticornis* en nuestros ensayos in vitro sobre adipocitos y otras células presentes en el tejido graso como miotubos del musculo esquelético (que también presentan un desacoplamiento en la generación de ATP vía fosforilación oxidativa en modelos animales obesos [37]), para realizar su caracterización respiratoria, aportaría nuevos resultados a la inminente brecha de conocimientos existente para estos temas, además, este sería el primer estudio que analiza la acción de triterpenos pentacíclicos, (componentes activos del extracto) en la respuesta bioenergética de células especializadas que cumplen un papel importante en el exceso de adiposidad como enfermedad.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar los efectos de triterpenos presentes en *Eucalyptus tereticornis* sobre la respuesta bioenergética en un modelo in vitro de tres líneas celulares de origen animal, adipocitos (3T3-L1), macrófagos (J774) y miotubos (C2C12).

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Establecer las características respiratorias y la capacidad de reserva bioenergética en las líneas celulares 3T3-L1, C2C12 y J774.

Evaluar el efecto de la diferenciación celular sobre la respuesta bioenergética en las líneas celulares 3T3-L1 y C2C12.

Determinar el efecto del tratamiento con el Extracto de *E. Tereticornis* sobre la respuesta bioenergética de las líneas celulares 3T3-L1 y C2C12.

5. MARCO TEORICO

5.1 La obesidad como patología de las civilizaciones

La obesidad es un trastorno crónico caracterizado por el aumento excesivo de grasa corporal [1], esta enfermedad se diagnostica por medio de exámenes antropométricos como el Índice de Masa Corporal (IMC); este índice es una relación sencilla entre el peso corporal en kilogramos y el cuadrado de la altura en metros, el resultado de este cálculo, junto con otras mediciones más precisas, da cuenta de la cantidad de masa grasa que posee un individuo [1], [38]. Las personas con valores de IMC superiores a 30 kg/m^2 , son consideradas obesas, es decir, presentan un exceso de adiposidad; cabe destacar también, que un IMC superior a 25 kg/m^2 refleja un estado de sobrepeso, que pone en condición de riesgo quien lo padece [38]. Como la mayoría de las condiciones metabólicas, la obesidad es producto de los primeros asentamientos humanos que elevaron el índice de sedentarismo y generaron un desbalance en el consumo y la quema de calorías, este origen es compartido con la diabetes tipo 2, de acuerdo con sus primeros registros [39]. Lo anterior explica en parte el aumento a gran escala de estas enfermedades, es decir, en el mundo actual, no se necesita realizar actividades físicas directas para garantizar alimentos para todo en año, en contraste con la vida del hombre recolector, que usaba su capacidad física para recorrer grandes distancias lo que se traduce a un alto gasto energético para conseguir alimento; en síntesis, la actividad física es una terapia preventiva para las enfermedades metabólicas no transmisibles, asociadas con un desequilibrio dietario [39–41].

5.2 Origen molecular de la obesidad inflamatoria y algunas de sus comorbilidades asociadas.

Desde finales del siglo XIX, investigadores han propuesto que la función del tejido adiposo no solo tienen que ver con el resguardo de grasa en forma de triglicéridos, parece ser, que el tejido graso tiene una alta actividad endocrina y paracrina [42], resultado de un metabolismo dinámico e integrativo, que involucra hormonas plasmáticas presentes en la perfusión sanguínea, factores externos como el ambiente, e internos a través de la secreción de adipocitocinas y adipocinas [42, 43]. Estas moléculas producidas por los adipocitos maduros, son claves para la regulación de la homeostasis lipídica, al modular procesos fisiológicos como el comportamiento alimenticio y la inflamación [44]. Un cambio en estos procesos por la adiposidad se asocia a la génesis de comorbilidades dependientes de la obesidad [45]. Teniendo en cuenta lo anterior la obesidad se asocia con una inflamación crónica leve donde adipocitos, células del endotelio vascular y macrófagos de fenotipo inflamatorio, son los principales actores de esta condición, al secretar moléculas como: interleucina 6 – 1beta – 8, el factor de necrosis tumoral alfa (TNF α), MCP – 1, entre otras [46–48]. El resultado de la inflamación crónica como acción de las adipocinas liberadas, esta directamente relacionada con la aparición de enfermedades cardiovasculares y otros problemas metabólicos como la diabetes tipo 2, producto de la resistencia a la insulina causada por la interleucina 1beta al fosforilar de forma inhibitoria a la serina del sitio activo del sustrato receptor tipo 1 (IRS-1) [25].

Otro proceso importante y de regulación positiva que cabe destacar de la obesidad inflamatoria, es la condición hipertrófica anormal de los adipocitos. Este proceso involucra los tres tipos de células ya mencionados y comienza, cuando los macrófagos proinflamatorios del tejido adiposo secretan la proteína quimiotáctica de monocitos tipo 1 (MCP1), esta citoquina recluta monocitos que circulan en la sangre y se abren paso al tejido

adiposo por medio de células del endotelio vascular, una vez en el tejido adiposo, los monocitos liberan el factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) que promueve la maduración y acumulación anómala de triacilglicéridos en adipocitos, provocando un proceso hipertrófico que culmina en la muerte celular y en la liberación al torrente sanguíneo de ácidos grasos libres que regulan positivamente la secreción de TNF α [49, 50]. Este mecanismo de regulación positiva prolonga de forma crónica la inflamación y da paso a una patología asociada conocida como diapédesis [25].

El tejido adiposo cumple las funciones de un órgano endocrino, que cuando se encuentra regulado de forma anómala por un exceso de adiposidad, puede provocar inflamaciones sistémicas que pone en riesgo la salud y la calidad de vida de las personas.

5.3 Fármacos y productos naturales cómo tratamiento de la obesidad inflamatoria y sus condiciones metabólicas asociadas.

Como se ha explicado en secciones anteriores, la obesidad mórbida presenta una prevalencia epidémica en todo el mundo y es la puerta de entrada para otras enfermedades metabólicas como la diabetes mellitus tipo 2 y las enfermedades cardiovasculares [51, 52]. Recientemente para todas estas condiciones metabólicas o patologías derivadas del padecimiento de inflamaciones crónicas causada por la obesidad, se han aprobado diferentes estrategias farmacológicas que hacen frente a este problema de salud pública [14].

Conociendo en principio las diferentes citoquinas que causan la inflamación crónica en la obesidad y en la diabetes tipo 2, como las adipocinas y algunos factores nucleares y plasmáticos, sus agonistas moleculares se postulan como importantes tratamientos para el cuidado de estas enfermedades metabólicas [53].

El anticuerpo agonista de la interleucina 1beta conocido como canakizumab, tiene un potencial efecto antiinflamatorio genera una mejora sustancial a la resistencia a la insulina [54]. Otro agonista de la IL – 1beta, conocido como anakinra, mejora la función de las células beta pancreáticas, no obstante, la dosificación por inyecciones diarias puede producir efectos adversos relacionados pérdida de sensibilidad en el tiempo [55].

Un pro-fármaco importante en el tratamiento de las enfermedades metabólicas e inflamatorias, es salicilato de sodio que a altas concentraciones inhibe la expresión del factor nuclear kappa beta y genera un aumento en la sensibilidad a la insulina lo que implica un mayor control glucémico en pacientes con diabetes tipo 2 [56]; si bien esta sal de sodio tiene un bajo costo de producción, presenta efectos secundarios importantes como un leve aumento en los niveles de colesterol LDL, es por esto que, se necesitan estudios extensos para evaluar más a profundidad sus impactos colaterales [57, 58].

Uno de los fármacos comercializados abiertamente, es la metformina, el primer tratamiento establecido para la diabetes mellitus tipo 2, este fármaco sintético, activa la vía de señalización AMPk que parece promover efectos antiinflamatorios y antioxidantes [59]. La metformina, disminuye la producción de especies reactivas, atenúa la resistencia a la insulina y suprime la producción de glucosa hepática, otorgándose una clara actividad hipoglucemiante [60]. En general, este medicamento parece tener otros beneficios como efectos cardioprotectores y el un índice muy bajo de fracaso terapéutico [61, 62].

En general se han postulado diferentes medicamentos de origen sintético, con distintas dianas farmacológicas, por ejemplo, la rosiglitazona a bajas dosis aumenta la concentración adiponectina, molécula con un potente efecto antiinflamatorio [63]. Cabe destacar que,

aunque se han realizado esfuerzos para la postulación de nuevos medicamentos, estos no han sido suficientes, porque su origen sintético trae consigo efectos adversos importantes.

La investigación de diferentes compuestos naturales que se usan en la medicina oriental y de diferentes culturas, podría ser la clave para encontrar alternativas rápidas y seguras para el tratamiento de la obesidad inflamatoria y sus patologías metabólicas asociadas.

Según la organización mundial de la salud, cerca del 80% de los habitantes del planeta, usan la medicina tradicional para las dolencias que no requieren atención primaria en salud, la mayoría de esas terapias requiere la infusión o el extracto de alguna hierba o planta [64]. Teniendo en cuenta lo anterior, las plantas parecen presentar un sin número de moléculas promisorias, para el tratamiento de diferentes enfermedades, entre ellas las condiciones inflamatorias crónicas como la obesidad, que desencadena algunos tipos de desórdenes metabólicos [65].

La curcumina, un compuesto polifenólico, presenta actividad antiinflamatoria en modelos animales de ratas obesas y diabéticas, al parecer la ingesta oral de este polifenol, no genera efectos secundarios y logra aumentar la sensibilidad a la insulina y la reducción en macrófagos de fenotipo inflamatorio dentro del tejido adiposo, por la supresión del factor nuclear kappa beta un marcador de inflamación en la obesidad [66].

Otros polifenoles (PP) aislados de la vid, disminuyen el estrés oxidativo y la resistencia a la insulina en personas obesas y con diabetes tipo 2, luego de haber consumido una dieta alta en fructosa, los PP suplementados, disminuyeron el índice glucémico, producto de una disminución en el estrés oxidativo y una mayor sensibilidad a la insulina [67, 68].

Moléculas diferentes a los polifenoles como la quercetina que es un flavonona, muy común en la dieta humana, tiene un potente efecto antiinflamatorio, al atenuar la expresión de las interleucinas 1beta, 6 y 8, junto con el factor de necrosis tumoral alfa, en cultivos primarios de tejido adiposo, realizando pretratamientos a las células con este componente activo [69].

Al igual que la quercetina, la capsaicina, una oleorresina presente en los pimientos, reduce la expresión de citoquinas como la IL – 6, TNF alfa y la proteína quimioatrayente de monocitos 1 (MCP1), disminuyendo notablemente la inflamación en modelos murinos alimentados con una dieta alta en grasa [70].

Como se describe en lo anterior, existen un sin número de metabolitos secundarios con diferentes estructuras químicas y mecanismos de acción antiinflamatoria, en productos naturales que pueden ser incluidos en la dieta.

Colombia un país megadiverso según el Sistema de Información Ambiental (SIAC), permite un variado menú de alimentos nutritivos o suplementos naturales, que puede explotar en toda su riqueza biótica para el desarrollo de planes alimenticios autóctonos como lo hacen investigadores nacionales que recientemente, aprovechan estas posibilidades y proponen planes de alimentación que disminuyen las afecciones de las enfermedades metabólicas, usando solo productos agrícolas que se cultivan en el país [71]. También cabe destacar, que la relación entre la gran diversidad de plantas existentes en Colombia y el número de moléculas promisorias novedosas que se puedan obtener, es directamente proporcional; esto conlleva a que se facilitan los esfuerzos científicos para la búsqueda de moléculas o extractos de plantas que puedan dar solución a patologías con opciones farmacológicas limitadas, como es el caso de la obesidad mórbida [71, 72].

Recientemente el grupo de investigación en genética molecular de la Universidad de Antioquia ha purificado un extracto de hojas de eucalipto (*Eucalyptus tereticornis*) que parece tener un efecto hipoglucemiante fuerte en modelos animales de ratones obesos y con resistencia a la insulina [20]. Una vez fraccionado el extracto, se pudo dilucidar que los

componentes bioactivos, son moléculas derivadas del isopreno conocidas como triterpenos, que en la literatura están descritos como metabolitos de importancia para el tratamiento de diferentes afecciones [20, 73].

Gracias a las acciones colaborativas entre el grupo de investigación en Genética Molecular (GENMOL) de la Universidad de Antioquia y el Doctor Luis Alejandro Gómez Departamento de Ciencias Biológicas de la Universidad EAFIT, esos componentes activos extraídos de *Eucalyptus tereticornis*, fueron usada en esta investigación.

5.4 Importancia clínica de triterpenos pentacíclicos (TP) aislados de fuentes naturales.

En plantas, la ciclación del escualeno es el mecanismo químico por el cual se sintetizan los triterpenos [74], que, según la ubicación espacial de su esqueleto carbonado, se divide en moléculas acíclicas, mono, bi, tri, tetra y pentacíclicas, donde los más estudiados son los triterpenos pentacíclicos (TP) [75]. En total, se han caracterizado más de 20.000 diferentes triterpenos, de los cuales un gran número parecen presentar importancia clínica [76].

Los TPs naturales, han sido intensamente investigados desde finales de la década de los 80 y se ha evidenciado sus bioactividades y efectos positivos como: actividad hematoprotectora, efectos antitumorales, antiinflamatorios, antiparasitarios, antimicrobianos y anti-VIH, entre otras [77–80]. Cabe destacar que recientemente los científicos están generando mas evidencia convincente del mantenimiento homeostático en glucosa y lípidos presentados por TPs de los grupos ursano y oleano [81, 82]. Por ejemplo, según la investigación realizada por el grupo GENMOL de la universidad de Antioquia, la fracción bioactiva del extracto rico en TPs de *Eucalyptus tereticornis*, presenta tres diferentes triterpenos 1. Ácido Ursólico, 2. Ácido Oleanólico y 3. Lactona de ácido ursólico, todos pertenecientes a los grupos mencionados [20].

5.4.1 Importancia clínica del Ácido Ursólico (AU):

En estudios recientes relacionados con la acción del ácido ursólico, se ha evidenciado una alta capacidad contra inflamatoria, en modelos in vivo e in vitro. Al parecer, los macrófagos y linfocitos de fenotipo proinflamatorio en presencia de este TP disminuyen la secreción de citoquinas como la IL – 6 y suprime el factor nuclear kappa beta, lo que implica una posible utilidad terapéutica [83]. También, en modelos murinos alimentados con una dieta alta en grasa, el AU disminuye la adiposidad visceral, el nivel de glucosa y lípidos en sangre, además, aumentó los niveles de leptina (hormona reguladora del apetito) plasmática, lo que implica que la suplementación con AU manifiesta una acción clara contra la obesidad [84]. En modelos in vitro de cultivos primarios del tejido adiposo, AU actúa como un agente lipolítico al activar la señalización de AMPc dependiente de la proteína quinasa A (PKA) [85], inclusive, AU puede actuar como un agente mimético al ejercicio físico, ya que disminuye la adiposidad en ratas obesa y sedentarias del mismo modo que ocurría en ratas mas activas físicamente [86]. Se evidencian las capacidades antiinflamatorias y antiobesidad del AU desde diferentes vías de señalización celular y sistémica, lo que le otorga un importante papel como un posible profármaco o suplemento alimenticio para el control de enfermedades metabólicas.

5.4.2 Importancia clínica del Ácido Oleanólico (AO)

Hay evidencia de que el aceite de oliva rico en ácido oleanólico, tiene efectos cardioprotectores, ya que previene, la aterosclerosis y la hipertensión, producto de la obesidad u otra condición metabólica como la DM2 [87]. También el extracto de AO al igual que el ácido ursólico, mejoran la homeostasis glucolítica en humanos que padecen síndromes metabólicos [88]. En modelos murinos, el ácido oleanólico tiene efectos hipoglucemiantes y lipolíticos, ya que tratamientos con OA disminuyen los niveles de grelina (hormona del hambre) plasmática, lo que conduce a una baja en la adiposidad visceral [89]. También cabe destacar que en líneas celulares de adipocitos 3T3-L1, tratadas con OA, se inhibió la acción de la IL – 6 y el factor nuclear kappa beta (NF-KB), lo que disminuyó los niveles de visfatina, citoquina sintetizada en el tejido adiposo que se encuentra regulada positivamente en la obesidad [90].

En general el OA parece tener mecanismos muy similares al AU, pero involucrando vías de señalización alternas, lo anterior implica que alimentos o extractos ricos en ambos ácidos pueden proporcionar un efecto sinérgico en terapias medicas o nutricionales.

5.4.3 Importancia clínica de la lactona del ácido ursólico (3B-Hydroxy-urs-11-en-28,13B-olido): (UAL)

Aunque este TP ha sido muy poco investigado, los escasos reportes conocidos están directamente ligados a extractos de *Eucalyptus Camaldulensis* que tienen capacidad anticancerígena puesta a prueba a en células malignas de ovario humano, y también en otros extractos de *Eriobotrya japonica*, la lactona del ácido ursólico, tiene efectos inhibitorios sobre el virus Epstein – Barr, un tipo de herpesvirus que causa infecciones en el tracto respiratorio superior y que presenta prevalencia en todo el mundo [91, 92].

Como se ilustró en esta sección, todos los TPs descritos son moléculas promisorias, que presentan en alguna medida capacidades, antitumorales, antiinflamatorias he incluso funciones cardioprotectoras. En las hojas de *Eucalyptus tereticornis* estos tipos diferentes de TPs conviven, lo que trae consigo una ventaja importante, es decir, los extractos de *Eucalyptus tereticornis* tienen concentraciones altas de ácido ursólico, ácido oleanólico y lactona de ácido ursólico que juntos, pueden generar diferentes sinergias positivas que puedan servir como terapia contra enfermedades metabólicas o síndromes inflamatorios crónicos como la obesidad [93].

5.5 Rol de la respuesta bioenergética mitocondrial en la obesidad y sus enfermedades metabólicas asociadas.

De las mitocondrias dependen muchas vías de señalización relacionadas con la regulación metabólica, ya que los procesos homeostáticos desde una perspectiva energética dentro de esta organela consisten en procesar los nutrientes para generar calor y ATP. Los desequilibrios entre la ingesta y el gasto calórico también se ven reflejados en una disfunción mitocondrial caracterizada por una baja en la reserva energética respiratoria [94].

