



Universidad de Concepción
Facultad Farmacia

**ANALISIS DE LA RELACIÓN ENTRE LA DISMINUCIÓN
DE PESO Y EL PATRÓN DE EXPRESIÓN PROTEICA DE
PPAR γ , UCP1 Y LEPTINA EN TEJIDO ADIPOSEO
BLANCO, EN UN MODELO MURINO OBESO
SUPLEMENTADO CON ACEITE DE SEMILLA DE *PINUS
RADIATA***

POR FELIPE ANDRÉS WERNEKINCK MASQUIARÁN

Tesis presentada en la Facultad de Farmacia de la Universidad de Concepción
para optar al título profesional de Bioquímico

Profesor guía/Profesor patrocinante: Dr. Daniel Durán Sandoval
Departamento de Bioquímica Clínica e Inmunología
Facultad de Farmacia
Universidad de Concepción

Mayo, 2022

Concepción, Chile

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento.

TABLA DE CONTENIDOS

TABLA DE CONTENIDOS.....	III
INDICE DE ILUSTRACIONES	IV
RESUMEN	V
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Generalidades de la obesidad	1
1.2. Tratamientos	8
1.3. Tratamiento alternativo: Aceite de Pino.....	10
1.4. Antecedentes con Aceite de semilla de <i>Pinus radiata</i>	13
2. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN.....	16
3. PREGUNTA DE INVESTIGACION.....	17
4. HIPÓTESIS	18
5. OBJETIVO GENERAL.....	19
6. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
7. MATERIALES Y MÉTODOS	20
7.1. Tejidos murinos	20
7.2. Cultivo y diferenciación de células 3T3-L1	20
7.3. Purificación de proteínas	21
7.4. Cuantificación de proteínas	23
7.5. Westernblot	23
7.5.1. Eletroforesis	23
7.5.2. Transferencia	24
7.5.3. Inmunodetección	24
7.6. Cuantificación densitométrica de bandas	24
7.7. Análisis Proteómico	24
7.8. Análisis estadístico	26
8. CARTA GANTT	27
9. BIBLIOGRAFÍA.....	28
10. JUSTIFICACIÓN DE RECURSOS SOLICITADOS	33
10.1. Personal Técnico.....	33
10.2. Personal de Apoyo	33
10.3. Becas para Tesistas/Memoristas	33
10.4. Viajes al extranjero	34
10.5. Viajes nacionales	34
10.6. Gastos de operación general	35
10.7. Equipamiento	37
10.8. Infraestructura y mobiliario	37
11. RECURSOS DISPONIBLES	38
12. ANEXO	39
12.1. Procedimientos de tratamientos de desechos biológicos y/o químicos.	39

INDICE DE ILUSTRACIONES

Figura 1. Infiltración de las células del sistema inmune y de la señalización asociada a la inflamación del tejido adiposo blanco en sujetos delgados y obesos	5
Figura 2. Mecanismo de acción PPAR.....	7

RESUMEN

La obesidad es una enfermedad que se ha convertido en un problema de salud pública en países desarrollados como en países en desarrollo. En la población chilena, las cifras son alarmantes teniendo en cuenta la última Encuesta Nacional de Salud 2016-17 (ENS), en donde se produjo un incremento en la tasa de obesidad con respecto a la última ENS 2009-10. Actualmente, la incidencia de esta enfermedad en la población chilena es de alrededor de un 31.2%, lo cual causa gran preocupación debido a las comorbilidades asociadas a la obesidad.

Existen diferentes maneras de afrontar la obesidad, en una primera instancia se opta generalmente por realizar un cambio en el estilo de vida de la persona, llevando a cabo una alimentación saludable y un aumento en la actividad física. Sin embargo, esto no siempre se puede llevar a cabo, por lo cual existen diferentes alternativas, como son los tratamientos farmacológicos, tanto para tratar la obesidad en si como también, las comorbilidades asociadas. En esa misma línea, otra estrategia terapéutica son las quirúrgicas asociadas a la cirugía bariátrica, como son el Bypass Gástrico, la Gastrectomía Vertical y la Banda Gastrica Ajustable, siendo las dos primeras las más realizadas en nuestro país (Maluenda *et al.*, 2012).