Se ha demostrado que la resistencia a la insulina en el musculo esquelético (lo que implica la aparición de la DM2), esta asociada a una disfunción mitocondrial en humanos con obesidad [95]. Como se ha discutido anteriormente, la adiposidad provoca estrés oxidativo [96], estrés que en su mayoría es de origen mitocondrial, puesto que, la producción de ROS ocurre principalmente en dos de los cinco complejos respiratorios de la membrana interna, el complejo I y el complejo III [97]. Estas proteínas transmembranales facilitan la fosforilación

oxidativa, procesos mediante el cual se genera la mayor cantidad de ATP celular, a partir de un potencial electroquímico de protones creado por el paso de electrones entre los complejos, al final, este potencial provoca una fuerza protón motriz que da como resultado la síntesis de ATP. La producción de ROS se da cuando hay electrones en exceso pasando por la cadena respiratoria, este exceso de electrones es transferido al oxígeno, produciendo un superóxido, que posteriormente se convierte en peróxido por la acción de enzima súper oxido dismutasa (SOD); en síntesis, altas producciones de especies reactivas dependen entonces de una gran fuerza protón motriz, creado por ejemplo por una dieta hipercalórica, y una baja demanda de ATP que es el resultado de poco esfuerzo físico [97–99].

La función mitocondrial también puede ser un biomarcador importante en otros procesos que ocurren en el tejido graso que están relacionados con un cambio en la función metabólica y sistémica de los adipocitos [35]. En términos generales, los adipocitos tienen una capacidad excepcional, que implica el cambio en su fenotipo dependiente de señales externas como por ejemplo el ejercicio, teniendo en cuenta lo anterior, existen dos principales tipos de adipocitos [100].

Adipocitos blancos: Son los encargados de formar el tejido adiposo de almacenamiento, es decir, estos adipocitos, tiene la cualidad de almacenar grandes cantidades de grasa en forma de triglicéridos, como producto del exceso de energía consumido que no se ha gastado y que se podría utilizar posteriormente en momentos de ayudo o hambruna [101]. Este tejido adiposo blanco, presenta actividad endocrina, secreta hormonas pro y antiinflamatorias, para regular el metabolismo sistémico, lo anterior quiere decir, que todas las enfermedades metabólicas he inflamatorias ya mencionadas asociadas a la obesidad, son el producto de la acumulación excesiva de adipocitos blancos [102].

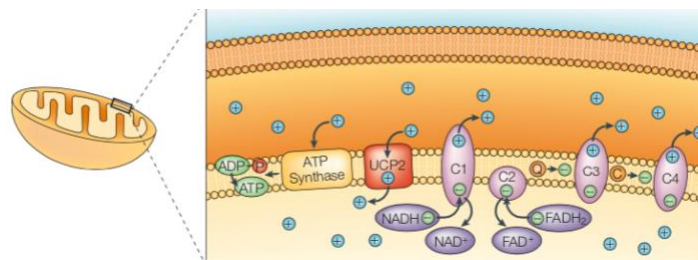
Adipocitos marrones: Presentes en todos los mamíferos, el fenotipo marrón en células adiposas se encarga del gasto energético almacenado previamente como tejido blanco, donde sus características principales son: 1. Tiene una función termogénica, que implica el gasto de energía para la formación de calor en caso de hipotermia, 2. Las células del tejido marrón presentan múltiples mitocondrias y 3. Hay una sobreexpresión de la proteína 1 desacoplante (UCP1) de mitocondrias. [103, 104].

Incluyendo la regulación positiva de la proteína desacoplante 1 (UCP1), en términos moleculares, la transición del fenotipo blanco al marrón en adipocitos depende en gran medida del aumento en la expresión de otros factores de transcripción como TFAM, que induce biogénesis mitocondrial en células del tejido graso blanco, PPAR gamma (Receptor activado por la proliferación de peroxisomas) y PGC 1 alfa (proliferador de peroxisomas). La inducción de altas expresiones de estas moléculas implicaría un proceso de cambio fenotípico, una clave fundamental como diana farmacológica, que podría estimular la pérdida rápida de peso en personas obesas con comorbilidades metabólicas asociadas [100, 104].

5.6 Respiración mitocondrial como posible biomarcador para la prospección de nuevos fármacos y patologías metabólicas producto de la obesidad.

Retomando la sección anterior, la transición fenotípica en el tejido graso, depende de diferentes procesos moleculares, entre ellos el alza en la expresión de proteínas como la UCP1; tal como su nombre lo indica, esta proteína desacopla el proceso de fosforilación oxidativa, es decir, no permite que se genere un gradiente protón motriz que es aprovechado para la formación de ATP, sino, que genera un canal en la membrana mitocondrial interna,

que impide la acumulación de protones en el espacio intermembranal, disipando esta fuerza protón motriz en calor [105].



Fosforilación oxidativa en adipocitos marrón [106]

Identificar experimentalmente, un estado desacoplado de la cadena transportadora de electrones en células intactas y mitocondrias aisladas es posible. Usando equipos de respirometría de alta resolución en tiempo real que censan los niveles de oxígeno disueltos en el buffer de suspensión celular o mitocondrial, se podría tener una noción de cómo funciona la fosforilación oxidativa bajo una condición específica así: La cadena transportadora de electrones presenta cinco complejos respiratorios, los primeros cuatro, bombean protones al espacio y el quinto complejo (ATP sintasa), se encarga de aprovechar este gradiente [107]. La inhibición molecular de estos complejos permitiría entender, por ejemplo, en que estado respiratorio se encuentra un grupo de células expuestas a un tratamiento, es decir, si las células intactas como los adipocitos están desacopladas por la acción de un tratamiento que genera la transición fenotípica de del tejido blanco al marrón, estas no responderían al inhibidor que genera desacoplamiento y los niveles de oxígeno censados experimentalmente no cambiarían.

Se han desarrollado varios inhibidores que, desde diferentes mecanismos afectan la cadena transportadora de electrones, aquí se revisarán algunos de manera breve

- La Oligomicina, bloquea el complejo V afectando la producción de ATP y disminuyendo la respiración, al represar una parte de los electrones de la cadena transportadora impidiendo que reaccionen con el oxígeno molecular (O_2) [108].
- EL FCCP (Carbonilcianuro-p-trifluorometoxifenilhidrazona), es un desacoplador de la fosforilación oxidativa, que causa despolarización de la membrana mitocondrial, imposibilitando la formación del gradiente de protones [109].
- El Cianuro, inhibe el complejo IV, deteniendo por completo la fosforilación oxidativa y la producción de ATP; con este inhibir, se represar la totalidad de electrones lo que implicaría el cese en el consumo de oxígeno mitocondrial [110].
- La Antimicina inhibe el complejo III interrumpiendo al igual que el cianuro, la fosforilación oxidativa, eliminando el consumo de oxígeno mitocondrial [111].

El análisis de la bioenergética mitocondrial ha sido usado recientemente en diferentes investigaciones para evaluar el perfil respiratorio de adipocitos blancos y marrones [112], no obstante, aunque en los últimos años hay evidencia de metabolitos secundarios del cacao y té verde que parecen estimular este proceso termogénico adiposo [113, 114], no se tienen registro del uso de análisis de la respuesta bioenergética para identificar la acción de estos compuestos de origen natural que pueden convertirse en alternativas terapéuticas para la obesidad inflamatoria.

6. MÉTODOS Y MATERIALES

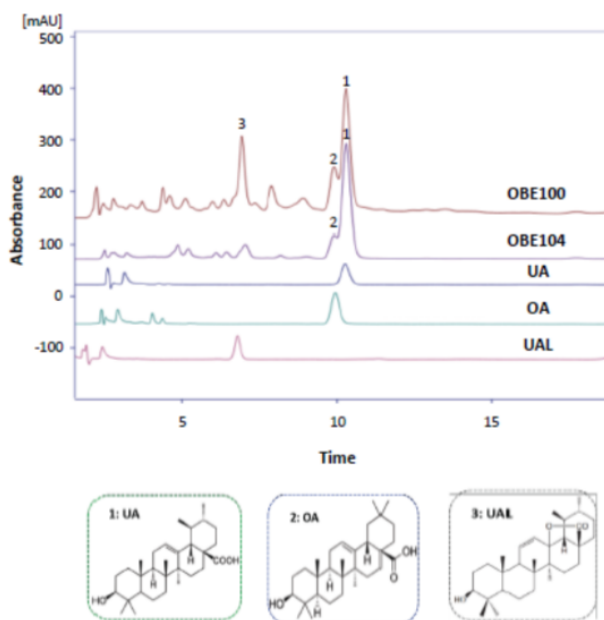
Las células J774, 3T3-L1 y C2C12, fueron obtenidas de la colección de líneas celulares del grupo de investigación en genética molecular (GENMOL) en la sede de investigación universitaria (SIU) de la Universidad de Antioquía. Los insumos para cultivo celular como el medio DMEM (Dulbecco modified eagle's médium), suero fetal bovino inactivado (SFB), glucosa, tripsina, PBS y antibióticos grado cultivo celular de Sigma – Aldrich, también fueron obtenidas del grupo GENMOL.

Los inhibidores y desacopladores de la respiración mitocondrial (Oligomicina, FCCP, antimicina A y cianuro), fueron adquiridos a Sigma – Aldrich por la Universidad EAFIT.

El desarrollo del proceso experimental se llevó a cabo en los laboratorios de biología molecular y biología animal de la universidad EAFIT, en este lugar se hizo uso de la incubadora de CO₂ con camión de agua de Thermo Fisher para el mantenimiento de las líneas celulares y del sistema de respirometría de alta resolución Oxygraph – 2k.

6.1 Obtención del extracto de *Eucalyptus tereticornis* (Et)

Las hojas de *Eucalyptus tereticornis* fueron recolectadas a una altura de 2143 msnm en árboles no florados, de la zona rural del municipio de la ceja (oriente antioqueño). Estas estructuras foliares fueron procesadas para la obtención y caracterización del extracto rico en triterpenos pentacíclicos: ácido ursólico, ácido oleanólico, y lactona del ácido ursólico, por el Grupo de Química Orgánica de Productos Naturales de la Universidad de Antioquia, cabe destacar que el cromatograma asociado a la identificación de los TPs se muestra en la siguiente figura [115].



Cromatograma para la identificación del extracto de *E. Tereticornis*, OBE100 o extracto puro: AU, AO, UAL + fracción no identificada.

El extracto de Et en estado solido, es disuelto en dimetil sulfoxido (DMSO) grado biología molecular y almacenado a 5°C previo a su uso.

6.2 Cultivo celular y diseño de experimentos para tratamientos y controles

Se realizó el cultivo de tres diferentes líneas celulares adquiridas de la ATCC:

- Fibroblastos de ratón 3T3-L1, diferenciados en adipocitos blancos usando el siguiente protocolo: las células 3T3-L1 crecieron en frascos de cultivo de 75 cm³ a 37°C y 5% de CO₂ en aire atmosférico, con medio de proliferación (MP), DMEM 25 mM de glucosa + 10% de SFB + 100 u/mL penicilina + 100 g/mL estreptomina + 0.25 g/mL de fungizona. Una vez los fibroblastos 3T3-L1 alcanzan una confluencia del 100%, se retira el MP y se realiza un lavado con PBS, posteriormente se adiciona medio proliferante de diferenciación (MPD), DMEM 25 mM de glucosa + 10% de SFB + 100 u/mL penicilina + 100 g/mL estreptomina + 0.25 g/mL de fungizona + 1 g/mL insulina + 0.25 M dexametasona + 2M de rosiglitazona + 0.5 mM de 3-isobutil-1-metilxantina, durante 48 horas. Pasado el tiempo estipulado, se retira el MPD y se realiza un lavado con PBS, luego se adiciona MP + 1 g/mL insulina y se incuba durante 2 días. Una vez concluidos estos procesos, se retira el MP + insulina y se adiciona MP con cambios y lavados sucesivos durante 2 días más, tiempo suficiente para que se acumule grasa en los adipocitos diferenciados. Una vez pasados los 5 días de acumulación de triglicéridos, se realiza el tratamiento con el extracto de Et a una concentración de 50 ug/mL por 72 horas.

Los experimentos se realizaron 4 veces en situaciones independientes, usando como control los fibroblastos 3T3-L1 diferenciados a adipocitos sin el tratamiento con el extracto de Et.

- Mioblastos de ratón C2C12, diferenciados en miotubos usando el siguiente protocolo: los mioblastos, crecieron en frascos de cultivo de 75 cm³ a 37°C y 5% de CO₂, con medio de proliferación (MP), DMEM 25 mM de glucosa + 10% de SFB + 100 u/mL penicilina + 100 g/mL estreptomina + 0.25 g/mL de fungizona. Una vez la confluencia en los frascos alcanzara el 100%, se retira MP y se realiza un lavado con PBS, luego se adiciona medio proliferante de diferenciación (MPD), DMEM 25 mM de glucosa + 2% de SFB + 100 u/mL penicilina + 100 g/mL estreptomina + 0.25 g/mL de fungizona, durante 5 días teniendo en cuenta cambios cada dos días del MPD y lavados con PBS. El tratamiento con el extracto de Et a una concentración de 50 ug/mL es adicionado por 24 horas a los miotubos diferenciados cuando concluyen los 5 días de tratamiento con MPD. Los experimentos se realizaron por triplicado, usando como control los mioblastos C2C12 diferenciados a miotubos sin el tratamiento con el extracto de Et.
- Macrófagos de ratón J774, diferenciados a su fenotipo inflamatorio usando el siguiente protocolo: Las células J774, se sembraron en frascos de cultivo de 75 cm³ a 37°C y 5% de CO₂ en aire atmosférico, con medio de proliferación (MP), DMEM 25 mM de glucosa + 10% de SFB + 100 u/mL penicilina + 100 g/mL estreptomina + 0.25 g/mL de fungizona. Alcanzada una confluencia del 80%, se retira MP, posteriormente, se adiciona medio de inflamación (MI), DMEM 25 mM de glucosa + 10% de SFB + 100 u/mL penicilina + 100 g/mL estreptomina + 0.25 g/mL de fungizona + LPS 100ng/mL + INF 20 ng/mL, durante 18 horas. Cumplido el tiempo de estimulación inflamatoria, se retira el MI de los macrófagos inflamatorios y se adiciona nuevamente MI + el extracto de Et a una concentración de 100 ug/mL durante 6 horas.

Se realizó un experimento para esta línea celular, usando como control los macrófagos J774 diferenciados a su fenotipo inflamatorio sin el tratamiento con el extracto de Et.

6.3 Preparación, obtención y conteo de células viables para los ensayos de bioenergética mitocondrial

Una vez los tiempos de tratamiento concluyen en los diferentes tipos de líneas celulares el proceso para obtener células viables es:

- Para las los miotubos C2C12 y los adipocitos 3T3-L1, el medio es retirado de los frascos de 75 cm³, se realizan dos lavados con 2 mL de PBS estéril y se agregan 2 mL de tripsina 2X por 2 minutos. Pasado el tiempo se inactiva la tripsina con 2 mL de medio de proliferación, se recogen las células en tubos falcom de 15 mL. A una alícuota de 50 uL se agrega 10 uL de azul de tripano a una concentración de 3 mg/mL + 40 uL de medio de proliferación. Se depositan 10 uL de la suspensión teñida a una cámara de Neubauer y se realiza el conteo de las células, teniendo como criterio de inclusión para los ensayos una viabilidad celular igual o superior al 95%. Una vez se conoce el número de células viables, se centrifugan las suspensiones celulares a 200g por 10 minutos a una temperatura de 25°C, se descarta el medio sobrenadante y se adiciona medio de respiración (MR), DMEM 25 mM de glucosa + 100 u/mL penicilina + 100 g/mL estreptomomicina + 0.25 g/mL de fungizona.
- Para macrófagos J774, sin retirar el medio se procede a colectar las células adheridas al frasco de 75 cm³, haciendo uso de un scraper de 25 cm. Una vez la población celular se encuentre en suspensión, se transfiere a un tubo falcom de 15 mL. A una alícuota de 50 uL, se agrega 10 uL de azul de tripano 3 mg/mL + 40 uL de medio de proliferación. Se cargan 10 uL de la suspensión teñida en una cámara de Neubauer y se realiza el conteo de macrófagos teniendo como criterio de inclusión para los ensayos una viabilidad igual o superior a 95%. Una vez se tiene el total de células viables, se centrifuga la suspensión celular a 200g por 10 minutos a una temperatura de 25°C, se descarta el medio sobrenadante y se adiciona medio de respiración (MR).

6.4 Determinación de condiciones óptimas para los ensayos de respirometría de alta resolución.

Con la intención de establecer un número efectivo de células, fibroblastos (3T3-L1) y mioblastos (C2C12) de ratón fueron cultivados en cajas de 75 cm³ usando medio de proliferación hasta alcanzar una confluencia total o superior al 80%. Posteriormente se realizó el siguiente procedimiento para cada línea celular:

- Células C2C12 y 3T3-L1 de diferentes pases que alcanzaron la confluencia requerida fueron colectados y contados. Posteriormente se realizó la centrifugación y la suspensión de las células en medio de respiración (MR) y se realizaron mediciones de respirometría de alta resolución en el sistema Oxygraph 2k by Oroboros Instrument usando concentraciones entre 1×10^6 y 10×10^6 de células en la celda del instrumento, con el fin de establecer un número fijo de células viables efectivas para cada medida respiratoria.

6.5 Análisis de respirometría de alta resolución en células intactas.

Las células no diferenciadas, las células diferenciadas - tratadas con el extracto de Et y los controles diferenciados, fueron sometidos a una caracterización de la actividad en la cadena transportadora de electrones usando el sistema Oxygraph 2k by Oroboros Instruments, por medio de la medición del consumo de oxígeno de células intactas en suspensión. Una vez alcanzado la concentración efectiva de células en los tres tipos tratados, se resuspendieron

suavemente con una pipeta eppendorf de 1000 uL y se adicionaron 2 mL de la suspensión en MR a la celda del equipo Oxygraph 2k, previamente calibrada con medio de respiración a 37°C a una presión de 85 kPa.

Se estableció la respiración rutinaria para tratamientos y controles, con fines comparativos entre los grupos y para su respectiva respuesta frente a la adición de inhibidores durante la caracterización en tiempo real.

6.6 Evaluación de modulación de la respuesta bioenergética mitocondrial en células intactas.

Para evaluar las características respiratorias en células intactas con tratamiento y los controles diferenciados, se planteó una discriminación bioenergética en la que se evalúa la respuesta de la cadena transportadora de electrones y el acoplamiento energético durante la rutina en tiempo real de Oxygraph 2k, así: Oligomicina 8uM, para verificar un estado acoplado o desacoplado de las células, posteriormente se adicionó FCCP 4uM, para establecer la máxima capacidad respiratoria y la reserva bioenergética y después se agregó Antimicina A y KCN para verificar el destino de los electrones dentro de la cadena transportadora y para tener una noción del consumo de oxígeno no mitocondrial.

6.7 Análisis estadístico

La velocidad de consumo de oxígeno de las diferentes líneas celulares diferenciadas – tratadas y diferenciadas sin tratar, se determinó usando el programa DatLab 5 by Oroboros Instrument.

El análisis estadístico de los datos se llevó a cabo usando el software GraphPad Prism 8.4.2, mediante análisis ANOVA de dos factores, además, se incluyó análisis de T student no emparejada y las pruebas de Tukey y Sidak para comparaciones múltiples. La significancia estadística se definió a partir de un valor $P=0,05$.

7. RESULTADOS

7.1 Evaluación de las condiciones óptimas para la respiración celular en fibroblastos 3T3-L1 y mioblastos C2C12.

En la sección A de la figura 1 se observa un incremento en la velocidad media de consumo de oxígeno dependiente del número de fibroblastos depositados en la celda de medición. Cabe destacar que estas velocidades medias de consumo corresponden a la respiración habitual, que para un número total de 1×10^6 células de pase 13 en la celda la velocidad media de consumo fue de 19.24 pmol/mL/s, un valor particularmente bajo. No obstante, la tendencia en aumento de la respiración celular dependiente del número de células no parece ser lineal, lo que implicaría una relación directa del número de subcultivos (pases) previamente realizados con la respuesta respiratoria, esta situación se observa claramente en los experimentos con células de pase 8 y pase 9, donde un total de 3.5×10^6 y 5.5×10^6 fibroblastos en el puerto respectivamente indican valores de consumo relativamente semejantes (107,93 pmol/mL/s \approx 125.64 pmol/mL/s).

Teniendo en cuenta lo anterior, una comparación entre las velocidades medias de consumo de oxígeno normalizadas a 1×10^6 de células de la figura 1B, muestra que un número mayor de pases realizados disminuye la capacidad respiratoria en fibroblastos 3T3-L1. También nuestros resultados sugieren que, por millón de células, fibroblastos de pase 8 presentan una máxima velocidad media de consumo de oxígeno (30,84 pmol/mL/s por millón de células).

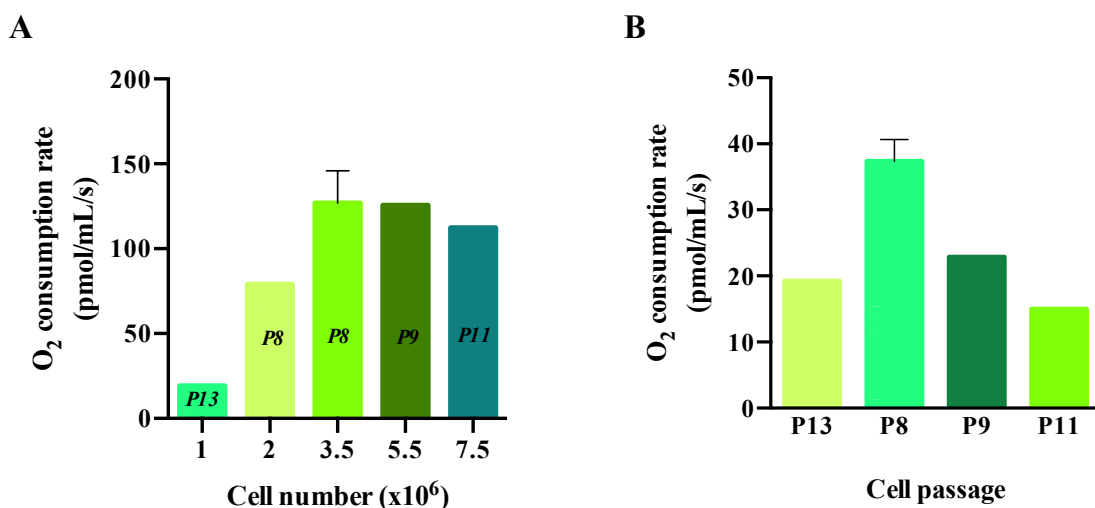


Figura 1. Respiración celular en fibroblastos 3T3-L1 intactos. (A) O₂ flux (la velocidad media de consumo de oxígeno), se determinó usando diferentes concentraciones celulares en la celda de medición y además variando el pase del cultivo, como se indica en la barra. (B) O₂ flux normalizado por millón de célula para identificar la acción del subcultivo sobre la respiración celular, con un n=3 para el pase 8 y n=1 para los demás pases.

Estos resultados sugieren que el número efectivo de células en la celda de medición no debe ser menores a 2×10^6 ; nosotros seleccionamos 3.5×10^6 células/celda como número efectivo fijo para realizar los tests de consumo de oxígeno.

Con respecto al pase cabe destacar que, medir la respiración en células a las cuales se ha realizado muchos subcultivos es riesgoso porque se puede comprometer su actividad bioenergética.

Para las células C2C12 no diferenciadas, la velocidad media del consumo de oxígeno se incrementó dependiente del número de mioblastos en la celda de medición. Tal como se

observa en la figura 2A, existe una tendencia lineal ascendente ente las velocidades medias respiratorias, ya que, usando 1×10^6 de células en el puerto la velocidad media de consumo de oxígeno fue de 19,38 pmol/mL/s en contraste con 112,4 pmol/mL/s valor 5 veces mayor que corresponde a una concentración celular en la celda de medición de 10×10^6 .

Aunque los valores parecen tener una tendencia lineal, los resultados presentados en la figura 2B pueden sugerir también un efecto del pase sobre la respiración celular, como se observa, la velocidad media de consumo de oxígeno normalizada a un millón de células parece ser mayor en mioblastos que presentan más subcultivos realizados, una tendencia particularmente diferente a la presentada en los fibroblastos 3T3-L1.

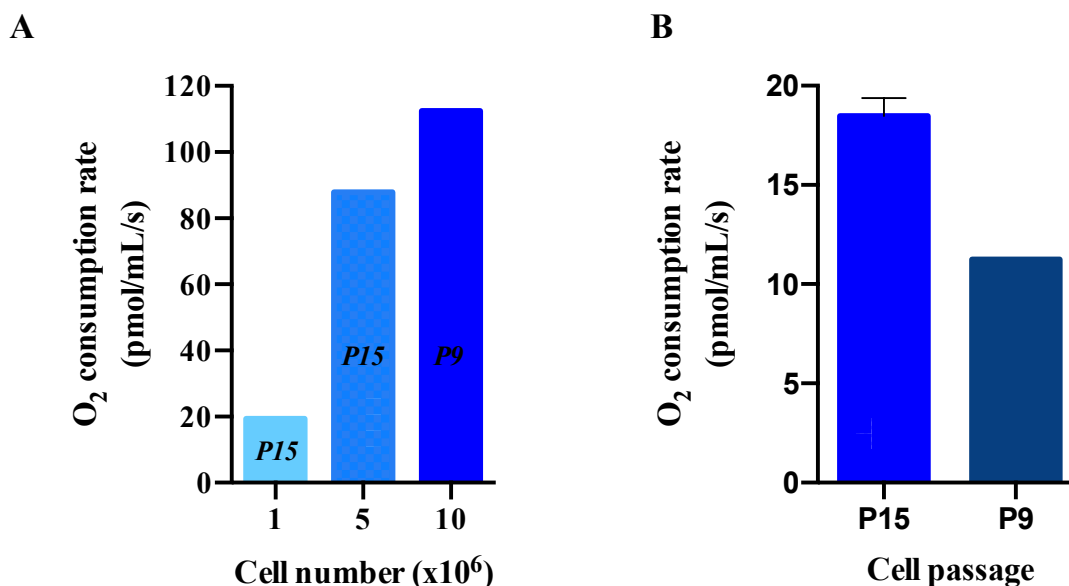


Figura 2. Respiración celular en mioblastos C2C12. (A) Velocidad media de consumo de oxígeno en función de distintas concentraciones celulares y diferentes pases, como se indica en las barras. (B) normalización del consumo de oxígeno por millón de células, para identificar un posible efecto de los subcultivos en la respiración mitocondrial, para pase 15 el n=2.

Nuestros resultados indican que concentraciones cercanas a los 5×10^6 células/celda, podrían ser los valores más apropiados para los experimentos de respirometría de alta resolución en mioblastos C2C12, adicionalmente el pase podría jugar un papel importante, teniendo en cuenta que un numero bajo de subcultivos podría corresponder a una menor respuesta respiratoria. Se seleccionó una concentración de $3,5 \times 10^6$ células/celda y mioblastos con valores de subcultivos moderadamente altos para los ensayos en el sistema Oxygraph 2k.

7.2 Caracterización bioenergética en macrófagos J774 no inflamatorios (un resultado preliminar).

Debido a las dificultades asociadas al cultivo de la línea celular J774 y la contingencia a causa de pandemia por el coronavirus SARS-CoV-2, hasta la fecha solo se tienen los resultados de un experimento asociado al consumo de oxígeno en estos macrófagos no inflamatorios.

En la figura 3A, se observa la curva de consumo de oxígeno para un total de $7,5 \times 10^6$ células J774 viables usadas en la celda del equipo Oxygraph 2k a 37°C ; La velocidad media de consumo de oxígeno rutinario es de $119,09 \text{ pmol/mL/s}$, velocidad que disminuyen solo un $13,6\%$ al adicionarse $4\mu\text{M}$ de Oligomicina A. La inyección de FCCP $4\mu\text{M}$, estimula la más de dos veces la respiración rutinaria a la que corresponde una velocidad media de consumo de oxígeno de $252,71 \text{ pmol/mL/s}$. Finalmente, al agregar $0,5 \text{ mM}$ de KCN inhibidor del complejo IV, la respiración celular baja un 46% , lo que supondría que casi la mitad del consumo de oxígeno en macrófagos no inflamatorios sería de origen no mitocondrial (figura 3B).

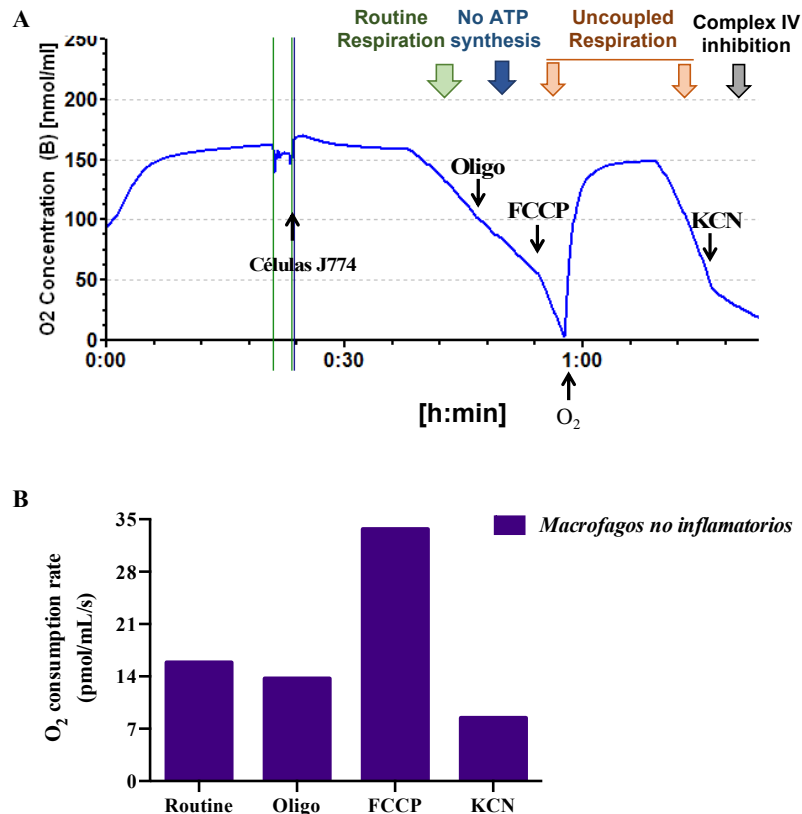


Figura 3. Curva de consumo de oxígeno para células J774 de fenotipo no inflamatorio. (A) Para un total $7,5 \times 10^6$ células/celda, se realizó un experimento en el sistema Oxygraph 2k a 37°C y 85kPa para la línea celular J774 de pase 12, se presenta la velocidad media de consumo de oxígeno habitual (rutinario), y en presencia de los moduladores mitocondriales, Oligomicina A $4\mu\text{M}$, FCCP $4\mu\text{M}$ y KCN $0,5 \text{ mM}$. (B) Gráfico de estados respiratorios inhibidos y rutinario normalizados a un millón de células para macrófagos no inflamatorios J774 de pase 12. Las barras son representativas para un solo experimento.

7.3 Consumo de oxígeno rutinario y asociado a la discriminación bioenergética mitocondrial en fibroblastos 3T3-L1 y mioblastos C2C12.

La adición secuencial de los inhibidores Oligomicina A, FCCP y KCN sobre $3,5 \times 10^6$ de fibroblastos 3T3-L1 viables en el sistema Oxygraph 2k como se observa en la figura 4, permite conocer el destino del flujo de electrones, la reserva energética y el acoplamiento celular en pre – adipocitos intactos.

La inyección de $4\mu\text{M}$ de Oligomicina, resultó en la inhibición de la respiración rutinaria en un $58,6\%$, posteriormente la adición de FCCP $4\mu\text{M}$ estimulo la respiración rutinaria en un

149,2% doblando el valor de consumo de oxígeno habitual en células 3T3-L1 no diferenciadas. Finalmente, el KCN 1mM inhibió la respiración mitocondrial basal en un 75,4%.

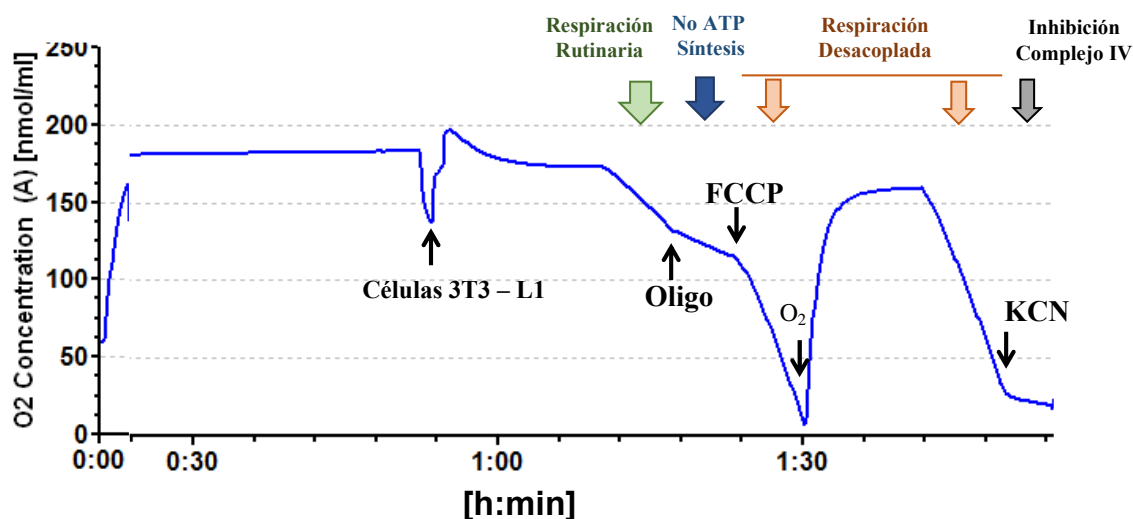


Figura 4. Consumo de oxígeno para pre – adipocitos 3T3-L1. $3,5 \times 10^6$ de células viables efectivas se adicionaron a la celda de medición del Oxygraph 2k, para determinar la velocidad del consumo de oxígeno rutinario como se indica. Adicionalmente se muestran las adiciones respectivas de los inhibidores Oligomycin A 4uM, FCCP 4 uM y 1mM de KCN. Experimento realizado a 37°C y 85 kPa.

En la figura 5 se observa, la respiración mitocondrial rutinaria y en presencia de los inhibidores y desacopladores de la cadena transportadora de electrones para un total de $3,5 \times 10^6$ de mioblastos C2C12 viables. La velocidad media de consumo de oxígeno de las células C2C12 en los experimentos realizados en el sistema Oxygraph 2k, con $3,5 \times 10^6$ en condiciones habituales (37°C y 85 kPa) es en promedio 56,21 pmol/mL/s. Al agregar 4uM de Oligomycin, la velocidad de consumo de oxígeno disminuyó en un 77,29%, posteriormente la inyección estimulante de FCCP 4uM aumentó la respiración a un valor de 114,86 pmol/mL/s un número dos veces mayor, comparado con la velocidad media de consumo de oxígeno rutinario. KCN 0.5mM generó una inhibición del 75,7% en la respiración celular.

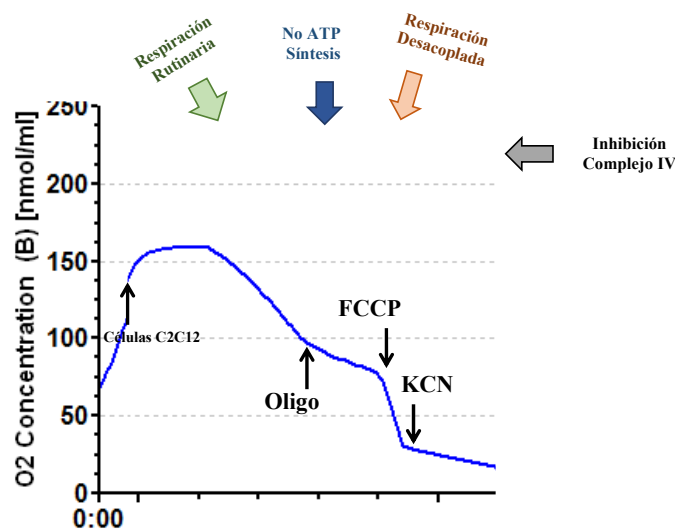


Figura 5. Consumo de oxígeno en mioblastos C2C12. La suspensión celular que se inyectó en la celda de medición del equipo Oxygraph 2k fue de 5×10^6 , se determinó la velocidad media de consumo de oxígeno para la línea celular C2C12 sin diferenciar a miotubos, en su estado habitual, inhibida con Oligomicina 4 μ M, estimulada con FCCP 4 μ M e inhibida al final con KCN 0.5 mM.

7.4 Comparativa entre las respuestas bioenergéticas de fibroblastos 3T3-L1 y adipocitos diferenciados.

En la figura 6 se observa la dinámica del consumo de oxígeno por adipocitos diferenciados 3T3-L1, en presencia de los moduladores mitocondriales. La velocidad media de consumo habitual para adipocitos es en promedio 384,8 pmol/mL/s para un total de $3,5 \times 10^6$ células efectivas en la celda de medición, lo que implica un aumento del 71% en comparación con la respiración rutinaria de pre – adipocitos.

Con respecto a la adición de los inhibidores, los resultados sugieren que al inyectar 4 μ M de Oligomicina A sobre adipocitos diferenciados, el valor de la respiración mitocondrial disminuye en un 36%, por el contrario, al agregar 4 μ M de FCCP, hay un aumento en la respiración rutinaria del 58%. Finalmente, la adición de KCN 1mM inhibió la velocidad media de consumo de oxígeno en 62%, lo que implica un alto consumo de oxígeno mitocondrial. Si bien las moléculas antagonistas, parecen tener la misma dinámica inhibitoria en los fibroblastos 3T3-L1 diferenciados y no diferenciados, hay cambios importantes que deben ser mencionados.