Dentro de estas alternativas dirigidas al tratamiento de la obesidad existe también la suplementación de comidas con ácidos grasos poliinsaturados

(PUFAs) encontrados en aceites naturales, que han demostrado tener diversos efectos beneficiosos en el contexto de la obesidad. Dentro de estos aceites se encuentra el Aceite de *Pinus koraiensis*, que contiene alrededor de un 15% de Ácido Pinolénico, al cual se le han atribuido efectos benéficos en el metabolismo lipídico de modelos murinos. Sin embargo, se desconoce el mecanismo molecular por el cual este ácido graso lleva a cabo su acción.

En Chile, el aceite de semilla de *Pinus radiata* posee alto porcentaje de Ácido Pinolénico en comparación a otras pináceas. Estudios han demostrado que la suplementación con este aceite natural en un modelo murino de obesidad inducido por dieta, provoca una disminución en la ganancia de peso e induce un aumento en la expresión génica de PPAR γ y UCP1 en tejido adiposo blanco. Así, la presente propuesta plantea demostrar si el tratamiento con este aceite regula la expresión de estas proteínas en un modelo *in vitro* de tejido adiposo. En este contexto, se propone realizar un estudio proteómico por espectrometría de masa asociado a cromatografía líquida para identificar las proteínas del tejido adiposo involucradas en este proceso.

Finalmente, se analizará la correlación entre la expresión de proteínas reguladas por el aceite de semilla de *Pinus radiata* con la disminución de peso observada *in vivo* bajo este tratamiento.

INTRODUCCIÓN

1.1. Generalidades de la obesidad

La obesidad y el sobrepeso se definen como una acumulación anormal o excesiva de grasa, producto de un desequilibrio entre la ingesta de alimentos y el gasto energético de una persona, que puede ser perjudicial para la salud (FAO & OPS, 2017). Esta es una enfermedad multifactorial y poligénica que se ha convertido en un problema de salud pública tanto en países desarrollados como en países en desarrollo (Macedo y Calder, 2018).

Según las últimas cifras, 24 países de América Latina y el Caribe presentan una proporción de personas obesas en valores cercanos o superiores al 20% de la población. En Chile, según la última Encuesta Nacional de Salud (ENS) se determinó que alrededor del 74% de la población se encuentra con problemas peso, donde un 39.8% corresponde a personas con sobrepeso, 31.2% a personas obesas y 3.2% a personas con obesidad mórbida, siendo la obesidad la cifra más alarmante debido a su aumento respecto a la última ENS realizada el año 2009-10. Es por esto que Chile es uno de los países con mayor tasa de obesidad en América Latina (ENS, 2017).

Es importante recalcar que las personas con obesidad significan un gran gasto económico para el estado de Chile, teniendo en cuenta las estimaciones

realizadas por Cuadrado y colaboradores en 2016, quienes concluyeron que en el período 2010-2030 los costos promedios ascienden a 455 mil millones de pesos anuales del gasto total en salud, los cuales son atribuibles a costos directos para el tratamiento de la obesidad y de enfermedades cardiovasculares asociadas a esta. Esto implica que el 2.4% del gasto total en salud del año 2016 podría aumentar a un 3.9% en el año 2030. Esta estimación es sin contar los costos indirectos producto de la obesidad en términos de pérdidas de productividad. Además de eso, se estima que alrededor de 14.780 personas mueren al año producto del sobrepeso y la obesidad (Cuadrado, 2016).

Las personas con obesidad tienen un mayor riesgo de desarrollar diferentes comorbilidades, como lo son enfermedades cardiovasculares, trastornos gastrointestinales, diabetes mellitus tipo 2 (DM2), trastornos articulares y musculares, hipertensión, problemas respiratorios e incluso problemas psicológicos. Todo esto se asocia con muchos desordenes metabólicos que afectan a distintos órganos como son el páncreas, el hígado, el intestino, entre otros. (Fruh S. M., 2017; Cefalu WT, 2015). Además, se pueden desarrollar otras patologías como la desregulación metabólica del tejido adiposo, del hígado y del músculo esquelético, conduciendo a distintos problemas de salud, como la resistencia a la insulina, la aterosclerosis, el síndrome metabólico, entre otras enfermedades que son las principales causas de morbilidad en personas obesas (Rina Yu *et al.*, 2012).