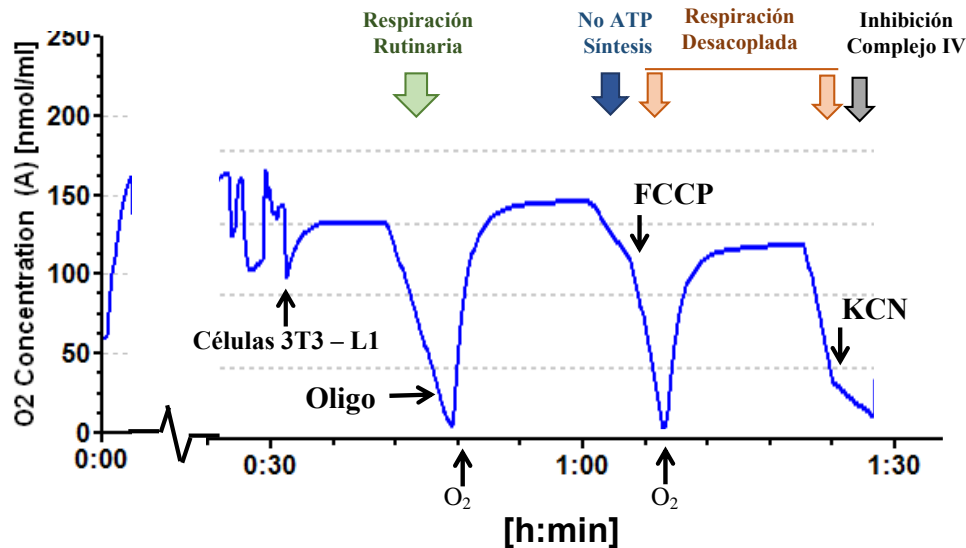


Figura 6. Consumo de oxígeno para células 3T3-L1 diferenciadas a adipocitos. La velocidad media de consumo de oxígeno por adipocitos se muestra, en el estado rutinario y tras la adición de los moduladores mitocondriales: Oligomicina 4 μ M, FCCP 4 μ M y KCN 1mM. La respiración celular, se midió en el sistema Oxygraph 2k con un total de $3,5 \times 10^6$ de celular en la celda del equipo a una temperatura de 37°C.

Como se presenta de forma más detallada en la figura 7, los fibroblastos 3T3-L1 diferenciados, presentan un aumento significativo en la velocidad de consumo de oxígeno rutinario y en presencia de los inhibidores en comparativa con los pre – adipocitos dado un valor $P=0,0371$ de acuerdo con un análisis ANOVA de dos factores. Además, la respiración habitual y la máxima capacidad respiratoria generada por el estimulante FCCP, aumentaron 3 veces en contraste con el control no diferenciado, como se observa en la tabla 1 de valores normalizados a 1 millón de células.

Si bien la acción inhibitoria del agente desacoplante Oligomicina A no parece ser significativa entre los controles diferenciados y no diferenciados, es significativa la disminución ya mencionada de un 62% generada por este antibiótico en los adipocitos control, comparándola con su respiración habitual (tabla 1). Adicionalmente la disminución en la respiración celular causada por KCN en ambos grupos indica, que el consumo de oxígeno se debe principalmente al gasto generado por la cadena transportadora de electrones en la fosforilación oxidativa.

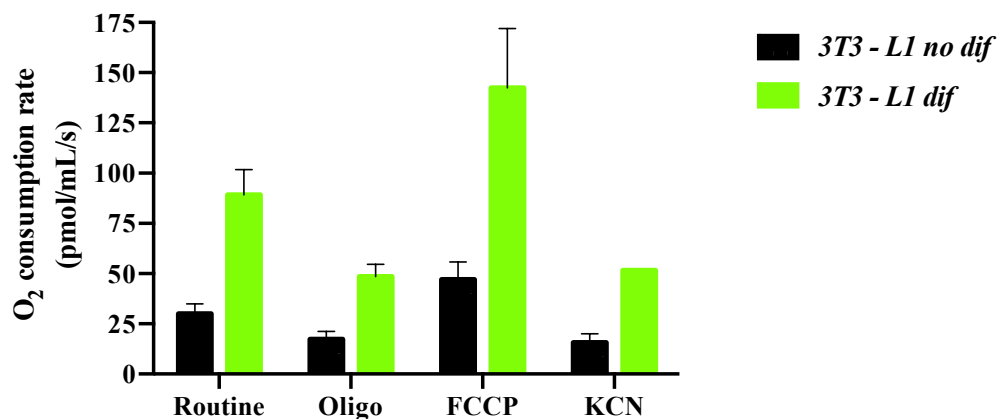


Figura 7. Comparativa entre la respiración celular los controles diferenciados y no diferenciados. Las barras indican el valor medio de la respiración rutinaria y en presencia de inhibidores, más el error estándar asociado. Esta grafica es representativa para 5 experimentos independientes en el caso de las células 3T3-L1 diferenciadas y 3 experimentos para las no diferenciadas, a excepción del inhibidor KCN que solo se reporta un experimento.

Células	Velocidad media de respiración (pmol O ₂ /s/ml per million cells)			Diferencias significativas#
	Rutinaria	Oligo A	FCCP	
3T3-L1 no diferenciadas (n=5)	29.97 _a	17.35 _a	47.08 _a	No
3T3-L1 diferenciadas (n=3)	89.16 _{a,*}	48.50 _a	142.4 _{b,*}	Sí

Tabla 1. Velocidades medias de consumo de oxígeno en células 3T3-L1 normalizadas a 1×10^6 de células. # La significancia se determinó usando un análisis ANOVA de dos vías y posteriormente se llevaron a cabo los tests de Tukey y Sidak para comparaciones múltiples. Distintos subíndices indica una diferencia significativa en el mismo grupo control. Las diferencias significativas entre ambos grupos control se marcan con un asterisco.

7.5 Comparativa entre las respuestas bioenergéticas de mioblastos C2C12 y miotubos diferenciados.

La curva de consumo de oxígeno para un total de $3,5 \times 10^6$ miotubos diferenciados viables, se muestra en la figura 8A. Se puede observar como es la dinámica de respiración celular rutinaria y en presencia de los moduladores mitocondriales para C2C12 diferenciadas. El valor promedio obtenido en 6 experimentos independientes sugiere que, la velocidad de consumo de oxígeno habitual en miotubos, es de 105,62 pmol/mL/s, esta velocidad respiratoria cambió con la adición de 4uM de Oligomicina A, disminuyendo en un 36,7%. La inyección consecutiva de FCCP 4uM estimulo la velocidad media de consumo de oxígeno a un valor de 241,42 pmol/mL/s, lo que implica un aumento de dos veces la respiración rutinaria. Finalmente, 4 experimentos independientes indican que, 1mM de KCN agregado en la celda de medición, inhibió el consumo de oxígeno en un 59,5%. Cabe destacar que, en este grupo, se realizaron dos experimentos independientes con el inhibidor del complejo III, Antimicina A 3uM, que dio como resultado una disminución de un 41,6% en el consumo de oxígeno rutinario (figura 8B).

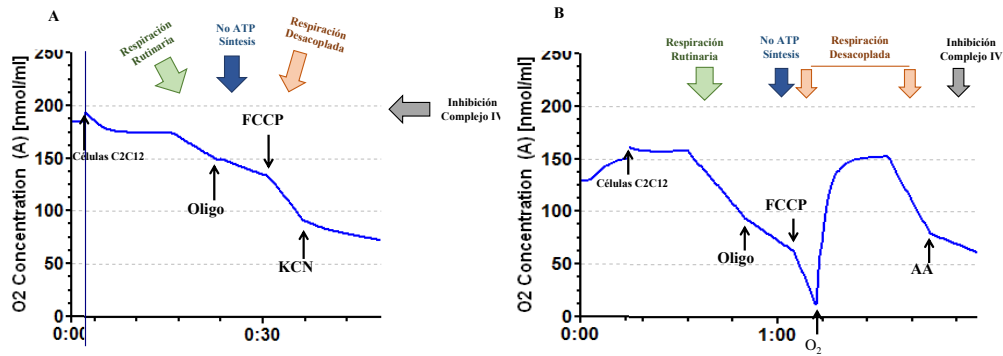


Figura 8. Curva de consumo de oxígeno para miotubos C2C12 diferenciados. (A) Se muestra dinámica típica de respiración celular para $3,5 \times 10^6$ células viables en su estado habitual y en presencia de los inhibidores: Oligomicina (4 μ M), FCCP (4 μ M) y KCN (1mM). En total fueron 4 experimentos independientes realizado en el sistema Oxygraph 2k. (B) Velocidad media de consumo de oxígeno en $3,5 \times 10^6$ de mitubos viables, en su condición rutinaria y presencia de los inhibidores: Oligomicina (4 μ MO), FCCP (4 μ M) y Antimicina A (3 μ M). Se realizaron 2 experimentos independientes a una temperatura de 37°C en el puerto del equipo de medición.

Si bien no se puede realizar ninguna comparación estadística confiable entre los grupos control (mioblastos y miotubos) en células C2C12 incluyendo todos los estados respiratorios inhibidos, por la falta de experimentos independientes y por las diferentes concentraciones de KCN usadas para el grupo de mioblastos no diferenciados, es importante destacar que es probable que las células diferenciadas están capacitadas para consumir más oxígeno en función del tiempo que el otro grupo control como se observa en la figura 9A. No obstante, teniendo en cuenta los valores de la velocidad media de consumo de oxígeno en el estado rutinario y estimulado con FCCP, se realizó un análisis estadístico ANOVA de dos factores en los controles C2C12; como se muestra en la figura 9B. Con un valor $P=0,0067$ existe una significancia estadística en el aumento de consumo de oxígeno en C2C12 diferenciados a miotubos en los estados respiratorios rutinarios y desacoplados con el inhibidor FCCP, comparándose este grupo control con el control no diferenciado.

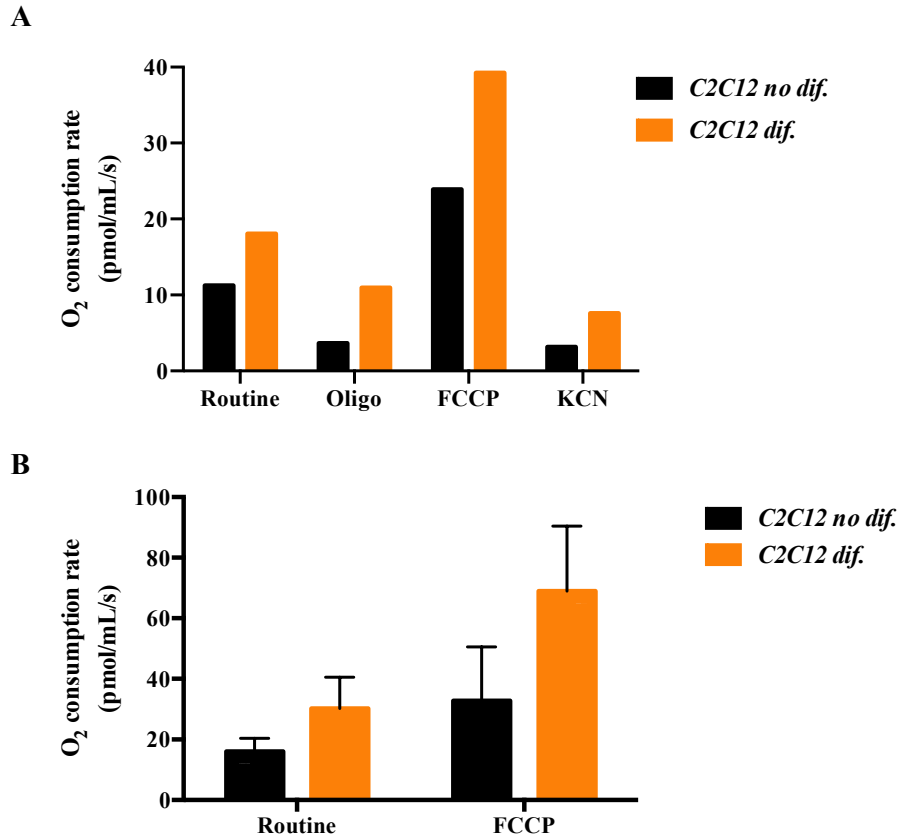


Figura 9. Comparativa entre la velocidad media de consumo de oxígeno de células C2C12 no diferenciadas (mioblastos) y diferenciadas (Miotubos). (A) Las barras indican el valor medio respiratorio normalizado a un millón de células para los estados respiratorios: rutinario, inhibido por oligomicina A y KCN y estimulado con FCCP. (B) Las barras corresponden la respiración celular rutinaria y en presencia de FCCP, el error estandar asociado corresponde a los ensayos con réplicas independientes, para el caso de C2C12 diferenciadas n=6; para C2C12 no diferenciadas n=3. El análisis estadístico se realizó en el software GraphPad Prism.

También como se observa en la tabla 2, se realizaron pruebas de comparaciones múltiples para los estados respiratorios rutinarios y desacoplados. Al parecer, el grupo de células C2C12 diferenciadas a miotubos, presenta una alta capacidad máxima de respiración en contraste con el control no diferenciado después de la estimulación con 4uM de FCCP, además, los análisis indican que existe una reserva bioenergética significativa en el control diferenciado, ya que, como se observa en la tabla 2 la respiración estimulada en este grupo de células es más de dos veces el valor de su consumo de oxígeno rutinario.

Células	Velocidad respiratoria (pmol/mL/s por millón de células)		Diferencias significativas#
	Rutinaria	FCCP	
C2C12 no diferenciadas (n=3)	16,06	32,82	No

C2C12 diferenciadas (n=6)	30,18 _a	68,98 _{b,*}	Sí
---------------------------------	--------------------	----------------------	----

Tabla 2. Velocidad media de respiración habitual y estimulada con FCCP en células C2C12 diferenciadas y no diferenciadas. # La significancia se determinó usando un análisis estadístico ANOVA de dos factores, seguido de los test de Sidak y Tukey para comparaciones múltiples. Para el mismo grupo control, subíndices diferentes indican diferencias significativas entre las medias; para diferentes grupos, las diferencias significativas en el mismo estado respiratorio se marcan con un asterisco. El análisis se llevó a cabo usando el software GraphPad Prism

7.6 Comparativa entre los parámetros bioenergéticos asociados a la respiración mitocondrial de adipocitos 3T3-L1 diferenciados (control) y adipocitos tratados con extracto de Et.

La curva de consumo de oxígeno para adipocitos tratados con 50 ug/mL de extracto de Et por 72 hora se muestra en la figura 10. La velocidad de consumo de oxígeno rutinario es en promedio 311.9 pmol/mL/s para $3,5 \times 10^6$ de adipocitos viables tratados. La inyección de Oligomicina A 4uM disminuyó solo en un 26% la respiración en células intactas, posteriormente, 4uM de FCCP estimuló el consumo de oxígeno habitual en un 134,3%. La inyección final de KCN 1mM, inhibió en promedio un 72% la respiración asociada a cadena transportadora de electrones

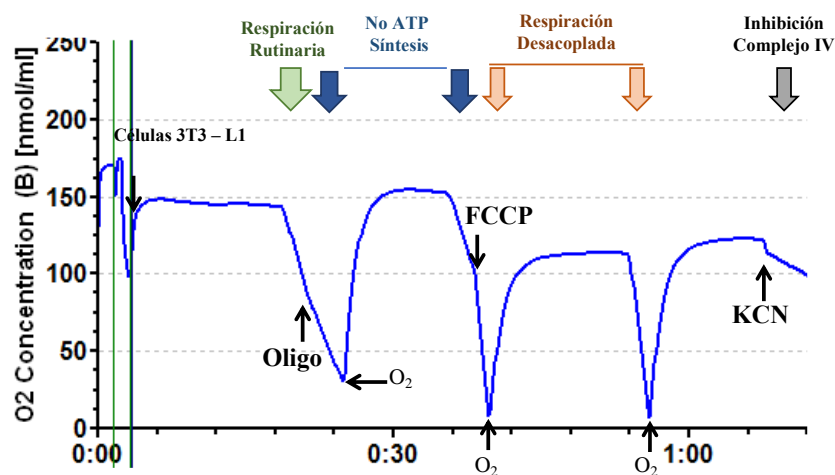


Figura 10. Curva de consumo de oxígeno para células 3T3-L1 tratadas con extracto de Et. Para un total de $3,5 \times 10^6$ células viables a 37°C en el puerto del sistema Oxygraph, se midió la velocidad media de consumo de oxígeno rutinaria y en presencia de los inhibidores: Oligomicina A 4uM, FCCP 4uM y KCN 1mM. Resultado representativo para 4 experimentos independientes.

A pesar de que los valores de la velocidad media de consumo de oxígeno parecen disminuir en la respiración rutinaria, como en los otros estados respiratorios dependientes de la adición de los moduladores mitocondriales en presencia de extracto de Et (50 ug/mL) por 72 horas. Esta diferencia no es estadísticamente significativa con respecto al control diferenciado no tratado, es decir, el extracto de Et, no parece tener ningún efecto sobre la bioenergética mitocondrial en adipocito 3T3-L1 (Figura 11).

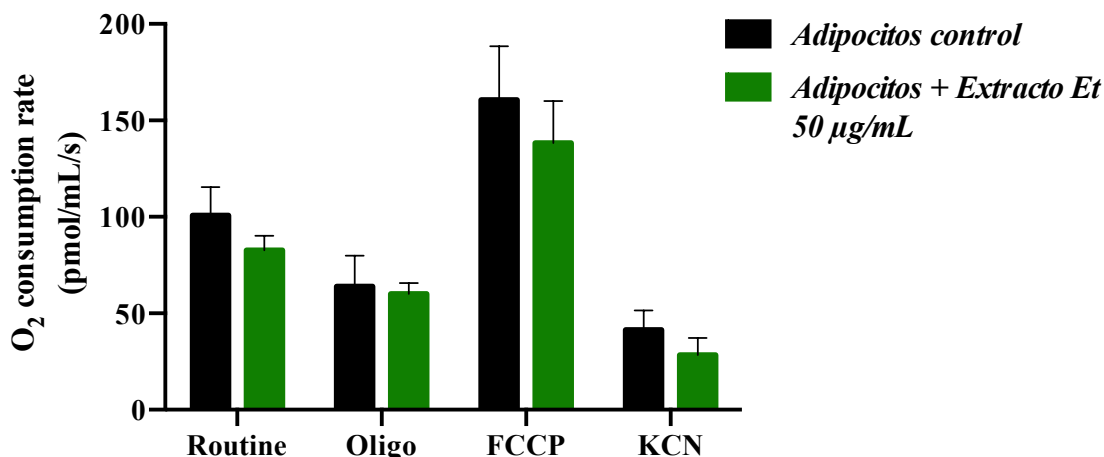


Figura 11. Evaluación del efecto del extracto de Et sobre la respiración celular en fibroblastos 3T3-L1 diferenciados. La velocidad media de consumo de oxígeno se determinó usando el sistema Okygraph 2k, midiendo la respiración asociada a la fosforilación oxidativa habitual y en presencia de 4µM de Oligomicina A, 4µM de FCCP y 1mM de KCN. Las células se trataron con el extracto de Et a una concentración de 50 µg/mL por un tiempo establecido de 72 horas, que inició una vez culminó el proceso de diferenciación. Resultado representativo para 4 experimentos independientes tanto de en células tratadas como en células control.

La velocidad de consumo en su estado rutinario y posterior a la adición de los inhibidores y desacoplantes mitocondriales en células tratadas, fue menor en comparación con el control diferenciado, como se puede observa en la tabla 3 de comparaciones múltiples, aunque la respiración parece ser más lenta en los adipocitos tratados con el extracto de Et, cabe destacar que no existe ninguna diferencia significativa entre y dentro de los grupos según los análisis de Tukey y Sidak.

Células	Velocidad media de respiración (pmol O ₂ /s/ml per million cells)				Diferencias significativas#
	Rutinaria	Oligo A	FCCP	KCN	
3T3-L1 diferenciadas (n=5)	111.805 _a	72.51 _a	182.3 _a	38.77 _a	No
3T3-L1 Tratadas (n=4)	85.31 _a	62.98 _a	158.49 _a	27.89 _a	No

Tabla 3. Comparativa entre las velocidades medias de respiración celular en adipocitos diferenciados y tratados con el extracto de Et. # La significancia estadística se determinó usando un análisis ANOVA de dos vías, seguido de los tests de Tukey y Sidak para comparaciones múltiples. En el mismo grupo los subíndices distintos indican diferencias estadísticamente significativas entre las medias de la velocidad de consumo de oxígeno en el momento previo y posteriores a la adición de los inhibidores. El análisis se realizó mediante el software GraphPad Prism.

7.7 Comparativa entre los parámetros bioenergéticos asociados a la respiración mitocondrial de miotubos diferenciados C2C12 (control) y miotubos tratados con extracto de Et.

La dinámica en el consumo de oxígeno rutinario y en presencia de los moduladores mitocondriales para miotubos C2C12 diferenciados y tratados con 50 ug/mL del extracto de Et por 24 horas, se muestra en la figura 12A. En total se realizaron 6 experimentos independientes para evaluar la respiración celular rutinaria y en presencia de FCCP y Oligomicina A. Cuatro de los 6 experimentos, evaluaron también la acción del cianuro (KCN) y en los dos experimentos independientes restantes, se identificó el comportamiento del consumo de oxígeno en miotubos intactos en presencia de Antimicina A.

Como se observa en la figura 12A, la velocidad media de consumo de oxígeno en el estado rutinario para $3,5 \times 10^6$ miotubos viables diferenciados y tratados con el extracto de Et, es en promedio 86,98 pmol/mL/s, un valor que se ve disminuido en solo un 3,13% por la adición de Oligomicina A a una concentración de 4uM. La inyección posterior de FCCP 4uM, estimulo la velocidad media de consumo de oxígeno a el doble de la respiración rutinaria con un valor de 170,28 pmol/mL/s. Finalmente, al agregar los inhibidores KCN 1mM y Antimicina A 3uM (figura 12B), el consumo de oxígeno disminuyo en un 84,9% y un 75,76% respectivamente.

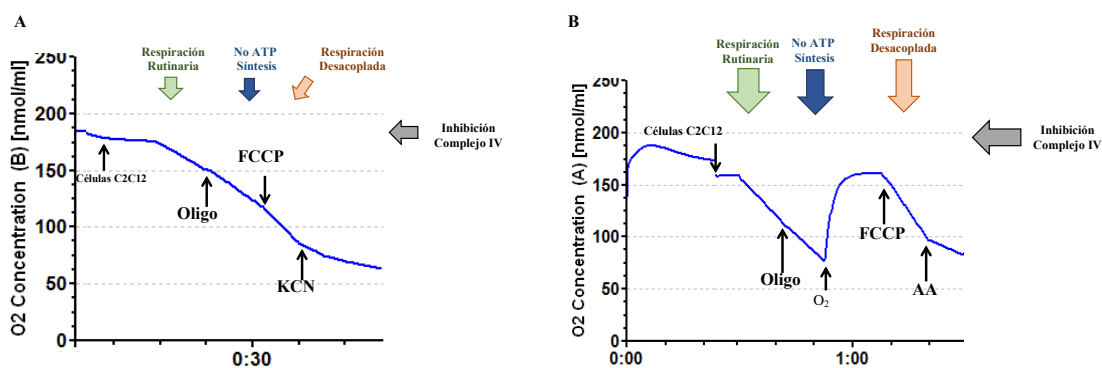


Figura 12. Consumo de oxígeno para células C2C1 diferenciadas a miotubos y tratadas con extracto de Et por 24 horas. (A) $3,5 \times 10^6$ células C2C12 viables en la celda de medición del sistema Oxygraph 2k a 37°C, se usaron para evaluar la velocidad media de consumo de oxígeno habitual y en presencia de los moduladores mitocondriales, Oligomicina A 4uM, FCCP 4uM, KCN 1mM. Este resultado es representativo para 4 experimentos independientes. (B) El total de células establecido para llevar a cabo los experimentos se usaron para calcular en el sistema Oxygraph 2k a 37°C, la velocidad media de consumo de oxígeno habitual y en presencia de los inhibidores Oligomicina A 4uM, FCCP 4uM y Antimicina A (AA) 3uM. Esta figura presenta 2 experimentos independientes en presencia del extracto de Et.

Si bien, las células tratadas con el extracto de Et por 24 horas a una concentración de 50ug/mL parecen tener una disminución en la velocidad media de consumo de oxígeno en todos los estados (rutinario, estimulado e inhibidos), lo que implica una menor reserva bioenergética y además una acción casi nula del inhibidor de la ATP sintasa (Oligomicina A), estos eventos no fueron estadísticamente significativos de acuerdo a un análisis ANOVA de dos factores, teniendo en cuenta los estados respiratorios que presentan 6 experimentos independientes como se observa en la figura 13.

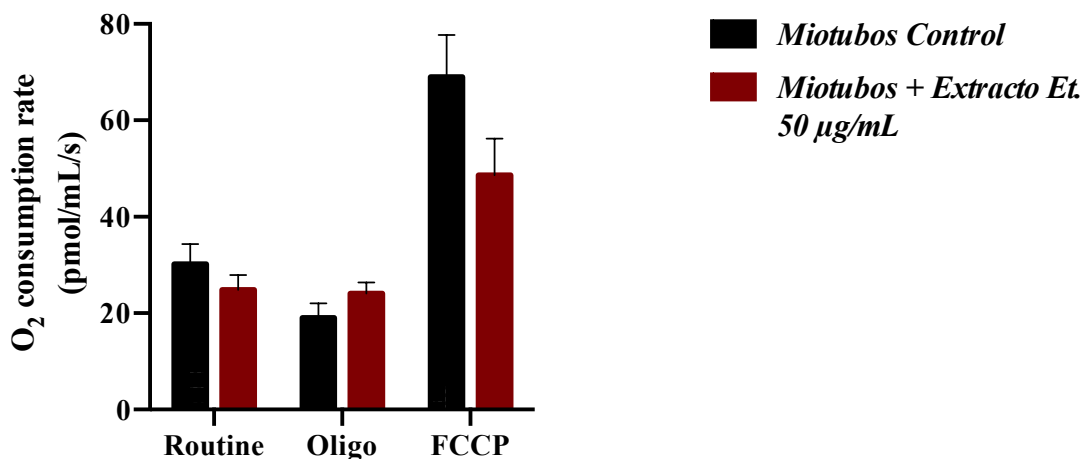


Figura 13. Evaluación del efecto de extracto de Et sobre la respiración en células C2C12 diferenciadas a miotubos sin incluir inhibidores de la cadena transportadora de electrones. La velocidad media de consumo de oxígeno en los estados respiratorios, rutinario, inhibido con Oligomicina A 4µM y estimulado con 4µM de FCCP, se midió usando el equipo Oxygraph 2k en miotubos C2C12 tratados por 24 horas con el extracto de Et a 50 µg/mL. Se realizó un análisis estadístico ANOVA de dos factores para 6 experimentos independientes.

En las secciones A y B de la figura 14, se muestran las gráficas comparativas respecto al consumo de oxígeno en miotubos C2C12 control y tratados con Et en todos los estados respiratorios, incluyendo los inhibidores de la cadena transportadora de electrones KCN y AA. Los resultados del análisis ANOVA de dos factores corroboraron los resultados en la figura 13, lo que indica que no hay diferencias significativas entre el grupo control y el tratamiento con el extracto de Et. En síntesis, no hay ninguna acción del extracto de *Eucalyptus tereticornis* en la función mitocondrial de células C2C12.

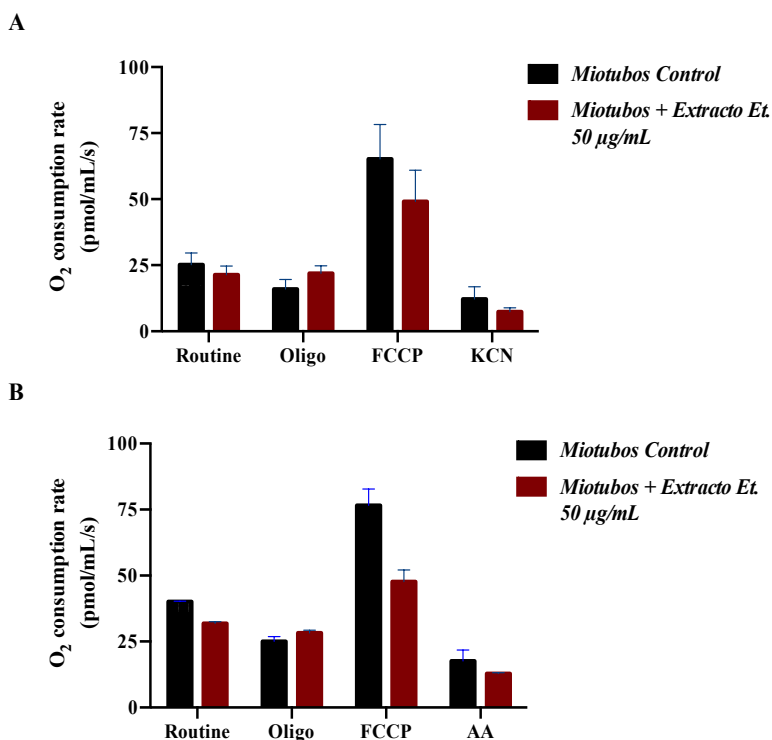


Figura 14. Evaluación del efecto del extracto de Et sobre la respiración en miotubos C2C12, incluyendo la medida del consumo de oxígeno en presencia de inhibidores de la cadena transportadora de electrones. (A) Las barras indican la velocidad de consumo de oxígeno habitual y en presencia de los inhibidores Oligomicina A, KCN y FCCP para 4 experimentos independientes llevados a cabo en el sistema Oxygraph 2k a 37°C. (B) Se muestra el consumo de oxígeno rutinario, en presencia de FCCCP, Oligomicina A y Antimicina A, en células C2C12 diferenciadas y tratadas con el extracto de Et por 24 horas, el error estándar depende de 2 experimentos independientes realizados en el equipo Oxygraph 2k a 37°C.

Tal como se observa en la tabla 4, las velocidades medias de respiración por millón de células en su estado rutinario he inhibido, se muestran teniendo en cuenta el numero de experimentos independientes realizados. A primera vista, se observa claramente que la respiración celular es mas baja en los estados respiratorios, rutinario, inhibido con KCN y AA y estimulada con FCCCP en células tratadas con el extracto de Et 50 ug/mL por 24 horas, no obstante, el valor promedio de la velocidad de consumo de oxígeno en presencia de 4uM de Oligomicina A, parece presentar mayor inhibición en mioblastos diferenciados con respecto al grupo tratado. Teniendo en cuenta lo anterior, los análisis estadísticos de comparación múltiple indican que la única diferencia significativa entre el tratamiento y el control se presenta en el consumo de oxígeno estimulado por FCCCP, ya que, el control diferenciado parece consumir oxígeno significativamente más rápido que las células diferenciadas y tratadas con el extracto de Et al agregar esta molécula desacoplante. Además, dentro de ambos grupos, existen diferencias significativas asociadas a la respiración celular en presencia de FCCCP y AA en contraste con la velocidad de consumo de oxígeno habitual o rutinario, es decir, tanto para células tratadas como para el control diferenciado, es significativa la estimulación de la respiración con FCCCP comparado con el consumo habitual de O₂, lo que implicaría la presencia de una reserva bioenergética en los dos grupos pero esta reserva sería mayor en las células control. También la disminución significativa en la respiración causada por el inhibidor del complejo III Antimicina A, indicaría que, tanto en tratamientos y controles el consumo de oxígeno se asocia principalmente al gasto generado en la fosforilación oxidativa, comparado con otros procesos celulares no mitocondriales dependientes de O₂.

Células	Velocidad media de respiración (pmol O ₂ /s/ml per million cells)					Diferencias significativas#
	Rutinaria	Oligo A	FCCP	KCN	AA	
# de Exp.	6	6	6	4	2	
Miotubos C2C12	25,87 _a	16,30 _a	59,12 _{b,*}	9,78 _a	17,60 _c	Sí
Miotubos C2C12 Tratados	21,30 _a	20,63 _a	48,65 _b	5,87 _a	8,60 _c	Sí

Tabla 4. Comparación de las velocidades medias de consumo de oxígeno para miotubos diferenciados y tratados con el extracto de Et. # La significancia estadística se determinó usando un análisis ANOVA de dos factores, además de los tests de Tukey y Sidak para comparaciones múltiples. Dentro del mismo grupo subíndices diferentes indican diferencias significativas entre las velocidades de los estados respiratorios asociados. Las diferencias significativas entre los grupos, se marcaron con un asterisco. El análisis se llevó a cabo en el software GraphPad Prism

7.8 Evaluación de la reserva bioenergética en adipocitos 3T3-L1 y miotubos tratados con 50 ug/mL de extracto de *Eucalyptus Tereticornis*.

Teniendo en cuenta que la reserva bioenergética se entiende como la diferencia entre la respiración estimulada con FCCP y la respiración rutinaria, es decir, el exceso de consumo de oxígeno generado por la adición del agente desacoplante comparado con el valor de consumo de oxígeno habitual se conoce como reserva bioenergética (O_2 consumption rate del estado estimulado con FCCP – O_2 consumption rate del estado rutinario = Reserva bioenergética). Los valores promedio de esta reserva normalizada a un millón de células para tratamientos y controles de miotubos C2C12 y adipocitos 3T3-L1, se presentan en la tabla 5. Si bien los valores de la reserva bioenergética promedio de las dos líneas celulares diferenciadas tratadas parecen ser menores que sus respectivos controles diferenciados como se muestra en la tabla 5, se llevó a cabo un análisis estadístico usando una prueba T no emparejada para verificar que esta disminución en la reserva bioenergética depende significativamente del tratamiento con 50 ug/mL del extracto de Et.

Células	Adipocitos 3T3-L1	Adipocitos 3T3-L1 tratados	Miotubos C2C12	Miotubos C2C12 Tratados
# de Exp.	4	4	6	6
Reserva bioenergética promedio	59,81	55,47	38,8	23,80

Tabla 5. Reserva bioenergética en los grupos de controles y tratamientos para adipocitos 3T3-L1 y miotubos C2C12. Se presenta la reserva bioenergética (respiración rutinaria – respiración con FCCP) promedio para adipocitos y miotubos diferenciados y tratados con 50 ug/mL del Extracto de Et. Las unidades este parámetro bioenergético se presentan en pmol/mL/s por millón de células.

Los análisis estadísticos indican que sin bien la reserva bioenergética disminuye en el caso de los adipocitos 3T3-L1 tratados con el extracto de Et (Figura 15A), esta disminución no es significativa (P valor=0,886), lo que corrobora los análisis comparativos de la sección anterior. Del mismo modo, los miotubos C2C12 tratados con el extracto de Et, presentan una disminución mucho mayor en la reserva bioenergética comparado con las células control, y aunque esta reserva se ve más afectada que en los adipocitos tratados, tampoco existe una diferencia estadísticamente significativa entre los grupos de esta línea celular como se observa en la figura 15B. En síntesis, la acción del extracto de Et, no parece afectar los parámetros mitocondriales en células C2C12 y 3T3-L1.

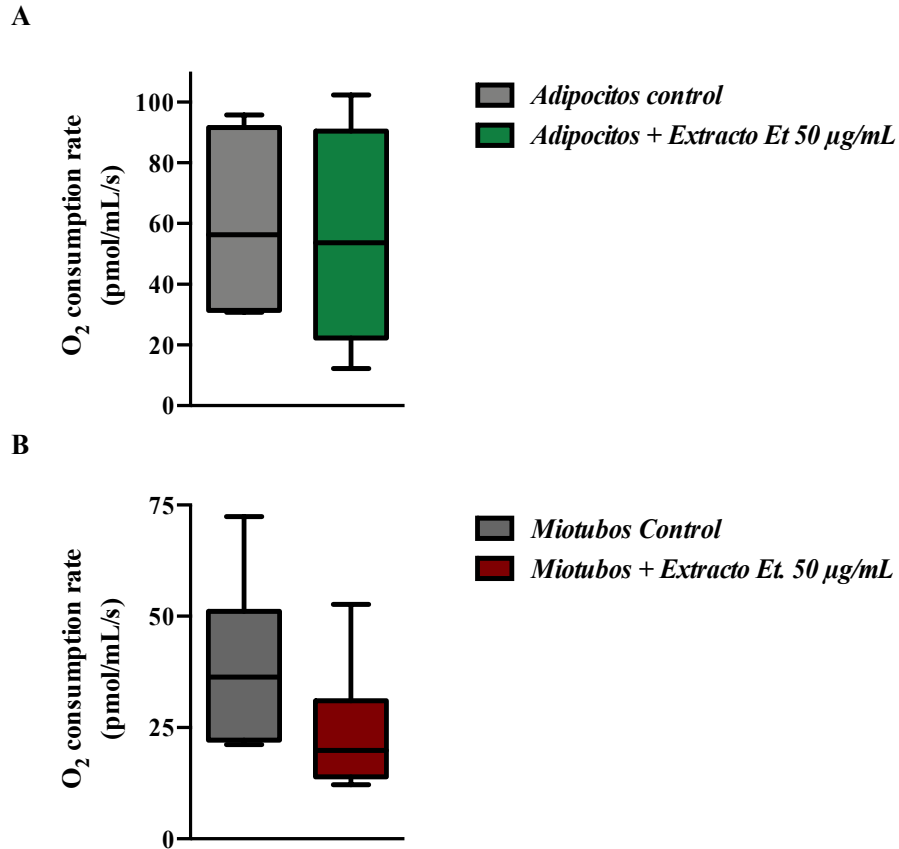


Figura 15. Comparativa de la acción de extracto de Et, sobre la reserva bioenergética en miotubos C2C12 y adipocitos 3T3-L1. (A) Evaluación del tratamiento con el extracto de Et sobre la reserva bioenergética en adipocitos 3T3-L1, el error estándar asociado corresponde a 6 experimentos independientes realizados. (B) Evaluación del extracto de Et sobre la reserva bioenergética en miotubos 3T3-L1, el número de experimentos independientes fue un total de 4. La prueba T no emparejada se realizó en el software GraphPad Prism.