Es de gran importancia en este sentido, el papel que juega el tejido adiposo como un regulador clave del balance energético y del almacenamiento de lípidos, además de la gran síntesis de productos endocrinos que podrían estar relacionados directamente con las patologías asociadas a la obesidad. Dentro del tejido adiposo se pueden diferenciar dos tipos: el tejido adiposo blanco, que es importante en la reserva de energía, y el tejido adiposo pardo, que acumula lípidos para termogénesis inducida por frío. La función endocrina del tejido adiposo y su capacidad de almacenar lípidos está estrechamente relacionada con la localización de los depósitos de grasa y la morfología de los adipocitos. En este sentido, los adipocitos epiploicos y mesentéricos son endocrinológicamente más activos que los adipocitos ubicados en el tejido adiposo subcutáneo. En el marco de la obesidad, a medida que una persona desarrolla sobrepeso producto de un estilo de vida obesogénico, el tejido adiposo se vuelve disfuncional y son los adipocitos viscerales los que se ven mayormente afectados (Sharma y Staels, 2007, Wajchenberg *et al.* 2000, Lewis *et al.* 2002).

Dentro de las adipoquinas secretadas por el tejido adiposo encontramos la leptina y la adiponectina, que están directamente relacionadas con la regulación de la sensibilidad a la insulina en todo el cuerpo. Es por esto que una desregulación en el tejido adiposo podría llevar al desarrollo de resistencia a la insulina y síndrome metabólico (Christodoulides y Vidal-Puig, 2009). Es necesario poner énfasis en la leptina, la cual es una hormona de naturaleza peptídica que es secretada a la sangre por diferentes estructuras y órganos,

dentro de los cuales se puede recalcar el tejido adiposo blanco, siendo a nivel del tejido adiposo subcutáneo donde resulta mayor la producción de leptina (Kershaw *et al.*, 2004). Los adipocitos secretan leptina en proporción directa a la masa de tejido adiposo. Esta hormona, junto con otras moléculas regulatorias tienen un rol central en el control del apetito y peso corporal, induciendo factores anorexígenos y suprimiendo neuropéptidos orexígenos en el hipotálamo (González *et al.*, 2010; Vera *et al.*, 2018).

Por otro lado, el músculo esquelético podría tener un papel importante en la predicción de la sensibilidad a la insulina, debido a la capacidad oxidativa muscular, específicamente en la capacidad del músculo para oxidar ácidos grasos. Distintos grupos de investigadores han demostrado que el contenido y la función mitocondrial y la capacidad oxidativa se ven reducidas en personas obesas con resistencia a la insulina, DM2 o ambas, por lo que esto podría jugar un papel importante en el desarrollo de la resistencia a la insulina (Turcotte LP, 2008).

En el contexto de la obesidad, se generan alteraciones en la morfología de los adipocitos y en la actividad metabólica. Bajo estas condiciones, la obesidad está asociada a una infiltración del tejido adiposo por parte de macrófagos, lo cual conlleva a una disfunción endocrina y metabólica, que puede conducir a la insulino resistencia y a enfermedades cardiovasculares (Sharma y Staels, 2007). En este sentido, se produce un microambiente pro-inflamatorio en el tejido

adiposo, como se muestra en la Figura 1, el cual estaría relacionado con la alteración de su función metabólica, por lo que habría un cambio en la secreción de citoquinas y hormonas que afectarían a los procesos de lipogénesis y lipólisis (Lee BC, 2014).