8. DISCUSIÓN

8.1 Características respiratorias asociada a la diferenciación celular.

Los procesos de diferenciación celular presentan una alta regulación y señalización de proteínas, factores nucleares y de transcripción para generar un cambio de fenotipo en las células con el fin de cumplir una función especializada [116]. Estos cambios tan abruptos que también tienen trascendencia morfológica y repercusiones en el estado metabólico de las células pueden ser identificados en los cambios de la respuesta bioenergética [117].

Nuestros resultados, indican una diferencia significativa entre los estados respiratorios mitocondriales de células 3T3-L1 no diferenciada y diferenciada a adipocitos, donde la velocidad media de consumo de oxígeno rutinario de los fibroblastos 3T3-L1 solo representa un 29% de la respiración celular alcanzada por el mismo número de adipocitos diferenciados, lo anterior, sugiere que el proceso de diferenciación viene acompañado de una activación metabólica mitocondrial (figura 5 y 6). Estos resultados, van en concordancia con avances científicos que vinculan el aumento del consumo de oxígeno mitocondrial, la producción de ROS dependiente del complejo III de la cadena transportadora de electrones y la biogénesis mitocondrial, con la regulación positiva de la expresión del complejo proteico multipropósito mTORC1. Al parecer, la activación molecular de este complejo proteico genera un aumento drástico en la producción de mitocondrias, lo que implicaría un aumento en la respiración máxima y un aumento en el metabolismo para modular la producción de especies reactivas de oxígeno dependientes del complejo III [117, 118]. Los análisis de comparaciones múltiples para ambos controles de células 3T3-L1, también indican una diferencia significativa entre las respiraciones máximas de estos grupos, producto de la estimulación con FCCP.

A pesar de que no se pudo realizar un análisis estadístico concreto sobre los estados respiratorios inhibidos por Oligomicina A, KCN y Antimicina A en mioblastos C2C12, se presentan los resultados con fines comparativos para esclarecer el papel de la bioenergética mitocondrial en la miogénesis. Los resultados de esta investigación sugieren que hay un cambio en la velocidad de consumo de oxígeno en mioblastos y miotubos C2C12, es decir, el proceso de diferenciación aumenta el perfil de la respiración rutinaria y estimulada por FCCP, con velocidades medias de consumo de oxígeno inferiores en un 46,8% y 52,42% respectivamente en mioblastos, contrastados con miotubos (figura 4, 8). Este es un resultado que se ha informado por otras investigaciones que postulan al metabolismo mitocondrial, como la principal causa de diferenciación a miotubos, según estos avances, los mioblastos previos a la diferenciación presentan un metabolismo altamente dependiente de glucólisis y una baja tasa de fosforilación oxidativa, una vez comienza el proceso de cambio fenotípico, se aumenta la tasa de producción de ATP vía mitocondrial, y además, se estimula la biogénesis mitocondrial a partir de coactivadores transcripcionales y receptores nucleares [119, 120] inclusive, estudios que usaron antibióticos como la Oligomicina A, concluyeron que este inhibidor no permite la diferenciación miogénica por su acción desacoplante sobre la ATP sintasa [122]. Nuestras investigaciones sugieren que la estimulación con FCCP es significativa entre grupos, lo que implica que los mioblastos diferenciados presentan una reserva energética mayor comparada con los no diferenciados, lo cual podría tener relación con el número de mitocondrias que realizan la fosforilación oxidativa.

En resumen, el proceso de diferenciación de mioblastos y fibroblastos en miotubos y adipocitos respectivamente, puede identificarse de manera clara por un estímulo de la

respiración celular dependiente de la fosforilación oxidativa y de otros parámetros bioenergéticos asociados a las mitocondrias.

Los resultados preliminares en macrófagos no diferenciados presentados en la figura 3, permiten comprender la respuesta bioenergética su estado no inflamatorio. Nuestros avances, sugieren que la velocidad media de consumo de oxígeno para macrófagos J774 normalizada a un millón de células es muy baja, alrededor de 15,88 pmol/mL/s, lo que indica una tasa metabólica menos dependiente de la fosforilación oxidativa, además llama la atención que la inhibición causada por la Oligomicina A sobre la respiración, solo disminuyó un 13,6% el consumo de oxígeno habitual, esto implica un desacoplamiento para la producción de ATP, si bien esta información solo es representativa para un experimento, los resultados concuerdan con investigaciones que indican una alta dependencia de la vía glucolítica en macrófagos no inflamatorios para la generación de energía y una disfunción mitocondrial que se corrige en cuando el fenotipo de esta línea celular cambia, es decir, los macrófagos en su estado inflamatorio, usan la maquinaria acoplada de la fosforilación oxidativa como la fuente principal de producción energética [123].

8.2 Rol de la bioenergética mitocondrial en sistemas celulares afectados por la obesidad.

Tal y como se dio a conocer en el marco referencial, la obesidad como patología, genera un cuadro inflamatorio crónico, que implica una ruptura en la homeostasis celular. Un desequilibrio homeostático, tiene como producto la disfunción de procesos metabólicos en células implicadas con esta patología [124]. Las principales células afectadas por el exceso de adiposidad son las que se encuentra directamente relacionado con el almacenamiento de grasa, los adipocitos [125]. Lo anterior, se justifica en los estudios que elucidan procesos de señalización pro y antiinflamatorios anómalos en adipocitos hipertrofiados de grasa, donde moléculas como la familia de interleucinas y las citoquinas inflamatorias, la adipocina y el factor de necrosis tumoral alpha (TNF alpha), presentan una regulación positiva constante, lo que desencadenan perturbaciones graves en otras poblaciones celulares que comprenden macrófagos, monocitos y células endoteliales [126].

El fenotipo proinflamatorio activado en macrófagos por la regulación positiva del NF – KB y, los monocitos que se abren paso dentro de las células endoteliales y del musculo liso, para inflamar los depósitos de grasa en exceso por la sobreexpresión de proteínas señales como la MCP – 1, son sucesos que ocurren en personas que padecen obesidad y son la génesis de sus comorbilidades asociadas [126, 127]. Estos cambios en células especializadas de diferentes tejidos como adipocitos, macrófagos y células del musculo esquelético, pueden ser identificados en su respuesta bioenergética durante estos procesos patológicos crónicos.

Yu y colaboradores, investigaron las etapas de diferenciación en adipocitos 3T3-L1, sus resultados siguen la existencia de dos etapas post – diferenciación, una etapa adulta, donde los adipocitos se encuentran hipertrofiados y con una baja capacidad respiratoria, y una etapa mas joven, donde los adipocitos son muy activos metabólicamente [129]; estos resultados concuerdan con la caracterización respiratoria realizada para la misma línea celular en este trabajo, tal como se observa en las figuras 5 y 6, las velocidades medias de consumo de oxígeno para el control diferenciado de 3T3-L1 son muy altas, y además el destino del oxígeno molecular, se encuentra principalmente asociado a la cadena transportadora de electrones en la fosforilación oxidativa, lo anterior se corrobora en la alta sensibilidad al cianuro y a la oligomicina A que disminuye la respiración en un 62% y un 36% respectivamente. Detener el flujo de electrones en el complejo IV que se encuentran

acoplados para la generación de ATP, implicaría una baja en la producción de energía y finalmente, una baja demanda de oxígeno de origen mitocondrial. Esta alta actividad metabólica en la fosforilación oxidativa podría explicarse por una biogénesis mitocondrial aumentada, ya que otros avances sugieren que los procesos de diferenciación tempranos en fibroblastos 3T3-L1, son dependientes de un alto número de mitocondrias por célula [130]. Teniendo en cuenta lo anterior, y además, sumando el proceso de diferenciación celular sometido a los fibroblastos en esta investigación (7 días), se puede tener certeza de que los adipocitos diferenciados son los suficientemente jóvenes para identificar la disfunción respiratorias presente adipocitos maduros hipertrofiados [29]. Estos resultados podrían explicar también la alta reserva bioenergética de adipocitos 3T3-L1 estimulada por FCCP, un alto número de mitocondrias acopladas para la generación de energía, podría ser directamente proporcional a la respuesta generada en una estimulación máxima del consumo de oxígeno.

Los mioblastos C2C12 diferenciados a miotubos en esta investigación, al igual que los fibroblastos, presentan una alta actividad metabólica, una alta reserva bioenergética y un acoplamiento en el flujo de electrones para la generación de ATP mitocondrial, lo anterior, se justifica en la disminución de los estados respiratorios inhibidos por Oligomicina A que afecta la ATP sintasa, el KCN que detiene el flujo de electrones en el complejo IV y la Antimicina A que actúa sobre el complejo III, además del aumento considerable en la velocidad de consumo de oxígeno observada en la estimulación con FCCP (Figura 8 y 9).

Al parecer, estos resultados contrastan con investigaciones recientes que relacionan un aumento en la capacidad de la cadena transportadora de electrones en células endoteliales y del músculo liso de ratas alimentadas con una dieta hipercalórica [131]. Las miotubos y otras células que componen el músculo esquelético, dependen en principio del metabolismo glucolítico, no obstante, esta dinámica de dependencia cambia en individuos obesos que parecen según los resultados, multiplicar la síntesis de complejos mitocondriales como el COX IV, debido en principio a la regulación positiva de la síntesis de ROS causada por la alta ingesta calórica y al gasto de ATP necesario para generar eventos contráctiles de bombeo sanguíneo arterial [131, 132]. Si bien, en las investigaciones es plausible el hecho de que la velocidad de consumo de oxígeno en células endoteliales y miotubos del músculo liso es alta, los resultados *in vivo*, parecen entregar más información sobre parámetros como la producción de ATP mitocondrial, ya que, resultados demuestran una baja síntesis de la subunidad beta de la ATP sintasa en ratas obesas [131], lo que en modelos *in vitro* tendría un equivalente no inhibitorio o inhibitorio bajo de la oligomicina A, en la función de la fosforilación oxidativa, sin embargo, nuestros resultados sugieren una disminución de 36,7% en la respiración celular, por la acción de este antagonista del complejo V (ATP sintasa), que aunque no es un valor significativo con respecto a la respiración habitual en miotubos, implica un grado de acoplamiento en la cadena de electrones para la generación de ATP. Esta disparidad entre resultados podría tener origen en los modelos usados, ya que teniendo en cuenta que la obesidad es una condición metabólica que implica diferentes tipos de tejidos y poblaciones celulares, la acumulación de ROS producto de la inflamación crónica de diferentes tipos de células, es una variable mejor censada en modelos vivos, lo que trae como consecuencia una respuesta de la bioenergética mitocondrial más clara que la respuesta brindada por modelos *in vitro*. Finalmente, otro valor inhibitorio que es importante destacar, hace referencia a la baja de la velocidad rutinaria de consumo de oxígeno de un 59,5% causada por la inyección de KCN, nuestros resultados indican que más de la mitad del oxígeno molecular consumido en los procesos celulares, ocurre en la fosforilación oxidativa,

este resultado, puede relacionarse con el aumento en la expresión de COX IV como biomarcador de un aumento en el metabolismo respiratorio mitocondrial para células C2C12 diferenciadas.

8.3 Efecto del extracto rico en TPs de hojas de *Eucalyptus tereticornis* en la modulación bioenergética de adipocitos 3T3-L1 y miotubos C2C12.

Tal y como se informó en el marco referencial, el extracto de hojas de Et presenta un alto contenido de tres diferentes triterpenos pentacíclicos, de tipo ursano y oleano. Una matriz de ácido ursólico, ácido oleanólico y lactona del ácido ursólico, son los principales componentes, además, el extracto presenta otra fracción molecular desconocida que no ha sido identificada. También, cabe destacar que este extracto de hojas de Et, ha sido usado en modelos animales como un tratamiento promisorio para el control de la obesidad, ya que disminuye la esteatosis hepática y la adiposidad visceral, sin mencionar otros parámetros asociados a la inflamación causada por esta patología metabólica [20]. Teniendo en cuenta lo anterior, existen revisiones que postulan una cantidad considerable de triterpenos de origen natural derivados del isopreno, como posibles agentes terapéuticos para tratar enfermedades inflamatorias, metabólicas, virales, cáncer, he inclusive patologías parasitarias, entre otras [81]. La razón por la cual existen tantas alternativas pro-farmacológicas a partir de estas moléculas, radica en la gran cantidad de plantas que a su vez albergan una basta variedad de triterpenos diferentes con funciones terapéuticas asociadas a su estructura química [134].

En este trabajo se evaluó la acción conjunta del ácido ursólico, ácido oleanólico y lactona del ácido ursólico, sobre la bioenergética mitocondrial de adipocitos 3T3-L1 y miotubos C2C12, un modelo in vitro. Nuestros resultados reportan una disminución en los parámetros bioenergéticos de adipocitos y miotubos que fueron tratados con el extracto de Et 50 µg/mL por 72 y 24 horas respectivamente (figura 10 y 12), lo anterior implica también una baja en las reservas bioenergéticas de tratamientos vs controles (figura 15), no obstante, esta disminución no fue estadísticamente significativa a la luz de un análisis ANOVA de dos factores, teniendo en cuenta 4 o mas experimentos independientes en cada línea celular, que a pesar de la baja respiratoria en células tratadas, no se puede determinar con certeza que esa tendencia depende del tratamiento con los TPs presentes en hojas de Et. La disminución en parámetros como la reserva bioenergética desde un punto de vista fisiológico, esta directamente relacionado con la respuesta celular a insultos externos o productos no deseados del mismo metabolismo que puedan afectar la homeostasis [135]. De forma particular en células del musculo liso intactas, la reserva bioenergética se ve disminuida en presencia de especies reactivas como el HNE (4-hidroxinonenal), lo que implica en términos metabólicos, que estas células intactas funcionen sobre su máxima capacidad respiratoria en su estado habitual, suceso que no ocurre con los controles de las mismas células que no se someten a la presencia del HNE [136]. Otros estudios también indican una disminución en la reserva bioenergética además de una baja notoria en la respiración máxima celular de monocitos en presencia de especies reactivas del oxígeno, lo anterior implica que una de las principales causas de una poca reserva bioenergética es la alta concentración de ROS celular y mitocondrial [137]. Los parámetros bioenergéticos afectados por altas concentraciones de especies reactivas y otras posibles causas, son el resultado de un Índice de Salud Bioenergética bajo, que esta directamente relacionado en términos médicos con una salud decadente, es decir, el BHI por sus siglas en ingles es una medida única y útil que permite generar diagnósticos y pronósticos de un individuo, tejido o colectivo de células [138]. Según

nuestros resultados la disminución no significativa en la reserva bioenergética y en la respiración rutinaria presente en ambas líneas celulares 3T3-L1 y C2C12 tratadas con el extracto de Et, sugieren un índice de salud bioenergética igual al presente en el control diferenciado, lo anterior indicaría teniendo en cuenta los resultados beneficiosos del extracto en modelos animales obesos de la investigación ya mencionada [20], que esta mezcla rica en TPs de *Eucalyptus tereticornis* no presenta ningún efecto sobre la respuesta bioenergética, sugiriendo así que el mecanismo de acción antigluceante y antidiabética de este extracto no parece tener relación directa con la mitocondria desde una perspectiva respiratoria en la fosforilación oxidativa. Una hipótesis alterna impulsada por una investigación realizada en 2013 por Iseli y colaboradores que asociaba el uso de triterpenos extraídos del melón sobre miotubos L6 y células HeLa, vinculan la activación de la vía señalizadora de la proteína quinasa dependiente de AMP con los compuestos bioactivos de este fruto; aunque las líneas celulares y los triterpenos en este proyecto son diferentes a los usados por los investigadores de la publicación mencionada; en general se tiene registro de que muchos compuestos promisorios de origen natural activan esta vía, por la modulación en la carga energética asociada a las proporciones de ADP, AMP y ATP intracelular, finalmente, esta regulación metabólica puede depender de una disminución de la respuesta bioenergética, que si bien en este trabajo solo se observó como una tendencia no significativa, es probable que la regulación en la ruta AMPK sea el blanco de acción del extracto de *E. Tereticornis* [139], [140].

También es importante destacar que el modelo experimental, es decir, los miotubos y adipocitos necesitarían un entorno sistémico y orgánico generado por modelos obesos, que ciertamente traería una repercusión inflamatoria tal que esta pudiera verse reflejada en la respuesta bioenergética de estas células, más allá del proceso de diferenciación asociado a nuestro diseño experimental. A pesar de que la acción del extracto no fue reconocida en los análisis estadísticos, es importante destacar los efectos reportados para cada uno de los tres TPs presente en este, de modo que puedan ser asociado con los resultados.

En principio, para el ácido oleanólico hay una gran cantidad de investigaciones que vinculan la suplementación dietaria de este producto natural, con una mejora en la resistencia a la insulina en modelos murinos con diabetes tipos 2, así como la modulación los niveles de ROS mitocondriales, al aumentar la expresión de proteínas antioxidantes como la súper oxido dismutasa (SOD) [138, 139]. Esta disminución en las especies reactivas puede tener relación directa con la baja en el consumo de oxígeno mitocondrial rutinario y en presencia de los inhibidores en adipocitos 3T3-L1 (tabla 3), ya que, si el aumento en las especies reactivas promueven la diferenciación, la población celular tratada con el extracto de Et, podría detener este proceso, elevando el número de fibroblastos con una menor tasa de actividad metabólica en la muestra diferenciada, lo que implicaría una respuesta bioenergética disminuida. Otro resultado importante para destacar en esta sección es la disminución en la sensibilidad a la Oligomicina A en miotubos C2C12 tratados con el extracto de Et. La velocidad media de consumo de oxígeno después de la inyección con Oligomicina A, redujo únicamente en 3,13% la respiración rutinaria en miotubos + Extracto Et 50 ug/mL, comparado con una reducción del 36,7% evidenciado en el grupo de células diferenciadas (tabla 4, figura 12, 13 y 14). Los avances de una investigación realizada en el 2011 por Bernatoniene y colaboradores podrían relacionar esta resistencia al inhibidor mitocondrial (que explica desacoplamiento en la producción de ATP de la cadena transportadora de electrones), con la suplementación de ácido ursólico en mioblastos cardiacos, según los investigadores, la adición de 0,4 a 200 ng/mL de este triterpenos de tipo ursano, genera un desacoplamiento

sutil en la fosforilación oxidativa, lo que tentativamente explicaría la respiración desacoplada en miotubos C2C12 tratados con el extracto que posee una fracción de triterpeno pentacíclico, presentado en este trabajo [143]

Finalmente, y en términos de viabilidad celular, ningún experimento independiente de líneas celulares 3T3-L1 y C2C12 tratadas con 50 ug/mL de extracto de hojas de Et en los tiempos establecidos, tuvo problemas de muerte celular, es decir, todo los ensayos de respirometría de alta resolución en el sistema Oxygraph 2k, se realizaron con no menos del 95% de células intactas y viables, este es un resultado contradictorio a la luz de los científicos que sugieren una actividad pro-apoptótica y antiproliferativas de los TPs usados en esta investigación.