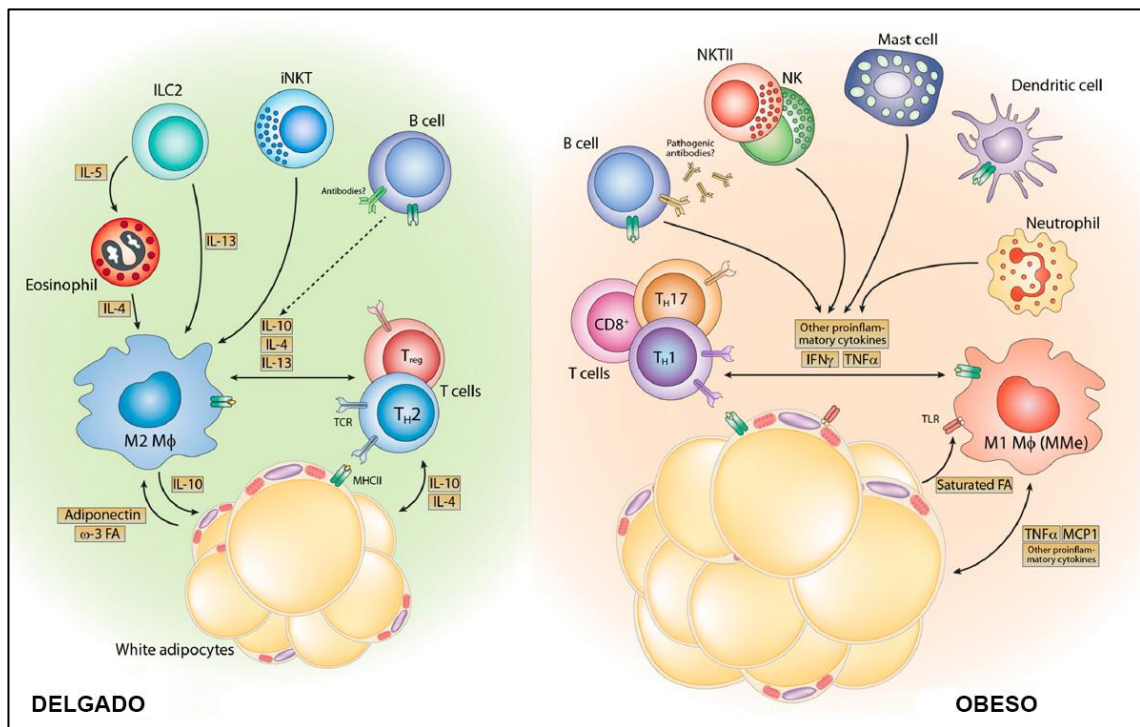


Figura 1. Infiltración de las células del sistema inmune y de la señalización asociada a la inflamación del tejido adiposo blanco en sujetos delgados y obesos (Villarroya F. *et al.*, 2018)

Los PPARs (Receptores Activados por Proliferadores Peroxisomales) son una familia de receptores nucleares que unen ligandos naturales o sintéticos, dentro

de los cuales se incluyen los ácidos grasos. Estos participan en la regulación de la expresión de genes específicos a través de un mecanismo que es común a los miembros de la superfamilia de receptores nucleares. La unión del ligando a PPAR resulta en la activación de éste como factor transcripcional. El receptor dimeriza y forma un heterodímero con el receptor X retinoide (RXR). El receptor activado se une a secuencias de ADN específicas (PPAR Response Element; PPRE) y promueve la transcripción de genes determinados, como se esquematiza en la Figura 2. Dentro de las isoformas que se conocen de este receptor están PPAR α , PPAR γ y PPAR β/δ , donde los 3 se encuentran relacionados con el metabolismo lipídico. La activación de PPAR α estimula la oxidación de los ácidos grasos en tejidos que se caracterizan por su alta utilización de ácidos grasos como sustratos energéticos. PPAR β/δ regula la expresión de genes implicados en el metabolismo lipídico y la homeostasis de la glucosa, así como la inflamación (Vázquez-Carrera *et al.*, 2016). Igualmente, PPAR γ se encuentra altamente expresado en el tejido adiposo blanco, tejido adiposo pardo, intestino grueso y macrófagos. Se describe que regula la diferenciación de las células precursoras de los adipocitos y favorece la acumulación de triglicéridos en el tejido adiposo blanco, por ende, se encuentra asociado a la regulación del metabolismo lipídico y de carbohidratos (Christodoulides y Vidal-Puig, 2009; Uauy *et al.*, 2000; Adams M., 1997).

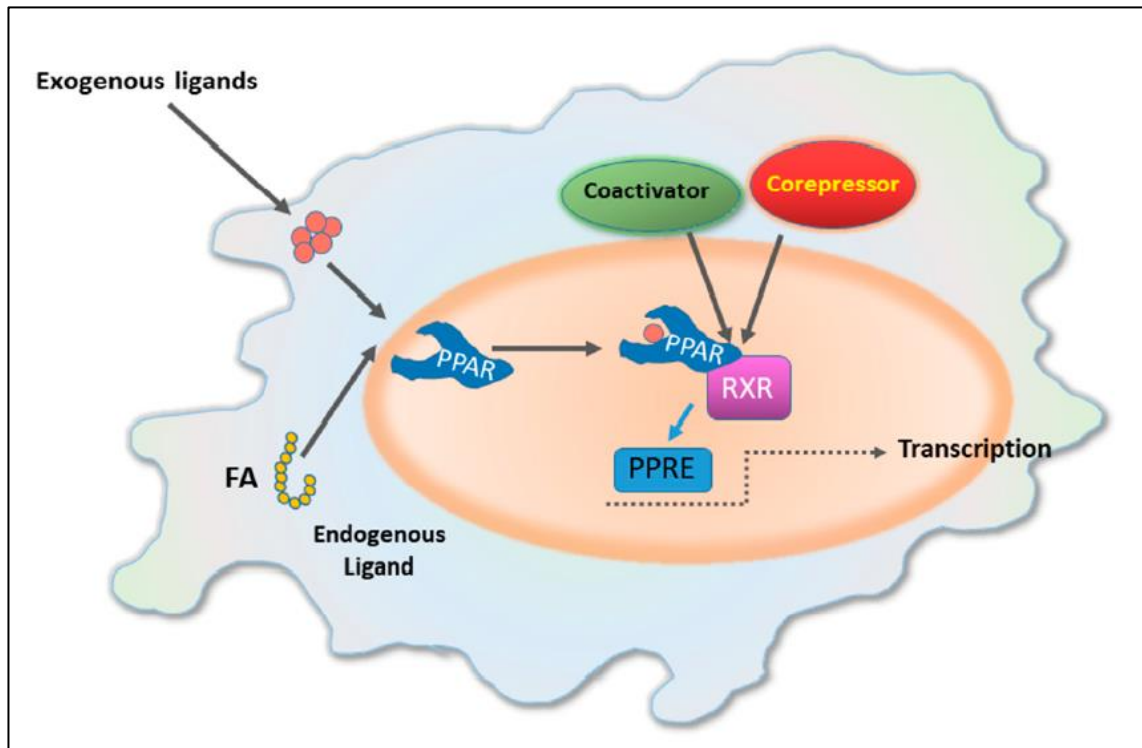


Figura 2. Mecanismo de acción de PPAR (Christofides A. *et al.*, 2021)

Por otro lado, las proteínas desacoplates (Uncoupling Proteins; UCPs) son transportadores mitocondriales presentes en la membrana interna de las mitocondrias. Se encuentran en todos los mamíferos y en las plantas. Pertenecen a la familia de transportadores mitocondriales de aniones. El término "proteína desacoplante" se usó originalmente para la proteína UCP1, que está presente de manera única en las mitocondrias de los adipocitos en el tejido adiposo pardo, las células termogénicas que mantienen la temperatura corporal. En estas células, UCP1 actúa como un transportador de protones que puede ser

activado por ácidos grasos libres. La activación de UCP1 mejora la respiración mitocondrial al producirse un desacoplamiento de la cadena respiratoria (Rousset S, 2004). En este contexto, a pesar de que anteriormente se creía que el tejido adiposo pardo solo se encontraba en los recién nacidos, en los últimos años se ha encontrado evidencia de que también se puede encontrar tejido adiposo pardo activo en humanos adultos (Nedergaard, 2007). Se han realizado diferentes investigaciones, en que se evidencia la existencia de agentes “empardizantes” del tejido adiposo, lo cual estaría relacionado a la disminución de peso, menor resistencia a la insulina y mayor tolerancia a la glucosa (Cannon and Nedergaard, 2009).

1.2. Tratamientos

Teniendo en cuenta que las personas obesas tienen un perfil lipídico generalmente alterado, se hace énfasis en una primera instancia al tratamiento no farmacológico, que incluye una alimentación sana, equilibrada y realización de ejercicio físico, es decir, un cambio en el estilo de vida. Sin embargo, a pesar de que esto es lo más recomendado, las personas no siempre pueden adaptarse a estos cambios, por lo que muchas personas no siguen las recomendaciones y fallan en el tratamiento.