Li et al, determinaron que la concentración de ácido oleanólico máxima para inhibir la mitad de la proliferación in vitro de células de hepatocarcinoma humano fue de 6 uM por 72h, además, la adición de este ácido generó una regulación positiva de la expresión en la proteína apoptótica Bax, lo que desencadenó la escisión de las caspasas 3 y 9 causando la muerte celular programada de origen mitocondrial [144]. En este orden de ideas, otra investigación relacionó la suplementación con 4uM de ácido ursólico por 48 horas, con la inhibición de la familia de proteína antiapoptótica Bcl2, lo que implica el inicio de la apoptosis intrínseca, en líneas celulares de cáncer de colon [145]; del mismo modo en la línea celular maligna de cáncer de ovario A2780, la proliferación celular se detuvo por la acción de la lactona del ácido ursólico presente en un extracto de frutos de *Eucalyptus Camaldulensis* [92]. Una posible explicación para la disparidad entre los resultados publicados y los encontrados en nuestra investigación, podría tener relación con la fracción no identificada de extracto de las hojas de *Eucalyptus Tereticornis*, es decir, es probable que la fracción no identificada disminuya los efectos antiproliferativos y apoptóticos de los TPs presentes en el extracto, lo que permite llevar a tiempos mas prolongados y a mayores concentraciones los tratamientos en modelos in vitro sin comprometer la viabilidad celular.

9. CONCLUSIONES

Hasta el momento, este es el primer estudio que involucra la evaluación de la acción de triterpenos pentacíclicos sobre la respuesta bioenergética en cultivos celulares de origen animal.

Nuestros resultados sugieren que el proceso de diferenciación celular parece tener un efecto sobre la respuesta bioenergética en células 3T3-L1 y C2C12; la transición fenotípica de mioblastos y fibroblastos a miotubos y adipocitos respectivamente, genera un aumento en la respiración celular y en la dependencia metabólica de la fosforilación oxidativa, tal vez para garantizar una alta producción energética y así suplir los gastos causados por la especialización celular. Además, el extracto de *Eucalyptus tereticornis* rico en triterpenos, no presenta ninguna acción significativa sobre la respuesta bioenergética en miotubos y adipocitos diferenciados.

Lo anterior implica que, comprender los efectos celulares de este extracto exige otros estudios adicionales que se están llevando a cabo en el marco de las otras componentes del proyecto al cual pertenece esta investigación. En particular el proyecto evalúa, una posible afectación asociada a la carga energética, es decir, la relación entre las concentraciones de ATP, AMP y ADP intracelular, ya que, este proceso celular podría activar la vía de la proteína quinasa dependiente de AMP (AMPK), ruta señalizadora que activa genes relacionados a la biogénesis mitocondrial, además de la inhibición de la ruta metabólica lipogénica.

10. BIBLIOGRAFÍA

- [1] R. J. R. Levesque, "Obesity and Overweight," in *Encyclopedia of Adolescence*, 2011, pp. 1913–1915.
- [2] ICBF, "Encuesta Nacional de la Situación Nutricional," 2015.
- [3] E. Di Angelantonio *et al.*, "Body-mass index and all-cause mortality: individual-participant-data meta-analysis of 239 prospective studies in four continents," *Lancet*, vol. 388, no. 10046, pp. 776–786, 2016.
- [4] T. Lehnert, D. Sonntag, A. Konnopka, S. Riedel-Heller, and H. H. König, "Economic costs of overweight and obesity," *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 27, no. 2, pp. 105–115, 2013.
- [5] A. Dee *et al.*, "The direct and indirect costs of both overweight and obesity: A systematic review," *BMC Res. Notes*, vol. 7, no. 1, pp. 1–9, 2014.
- [6] R. Sturm, "The effects of obesity, smoking, and drinking on medical problems and costs," *Health Aff.*, vol. 21, no. 2, pp. 245–253, 2002.
- [7] J. W. Anderson, C. W. C. Kendall, and D. J. A. Jenkins, "Importance of weight management in type 2 diabetes: Review with meta-analysis of clinical studies," *J. Am. Coll. Nutr.*, vol. 22, no. 5, pp. 331–339, 2003.
- [8] R. G. Wild sarah, "Estimates for the year 2000 and projections for 2030," *World Health*, vol. 27, no. 5, 2004.
- [9] MinSalud; DPS; INS; ICBF; UNAL, "Encuesta Nacional de la Situación Nutricional ENSIN 2015.," 2015.
- [10] R. Y. Moreno Claudia, "Análisis De Situación De Salud (ASIS) Dirección de Epidemiología y Demografía," 2018.
- [11] M. Agudelo-Botero and C. A. Dávila-Cervantes, "Carga de la mortalidad por diabetes mellitus en América Latina 2000-2011: los casos de Argentina, Chile, Colombia y México," *Gac. Sanit.*, vol. 29, no. 3, pp. 172–177, 2015.
- [12] J. R. Araujo and F. Martel, "Sibutramine Effects on Central Mechanisms Regulating Energy Homeostasis," *Curr. Neuropharmacol.*, vol. 999, no. 999, pp. 1–4, 2011.
- [13] J. L. Montero *et al.*, "Orlistat associated subacute hepatic failure," *J. Hepatol.*, vol. 34, no. 1, p. 173, 2001.
- [14] R. S. Ahima, "Digging deeper into obesity," *J. Clin. Invest.*, vol. 121, no. 6, pp. 2076–2079, 2011.
- [15] A. Azab, A. Nassar, and A. N. Azab, "Anti-inflammatory activity of natural products," *Molecules*, vol. 21, no. 10, pp. 1–19, 2016.
- [16] N. Lachkar *et al.*, "Anti-inflammatory and antioxidant effect of Ceratonia siliqua L. methanol barks extract," *J. Chem. Pharm. Res.*, vol. 8, no. 3, pp. 202–210, 2016.
- [17] A. T. Rufino *et al.*, "Anti-inflammatory and chondroprotective activity of (+)- α -pinene: Structural and enantiomeric selectivity," *J. Nat. Prod.*, vol. 77, no. 2, pp. 264–269, 2014.
- [18] W. J. Zhi, L. F. Wang, and X. J. Hu, "Recent advances in the effects of microwave radiation on brains," *Mil. Med. Res.*, vol. 4, no. 1, pp. 1–14, 2017.
- [19] K. N. Keane, E. K. Calton, R. Carlessi, P. H. Hart, and P. Newsholme, "The bioenergetics of inflammation: Insights into obesity and type 2 diabetes," *Eur. J.*

- Clin. Nutr.*, vol. 71, no. 7, pp. 904–912, 2017.
- [20] A. Guillén, S. Granados, K. E. Rivas, O. Estrada, L. F. Echeverri, and N. Balcázar, “Antihyperglycemic activity of *eucalyptus tereticornis* in insulin-resistant cells and a nutritional model of diabetic mice,” *Adv. Pharmacol. Sci.*, vol. 2015, 2015.
- [21] L. V. Yuzefovych *et al.*, “Alteration of mitochondrial function and insulin sensitivity in primary mouse skeletal muscle cells isolated from transgenic and knockout mice: Role of OGG1,” *Endocrinology*, vol. 154, no. 8, pp. 2640–2649, 2013.
- [22] E. V. Menshikova, V. B. Ritov, F. G. S. Toledo, R. E. Ferrell, B. H. Goodpaster, and D. E. Kelley, “Effects of weight loss and physical activity on skeletal muscle mitochondrial function in obesity,” *Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab.*, vol. 288, no. 4, pp. 51–4, 2005.
- [23] L. Ramalingam *et al.*, “The renin angiotensin system, oxidative stress and mitochondrial function in obesity and insulin resistance,” *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.*, vol. 1863, no. 5, pp. 1106–1114, 2017.
- [24] F. Lei *et al.*, “Evidence of anti-obesity effects of the pomegranate leaf extract in high-fat diet induced obese mice,” *Int. J. Obes.*, vol. 31, no. 6, pp. 1023–1029, 2007.
- [25] C. A. Curat *et al.*, “From Blood Monocytes to Adipose Tissue—Resident Macrophages,” *Diabetes*, vol. 53, no. May, 2004.
- [26] A. Rodríguez, S. Ezquerro, L. Méndez-Giménez, S. Becerril, and G. Frühbeck, “Revisiting the adipocyte: A model for integration of cytokine signaling in the regulation of energy metabolism,” *Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab.*, vol. 309, no. 8, pp. E691–E714, 2015.
- [27] G. S. Hotamisligil, “Inflammation and metabolic disorders,” *Nature*, vol. 444, no. 7121, pp. 860–867, 2006.
- [28] S. De Ferranti and D. Mozaffarian, “The perfect storm: Obesity, adipocyte dysfunction, and metabolic consequences,” *Clin. Chem.*, vol. 54, no. 6, pp. 945–955, 2008.
- [29] C. Y. Woo, J. E. Jang, S. E. Lee, E. H. Koh, and K. U. Lee, “Mitochondrial dysfunction in adipocytes as a primary cause of adipose tissue inflammation,” *Diabetes Metab. J.*, vol. 43, no. 3, pp. 247–256, 2019.
- [30] C. M. Kusminski and P. E. Scherer, “Mitochondrial dysfunction in white adipose tissue,” *Trends Endocrinol. Metab.*, vol. 23, no. 9, pp. 435–443, 2012.
- [31] J. X. Rong *et al.*, “Adipose Mitochondrial Biogenesis Is Suppressed in db / db,” *Diabetes*, vol. 56, no. July, pp. 1751–1760, 2007.
- [32] M. L. Hartman *et al.*, “Relation of mitochondrial oxygen consumption in peripheral blood mononuclear cells to vascular function in type 2 diabetes mellitus,” *Vasc. Med. (United Kingdom)*, vol. 19, no. 1, pp. 67–74, 2014.
- [33] D. J. Tyrrell, M. S. Bharadwaj, C. G. Van Horn, A. P. Marsh, B. J. Nicklas, and A. J. A. Molina, “Blood-cell bioenergetics are associated with physical function and inflammation in overweight/obese older adults,” *Exp. Gerontol.*, vol. 70, pp. 84–91, 2015.
- [34] M. L. Bonet, P. Oliver, and A. Palou, “Pharmacological and nutritional agents promoting browning of white adipose tissue,” *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids*, vol. 1831, no. 5, pp. 969–985, 2013.

- [35] S. Keipert and M. Jastroch, "Brite/beige fat and UCP1 - Is it thermogenesis?," *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.*, vol. 1837, no. 7, pp. 1075–1082, 2014.
- [36] G. Datta *et al.*, "Bioenergetic programming of macrophages by the apolipoprotein A-I mimetic peptide 4F," *Biochem. J.*, vol. 467, no. 3, pp. 517–527, 2015.
- [37] N. (Universidad de las I. B. Frau Cañellas, "Estudio de los aspectos básicos de la función mitocondrial en tejido aórtico de ratas macho obesas," 2012.
- [38] G. Manuel Moreno, "Definición y clasificación de la obesidad," *Rev. Médica Clínica Las Condes*, vol. 23, no. 2, pp. 124–128, 2012.
- [39] M. V. Chakravarthy and F. W. Booth, "Eating, exercise, and 'thrifty' genotypes: Connecting the dots toward an evolutionary understanding of modern chronic diseases," *J. Appl. Physiol.*, vol. 96, no. 1, pp. 3–10, 2004.
- [40] C. Blomquist *et al.*, "Attenuated Low-Grade Inflammation Following Long-Term Dietary Intervention in Postmenopausal Women with Obesity," *Obesity*, vol. 25, no. 5, pp. 892–900, 2017.
- [41] C. L. Roth, M. Kratz, M. M. Ralston, and T. Reinehr, "Changes in adipose-derived inflammatory cytokines and chemokines after successful lifestyle intervention in obese children," *Metabolism.*, vol. 60, no. 4, pp. 445–452, 2011.
- [42] K. N. Integrative physiology of human adipose tissue Frayn, F. Karpe, B. A. Fielding, I. A. Macdonald, and S. W. Coppack, "Integrative physiology of human adipose tissue," *Int. J. Obes.*, vol. 27, no. 8, pp. 875–888, 2003.
- [43] E. E. Kershaw and J. S. Flier, "Adipose tissue as an endocrine organ," *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 89, no. 6, pp. 2548–2556, 2004.
- [44] C. J. Lyon, R. E. Law, and W. A. Hsueh, "Minireview: Adiposity, inflammation, and atherogenesis," *Endocrinology*, vol. 144, no. 6, pp. 2195–2200, 2003.
- [45] M. W. Rajala and P. E. Scherer, "Minireview: The adipocyte - At the crossroads of energy homeostasis, inflammation, and atherosclerosis," *Endocrinology*, vol. 144, no. 9, pp. 3765–3773, 2003.
- [46] A. S. Klein *et al.*, "Leptin regulates proinflammatory immune responses tributes to several of the major complications of obe-," pp. 57–65.
- [47] P. A. Permana, C. Menge, and P. D. Reaven, "Macrophage-secreted factors induce adipocyte inflammation and insulin resistance," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 341, no. 2, pp. 507–514, 2006.
- [48] K. Takahashi *et al.*, "Adiposity Elevates Plasma MCP-1 Levels Leading to the Increased CD11b-positive Monocytes in Mice," *J. Biol. Chem.*, vol. 278, no. 47, pp. 46654–46660, 2003.
- [49] T. Suganami, J. Nishida, and Y. Ogawa, "A paracrine loop between adipocytes and macrophages aggravates inflammatory changes: Role of free fatty acids and tumor necrosis factor α ," *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 25, no. 10, pp. 2062–2068, 2005.
- [50] I. F. Charo and M. B. Taubman, "Chemokines in the pathogenesis of vascular disease," *Circ. Res.*, vol. 95, no. 9, pp. 858–866, 2004.
- [51] G. S. Hotamisligil, N. S. Shargill, and B. M. Spiegelman, "Adipose expression of tumor necrosis factor- α : Direct role in obesity-linked insulin resistance," *Science (80-)*, vol. 259, no. 5091, pp. 87–91, 1993.

- [52] K. Maedler *et al.*, "Glucose-induced β cell production of IL-1 β contributes to glucotoxicity in human pancreatic islets.," vol. 110, no. April, pp. 851–860, 2017.
- [53] R. M. Pollack, M. Y. Donath, D. LeRoith, and G. Leibowitz, "Anti-inflammatory agents in the treatment of diabetes and its vascular complications," *Diabetes Care*, vol. 39, no. August, pp. S244–S252, 2016.
- [54] J. Hensen, C. P. Howard, V. Walter, and T. Thuren, "Impact of interleukin-1 β antibody (canakinumab) on glycaemic indicators in patients with type 2 diabetes mellitus: Results of secondary endpoints from a randomized, placebo-controlled trial," *Diabetes Metab.*, vol. 39, no. 6, pp. 524–531, 2013.
- [55] C. Larsen and A. Vaag, "Sustained Effects of Interleukin-1 Receptor Antagonist Treatment in Type 2 Diabetes," *Emerg. Treat. Technol.*, vol. 32, no. 9, 2009.
- [56] M. Yuan *et al.*, "Reversal of obesity- and diet-induced insulin resistance with salicylates or targeted disruption of Ikk β ," *Science (80-.)*, vol. 293, no. 5535, pp. 1673–1677, 2001.
- [57] J. Koska *et al.*, "The effect of salsalate on insulin action and glucose tolerance in obese non-diabetic patients: Results of a randomised double-blind placebo-controlled study," *Diabetologia*, vol. 52, no. 3, pp. 385–393, 2009.
- [58] E. Faghihmani, A. Aminorroaya, H. Rezvanian, P. Adibi, F. Ismail-Beigi, and M. Amini, "Salsalate improves glycaemic control in patients with newly diagnosed type 2 diabetes," *Acta Diabetol.*, vol. 50, no. 4, pp. 537–543, 2013.
- [59] M. Foretz, B. Guigas, L. Bertrand, M. Pollak, and B. Viollet, "Metformin: From mechanisms of action to therapies," *Cell Metab.*, vol. 20, no. 6, pp. 953–966, 2014.
- [60] P. Rösen and N. F. Wiernsperger, "Metformin delays the manifestation of diabetes and vascular dysfunction in Goto-Kakizaki rats by reduction of mitochondrial oxidative stress," *Diabetes. Metab. Res. Rev.*, vol. 22, no. 4, pp. 323–330, 2006.
- [61] S. El Messaoudi, G. A. Rongen, R. A. De Boer, and N. P. Riksen, "The cardioprotective effects of metformin," *Curr. Opin. Lipidol.*, vol. 22, no. 6, pp. 445–453, 2011.
- [62] J. B. Brown, C. Conner, and G. A. Nichols, "Secondary failure of metformin monotherapy in clinical practice," *Diabetes Care*, vol. 33, no. 3, pp. 501–506, 2010.
- [63] H. Ghanim, S. Dhindsa, A. Aljada, A. Chaudhuri, P. Viswanathan, and P. Dandona, "Low-dose rosiglitazone exerts an antiinflammatory effect with an increase in adiponectin independently of free fatty acid fall and insulin sensitization in obese type 2 diabetics," *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 91, no. 9, pp. 3553–3558, 2006.
- [64] M. Chan, "Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional," 2013.
- [65] P. Arulselvan *et al.*, "Role of Antioxidants and Natural Products in Inflammation," *Oxid. Med. Cell. Longev.*, vol. 2016, 2016.
- [66] S. P. Weisberg, R. Leibel, and D. V. Tortoriello, "Dietary curcumin significantly improves obesity-associated inflammation and diabetes in mouse models of diabetes," *Endocrinology*, vol. 149, no. 7, pp. 3549–3558, 2008.
- [67] M. Hokayem *et al.*, "Grape polyphenols prevent fructose-induced oxidative stress and insulin resistance in first-degree relatives of type 2 diabetic patients," *Diabetes Care*, vol. 36, no. 6, pp. 1454–1461, 2013.
- [68] K. Charradi, S. Elkahoui, F. Limam, and E. Aouani, "High-fat diet induced an

- oxidative stress in white adipose tissue and disturbed plasma transition metals in rat: Prevention by grape seed and skin extract," *J. Physiol. Sci.*, vol. 63, no. 6, pp. 445–455, 2013.
- [69] A. Overman, C. C. Chuang, and M. McIntosh, "Quercetin attenuates inflammation in human macrophages and adipocytes exposed to macrophage-conditioned media," *Int. J. Obes.*, vol. 35, no. 9, pp. 1165–1172, 2011.
- [70] J. H. Kang, G. Tsuyoshi, I. S. Han, T. Kawada, Y. M. Kim, and R. Yu, "Dietary capsaicin reduces obesity-induced insulin resistance and hepatic steatosis in obese mice fed a high-fat diet," *Obesity*, vol. 18, no. 4, pp. 780–787, 2010.
- [71] E. Yaned *et al.*, "Diet Based on Food from the Colombian Andean Region Decreases C-reactive Protein, IL6, and Leptin in Women with Obesity," *J. Food Nutr. Res.*, vol. 7, no. 10, pp. 751–758, 2019.
- [72] D. K. Letourneau *et al.*, "Does plant diversity benefit agroecosystems? A synthetic review," *Ecol. Appl.*, vol. 21, no. 1, pp. 9–21, 2011.
- [73] T. Akihisa *et al.*, "Antitubercular activity of triterpenoids from asteraceae flowers," *Biol. Pharm. Bull.*, vol. 28, no. 1, pp. 158–160, 2005.
- [74] D. R. Phillips, J. M. Rasbery, B. Bartel, and S. P. Matsuda, "Biosynthetic diversity in plant triterpene cyclization," *Curr. Opin. Plant Biol.*, vol. 9, no. 3, pp. 305–314, 2006.
- [75] R. Xu, G. C. Fazio, and S. P. T. Matsuda, "On the origins of triterpenoid skeletal diversity," *Phytochemistry*, vol. 65, no. 3, pp. 261–291, 2004.
- [76] J. D. Connolly and R. A. Hill, "Triterpenoids," *Nat. Prod. Rep.*, vol. 27, no. 1, pp. 79–132, 2010.
- [77] K. T. Liby, M. M. Yore, and M. B. Sporn, "Triterpenoids and rexinoids as multifunctional agents for the prevention and treatment of cancer," *Nat. Rev. Cancer*, vol. 7, no. 5, pp. 357–369, 2007.
- [78] D. Poeckel and O. Werz, "Boswellic Acids: Biological Actions and Molecular Targets," *Curr. Med. Chem.*, vol. 13, no. 28, pp. 3359–3369, 2006.
- [79] T. G. Tolstikova, I. V. Sorokina, G. A. Tolstikov, A. G. Tolstikov, and O. B. Flekhter, "Biological activity and pharmacological prospects of lupane terpenoids: II. Semisynthetic lupane derivatives," *Russ. J. Bioorganic Chem.*, vol. 32, no. 3, pp. 261–276, 2006.
- [80] P. Yogeewari and D. Sriram, "Betulinic Acid and Its Derivatives: A Review on their Biological Properties," *Curr. Med. Chem.*, vol. 12, no. 6, pp. 657–666, 2010.
- [81] H. Sheng and H. Sun, "Synthesis, biology and clinical significance of pentacyclic triterpenes: A multi-target approach to prevention and treatment of metabolic and vascular diseases," *Nat. Prod. Rep.*, vol. 28, no. 3, pp. 543–593, 2011.
- [82] J. Nazaruk and M. Borzym-Kluczyk, "The role of triterpenes in the management of diabetes mellitus and its complications," *Phytochem. Rev.*, vol. 14, no. 4, pp. 675–690, 2015.
- [83] R. Checker *et al.*, "Potent anti-inflammatory activity of ursolic acid, a triterpenoid antioxidant, is mediated through suppression of NF- κ B, AP-1 and NF-AT," *PLoS One*, vol. 7, no. 2, 2012.
- [84] V. S. Rao *et al.*, "Ursolic acid, a pentacyclic triterpene from sambucus australis, prevents abdominal adiposity in mice fed a high-fat diet," *J. Med. Food*, vol. 14, no.

- 11, pp. 1375–1382, 2011.
- [85] Y. Li, Z. Kang, S. Li, T. Kong, X. Liu, and C. Sun, “Ursolic acid stimulates lipolysis in primary-cultured rat adipocytes,” *Mol. Nutr. Food Res.*, vol. 54, no. 11, pp. 1609–1617, 2010.
- [86] J. C. Kim *et al.*, “Concurrent treatment with ursolic acid and low-intensity treadmill exercise improves muscle atrophy and related outcomes in rats,” *Korean J. Physiol. Pharmacol.*, vol. 22, no. 4, pp. 427–436, 2018.
- [87] R. Rodriguez-Rodriguez, “Oleanolic Acid and Related Triterpenoids from Olives on Vascular Function: Molecular Mechanisms and Therapeutic Perspectives,” *Curr. Med. Chem.*, vol. 22, no. 11, pp. 1414–1425, 2015.
- [88] J. Wainstein *et al.*, “Olive leaf extract as a hypoglycemic agent in both human diabetic subjects and in rats,” *J. Med. Food*, vol. 15, no. 7, pp. 605–610, 2012.
- [89] C. L. de Melo *et al.*, “Oleanolic acid, a natural triterpenoid improves blood glucose tolerance in normal mice and ameliorates visceral obesity in mice fed a high-fat diet,” *Chem. Biol. Interact.*, vol. 185, no. 1, pp. 59–65, 2010.
- [90] H. S. Kim *et al.*, “Blockade of visfatin induction by oleanolic acid via disturbing IL-6-TRAF6-NF- κ B signaling of adipocytes,” *Exp. Biol. Med.*, vol. 239, no. 3, pp. 284–292, 2014.
- [91] N. Banno *et al.*, “Anti-inflammatory and antitumor-promoting effects of the triterpene acids from the leaves of *Eriobotrya japonica*,” *Biol. Pharm. Bull.*, vol. 28, no. 10, pp. 1995–1999, 2005.
- [92] G. Topu *et al.*, “Ovarian antiproliferative activity directed isolation of triterpenoids from fruits of *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh,” *Phytochem. Lett.*, vol. 4, no. 4, pp. 421–425, 2011.
- [93] A. Maurya and S. K. Srivastava, “Determination of ursolic acid and ursolic acid lactone in the leaves of *eucalyptus tereticornis* by hplc,” *J. Braz. Chem. Soc.*, vol. 23, no. 3, pp. 468–472, 2012.
- [94] A. Brehm, M. Krssak, A. I. Schmid, P. Nowotny, W. Waldhäusl, and M. Roden, “Increased lipid availability impairs insulin-stimulated ATP synthesis in human skeletal muscle,” *Diabetes*, vol. 55, no. 1, pp. 136–140, 2006.
- [95] M. Mogensen *et al.*, “Mitochondrial respiration is decreased in skeletal muscle of patients with type 2 diabetes,” *Diabetes*, vol. 56, no. 6, pp. 1592–1599, 2007.
- [96] S. Furukawa, M. Matsuda, S. Furukawa, T. Fujita, M. Shimabukuro, and M. Iwaki, “Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome Find the latest version : Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome,” *J. Clin. Invest.*, vol. 114, no. 12, pp. 1752–1761, 2017.
- [97] M. K. Shigenaga, T. M. Hagen, and B. N. Ames, “Oxidative damage and mitochondrial decay in aging,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 91, no. 23, pp. 10771–10778, 1994.
- [98] K. B. Choksi, W. H. Boylston, J. P. Rabek, W. R. Widger, and J. Papaconstantinou, “Oxidatively damaged proteins of heart mitochondrial electron transport complexes,” *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.*, vol. 1688, no. 2, pp. 95–101, 2004.
- [99] J. A. Kim, Y. Wei, and J. R. Sowers, “Role of mitochondrial dysfunction in insulin

- resistance," *Circ. Res.*, vol. 102, no. 4, pp. 401–414, 2008.
- [100] N. Jeremic, P. Chaturvedi, and S. C. Tyagi, "Browning of White Fat: Novel Insight Into Factors, Mechanisms, and Therapeutics," *J. Cell. Physiol.*, vol. 232, no. 1, pp. 61–68, 2017.
- [101] P. Wang, E. Mariman, J. Renes, and J. Keijer, "The secretory function of adipocytes in the physiology of white adipose tissue," *J. Cell. Physiol.*, vol. 216, no. 1, pp. 3–13, 2008.
- [102] K. I. Stanford, R. J. W. Middelbeek, and L. J. Goodyear, "Exercise effects on white adipose tissue: Beiging and metabolic adaptations," *Diabetes*, vol. 64, no. 7, pp. 2361–2368, 2015.
- [103] M. Giralt and F. Villarroya, "White, brown, beige/brite: Different adipose cells for different functions?," *Endocrinology*, vol. 154, no. 9, pp. 2992–3000, 2013.
- [104] K. A. Lo and L. Sun, "Turning WAT into BAT: A review on regulators controlling the browning of white adipocytes," *Biosci. Rep.*, vol. 33, no. 5, pp. 711–719, 2013.
- [105] E. Rial and M. M. González-Barroso, "Physiological regulation of the transport activity in the uncoupling proteins UCP1 and UCP2," *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.*, vol. 1504, no. 1, pp. 70–81, 2001.
- [106] Z. B. Andrews, S. Diano, and T. L. Horvath, "Mitochondrial uncoupling proteins in the CNS: In support of function and survival," *Nat. Rev. Neurosci.*, vol. 6, no. 11, pp. 829–840, 2005.
- [107] J. H. Young, E. F. Korman, and J. McLick, "On the mechanism of ATP synthesis in oxidative phosphorylation: A review," *Bioorg. Chem.*, vol. 3, no. 1, pp. 1–15, 1974.
- [108] M. Jastroch, A. S. Divakaruni, S. Mookerjee, J. R. Treberg, and M. D. Brand, "Mitochondrial proton and electron leaks," *Essays Biochem.*, vol. 47, pp. 53–67, 2010.
- [109] B. Maro, M. C. Marty, and M. Bornens, "In vivo and in vitro effects of the mitochondrial uncoupler FCCP on microtubules.," *EMBO J.*, vol. 1, no. 11, pp. 1347–1352, 1982.
- [110] J. Hamel, "A review of acute cyanide poisoning with a treatment update," *Crit. Care Nurse*, vol. 31, no. 1, pp. 72–82, 2011.
- [111] A. 489 Bauer, K. Sy, J., and Lipmann, F. (1973) *Fed. Proc.* 32, "THE MECHANISM OF ACTION OF THE RESPIRATORY INHIBITOR, ANTIMYCIN," vol. 21, no. July, pp. 1154–1157, 1973.
- [112] C. Porter *et al.*, "Human and Mouse Brown Adipose Tissue Mitochondria Have Comparable UCP1 Function," *Cell Metab.*, vol. 24, no. 2, pp. 246–255, 2016.
- [113] M. H. Jang, N. H. Kang, S. Mukherjee, and J. W. Yun, "Theobromine, a Methylxanthine in Cocoa Bean, Stimulates Thermogenesis by Inducing White Fat Browning and Activating Brown Adipocytes," *Biotechnol. Bioprocess Eng.*, vol. 23, no. 6, pp. 617–626, 2018.
- [114] A. M. Neyrinck, L. B. Bindels, L. Geurts, M. Van Hul, P. D. Cani, and N. M. Delzenne, "A polyphenolic extract from green tea leaves activates fat browning in high-fat-diet-induced obese mice," *J. Nutr. Biochem.*, vol. 49, pp. 15–21, 2017.
- [115] S. Ceballos *et al.*, "Immunometabolic regulation by triterpenes of *Eucalyptus tereticornis* in adipose tissue cell line models," *Phytomedicine*, vol. 50, pp. 109–117,

2018.

- [116] F. J. Ruiz-Ojeda, A. I. Rupérez, C. Gomez-Llorente, A. Gil, and C. M. Aguilera, "Cell models and their application for studying adipogenic differentiation in relation to obesity: A review," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 17, no. 7, pp. 1–26, 2016.
- [117] A. W. James, "Review of Signaling Pathways Governing MSC Osteogenic and Adipogenic Differentiation," *Scientifica (Cairo)*, vol. 2013, pp. 1–17, 2013.
- [118] K. V. Tormos *et al.*, "Mitochondrial complex III ROS regulate adipocyte differentiation," *Cell Metab.*, vol. 14, no. 4, pp. 537–544, 2011.
- [119] B. R. Imhoff and J. M. Hansen, "Extracellular redox environments regulate adipocyte differentiation," *Differentiation*, vol. 80, no. 1, pp. 31–39, 2010.
- [120] A. Wagatsuma and K. Sakuma, "Mitochondria as a potential regulator of myogenesis," *Sci. World J.*, vol. 2013, 2013.
- [121] D. P. Kelly and R. C. Scarpulla, "Transcriptional regulatory circuits controlling mitochondrial biogenesis and function," *Genes Dev.*, vol. 18, no. 4, pp. 357–368, 2004.
- [122] S. C. Leary *et al.*, "Chronic treatment with azide in situ leads to an irreversible loss of cytochrome c oxidase activity via holoenzyme dissociation," *J. Biol. Chem.*, vol. 277, no. 13, pp. 11321–11328, 2002.
- [123] Z. Tan *et al.*, "Pyruvate Dehydrogenase Kinase 1 Participates in Macrophage Polarization via Regulating Glucose Metabolism," *J. Immunol.*, vol. 194, no. 12, pp. 6082–6089, 2015.
- [124] R. Monteiro and I. Azevedo, "Chronic inflammation in obesity and the metabolic syndrome," *Mediators Inflamm.*, vol. 2010, no. Atp lii, 2010.
- [125] J. Jo *et al.*, "Hypertrophy and/or hyperplasia: Dynamics of adipose tissue growth," *PLoS Comput. Biol.*, vol. 5, no. 3, 2009.
- [126] T. Tzanavari, P. Giannogonas, and K. P. Karalis, "TNF- α and obesity," *Curr. Dir. Autoimmun.*, vol. 11, pp. 145–156, 2010.
- [127] W. Xue, Z. Fan, L. Li, J. Lu, Y. Zhai, and J. Zhao, "The chemokine system and its role in obesity," *J. Cell. Physiol.*, vol. 234, no. 4, pp. 3336–3346, 2019.
- [128] A. B. Engin and A. Engin, "Obesity and Lipotoxicity," vol. 960, 2017.
- [129] Y. H. Yu and H. Zhu, "Chronological changes in metabolism and functions of cultured adipocytes: A hypothesis for cell aging in mature adipocytes," *Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab.*, vol. 286, no. 3, pp. 402–411, 2004.
- [130] L. Wilson-fritch *et al.*, "Mitochondrial Biogenesis and Remodeling during Adipogenesis and in Response to the Insulin Sensitizer Rosiglitazone," *Mol. cellular Biol.*, vol. 23, no. 3, pp. 1085–1094, 2003.
- [131] N. (Universidad de las I. B. Frau Cañellas, "Estudio de los aspectos básicos de la función mitocondrial en tejido aórtico de ratas macho obesas," 2012.
- [132] B. P. Dranka, B. G. Hill, and V. M. Darley-Usmar, "Mitochondrial reserve capacity in endothelial cells: The impact of nitric oxide and reactive oxygen species," *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 48, no. 7, pp. 905–914, 2010.
- [133] S. Nakayama and J. F. Clark, "Smooth muscle and NMR review: An overview of smooth muscle metabolism," *Mol. Cell. Biochem.*, vol. 244, no. 1–2, pp. 17–30, 2003.

- [134] H. Li *et al.*, *Synthesis, structure activity relationship and in vitro anti-influenza virus activity of novel polyphenol-pentacyclic triterpene conjugates*, vol. 163. Elsevier Masson SAS, 2019.
- [135] B. E. Sansbury, S. P. Jones, D. W. Riggs, V. M. Darley-USmar, and B. G. Hill, "Bioenergetic function in cardiovascular cells: The importance of the reserve capacity and its biological regulation," *Chem. Biol. Interact.*, vol. 191, no. 1–3, pp. 288–295, 2011.
- [136] B. G. Hill, B. P. Dranka, L. Zou, J. C. Chatham, and V. M. Darley-USmar, "Importance of the bioenergetic reserve capacity in response to cardiomyocyte stress induced by 4-hydroxynonenal," *Biochem. J.*, vol. 424, no. 1, pp. 99–107, 2009.
- [137] B. K. Chacko, D. Zhi, V. M. Darley-USmar, and T. Mitchell, "The Bioenergetic Health Index is a sensitive measure of oxidative stress in human monocytes," *Redox Biol.*, vol. 8, pp. 43–50, 2016.
- [138] B. K. Chacko *et al.*, "The Bioenergetic Health Index: a new concept in mitochondrial translational research.," *Clin. Sci. (Lond.)*, vol. 127, no. 6, pp. 367–373, 2014.
- [139] H. D. Grahame, "AMPK: A target for drugs and natural products with effects on both diabetes and cancer," *Diabetes*, vol. 62, no. 7, pp. 2164–2172, 2013.
- [140] T. J. Iseli *et al.*, "Activation of AMPK by Bitter Melon Triterpenoids Involves CaMKK β ," *PLoS One*, vol. 8, no. 4, pp. 1–9, 2013.
- [141] X. Wang *et al.*, "Oleanolic acid improves hepatic insulin resistance via antioxidant, hypolipidemic and anti-inflammatory effects," *Mol. Cell. Endocrinol.*, vol. 376, no. 1–2, pp. 70–80, 2013.
- [142] X. Wang *et al.*, "Antioxidant activities of oleanolic acid in vitro: Possible role of Nrf2 and MAP kinases," *Chem. Biol. Interact.*, vol. 184, no. 3, pp. 328–337, 2010.
- [143] J. Liobikas *et al.*, "Uncoupling and antioxidant effects of ursolic acid in isolated rat heart mitochondria," *J. Nat. Prod.*, vol. 74, no. 7, pp. 1640–1644, 2011.
- [144] X. Fan *et al.*, "Induction of apoptosis by an oleanolic acid derivative in SMMC-7721 human hepatocellular carcinoma cells is associated with mitochondrial dysfunction," *Oncol. Lett.*, vol. 15, no. 3, pp. 2821–2828, 2018.
- [145] J. Z. Shan, Y. Y. Xuan, S. Q. Ruan, and M. Sun, "Proliferation-inhibiting and apoptosis-inducing effects of ursolic acid and oleanolic acid on multi-drug resistance cancer cells in vitro," *Chin. J. Integr. Med.*, vol. 17, no. 8, pp. 607–611, 2011.