Desde otro ángulo, el tratamiento farmacológico es una alternativa para el manejo de las múltiples alteraciones clínicas que se producen en una persona obesa. Al respecto, enfocado en mantener el perfil lipídico dentro de los

parámetros normales se tienen como alternativas a las Estatinas que, actuando como inhibidores competitivos de la enzima HMG-CoA reductasa, son útiles para el caso de sujetos con hipercolesterolemia. En este mismo sentido, también se utiliza el Ezetimibe, molécula que actúa como un inhibidor selectivo de la absorción intestinal de colesterol. Otra alternativa es el uso de las resinas de intercambio iónico (Ej. Colesevelam), que forman complejos insolubles con los ácidos biliares en el lumen intestinal, disminuyendo su circulación enterohepática y, con ello, incrementando la conversión de colesterol a ácidos biliares a nivel hepático, favoreciendo la disminución de colesterol a nivel circulatorio. Por su parte están los inhibidores de la PCSK-9, anticuerpos monoclonales que inhiben la función de esta enzima y evitan la degradación intracelular del receptor de LDL (LDLR) (MINSAL, 2018).

En el caso de una hipertrigliceridemia se utilizan estatinas, ya que se ha demostrado que pueden reducir los triglicéridos en un 30%. Los Fibratos, que es otra familia de medicamentos, actúan como agonistas de PPAR α aumentando la expresión de Lipoproteinlipasa (LpL) y reduciendo la síntesis de apo C-III, lo que favorece la hidrólisis vascular de triglicéridos (Arteaga A MA *et al.*, 2016). Los ácidos Grasos omega-3, también son utilizados para el tratamiento de la hipertrigliceridemia, aunque su mecanismo de acción es más heterogéneo actuando por diferentes vías moleculares (Reiner Z *et al.*, 2011)

El tratamiento farmacológico también puede estar asociado directamente a la disminución de peso, para lo cual existen una variedad de fármacos como: Orlistat, que actúa como un inhibidor de la lipasa gástrica y pancreática, disminuyendo hasta en un 30% la absorción de grasas; Fentermina, que actúa como un supresor del apetito a nivel del sistema nervioso central; Lorcaserina, que actúa como agonista selectivo del receptor de serotonina 2C (5-HT_{2C}), el cual reduce el peso corporal al provocar sensación de saciedad y por ende, reducción en la ingesta de alimentos (Kang y Park, 2012). Estos son algunos fármacos que se utilizan para tratar la obesidad a largo y corto plazo, sin embargo, la farmacoterapia ha estado llena de contratiempos y dilemas asociados a la seguridad, eficacia, abuso y efectos adversos que estos pueden provocar (Álvarez V., 2012). No obstante, existen otras terapias como es la suplementación de las comidas con ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs), los cuales se ha demostrado que mejoran la sensibilidad a la insulina, reducen los triglicéridos e incrementan el colesterol HDL en el plasma (Zhao *et al.*, 2004). Se ha establecido que los PUFAs son agonistas de PPAR α y que sería la activación de este receptor nuclear lo que tendría como efecto el incremento de la oxidación lipídica tisular y una disminución de la síntesis de lípidos (Rina Yu *et al.*, 2012).

1.3. Tratamiento alternativo: Aceite de Pino

Existen diversos aceites naturales comestibles, los cuales son abundantes en PUFAs, entre los cuales encontramos el aceite de girasol, aceite de soja, aceite

de linaza, aceite de pino, entre otros. Cobra importancia en este caso el aceite obtenido de la semilla del *Pinus koraiensis* (Pinus nut oil; PNO), el cual contiene diversos ácidos grasos, dentro de los cuales se encuentra el ácido pinolénico (PNLA) en hasta un 15% (Park *et al.*, 2013). Diversos estudios han demostrado que el aceite de la semilla de Pino coreano posee efectos beneficiosos en el metabolismo lipídico, disminuyendo los niveles de triglicéridos y colesterol en la sangre, disminuye la ganancia de peso, ayuda en el control del apetito y en algunas enfermedades como la hipertensión, la esteatosis hepática, la aterogénesis y la DM2 (Rina Yu *et al.*, 2012).

Dentro de estos estudios está el de Phasman (Phasman *et al.* 2008), en el cual se comparó la secreción *in vitro* inducida por diferentes ácidos grasos de Colecistoquinina (CCK), en particular CCK-8, en células SCT-1 que es un modelo de células secretoras intestinales. Se observó que comparativamente el aceite de semilla de pino coreano inducía una fuerte secreción de CCK-8 frente al efecto observado por otros ácidos grasos. En este mismo estudio, también se evaluó el efecto de la ingesta de una capsula de 3g de aceite de semilla de pino coreano en 18 mujeres en edad post menopáusica con sobrepeso. Los resultados indicaron que la secreción de CCK y GLP-1 se vieron aumentadas en comparación a los placebos de aceite de oliva. Así, este estudio sugiere que el consumo de aceite de semilla de pino coreano puede funcionar como un supresor del apetito al aumentar hormonas que provocan saciedad y reducir las ganas de comer. Es importante recalcar que la CCK es una hormona producida

por el duodeno que se encarga de suprimir el apetito en respuesta a los ácidos grasos o proteínas. Así mismo, GLP-1 es producida por el íleon y también funciona como un supresor del apetito en respuesta a ácidos grasos y carbohidratos (Phasman *et al.* 2008; Halford *et al.*, 2008)

Dentro de otros estudios realizados acerca de los efectos *in vivo* del aceite de pino coreano, se puede mencionar el realizado por Rina Yu, que determinó que con una dieta alta en grasas (High Fat Diet; HFD) suplementado con un 30% de PNO se ganaba significativamente menos peso que con una dieta similar suplementada con un 30% de aceite de soja (Rina Yu *et al.*, 2012). En el mismo estudio se demostró que bajo la dieta HFD-PNO la acumulación de triglicéridos en el tejido intramuscular era significativamente menor que en una HFD con aceite de soja. Teniendo en cuenta que la única gran diferencia entre la composición del aceite de soja y el aceite de pino es que este último contiene un 15% de ácido de pinolénico, se sugiere que este ácido graso sería el responsable de los efectos metabólicos observados en este modelo.

Por otra parte, se determinó que el PNO alteraba la oxidación de los ácidos grasos en el músculo esquelético de ratones bajo una HFD, observando una regulación positiva de ciertos genes involucrados en el metabolismo oxidativo de los ácidos grasos, en el transporte de acyl-CoA a las mitocondrias y en la β -oxidación de ácidos grasos en la mitocondria, entre ellos: *ppara*, *cpt1b* (Carnitine Palmitoyltransferase 1b), *cpt2* (Carnitine Palmitoyltransferase 2), *acadm* (Acyl-

CoA Dehydrogenase Medium Chain) y acadl (Acyl-CoA Dehydrogenase Long Chain), sugiriendo que la reducción de la acumulación de grasa intramuscular asociada a PNO provoca una mayor oxidación de ácidos grasos y una mayor biogénesis y función mitocondrial en el músculo esquelético (Rina Yu *et al.*, 2012).

Los antecedentes en el mismo estudio sugieren que PNO podría regular de manera positiva la expresión génica de *ucp1* (Rina Yu *et al.*, 2012) el cual, como se mencionó previamente, es un gen que codifica para una proteína clave en el proceso de termogénesis, con el que se puede disipar la energía química en forma de calor (Cannon and Nedergaard, 2004). De igual manera hubo evidencias que PNO podía regular de manera positiva la transcripción de $PPAR\alpha/\delta$ y su co-activador $PGC-1\alpha$, los cuales están involucrados en el metabolismo oxidativo tanto en el músculo esquelético como en el tejido adiposo pardo (Rina Yu *et al.*, 2012).

1.4. Antecedentes con Aceite de semilla de *Pinus radiata*

Es importante mencionar el estudio realizado en el marco del proyecto FONDEF D 11i1067, donde se analizó *in vivo* la modificación de la ganancia de peso en un modelo murino de obesidad inducido por una dieta alta en grasas, utilizando un suplemento a base de semillas de *Pinus radiata* (SupD) y comparándolo con

el suplemento comercial Pinnothin® a base de aceite de pino coreano. Los resultados fueron totalmente favorables hacia el SupD, observando una disminución mayor en la ganancia de peso, disminución de IMC y disminución en el porcentaje de tejido adiposo visceral en comparación con el suplemento Pinnothin®, además de asociarse a una mayor tolerancia a la glucosa y respuesta sistémica a la insulina (Becerra, 2015).

A partir de este mismo estudio, se determinó que la administración de una dieta enriquecida con SupD, incrementó la expresión génica de *pparg* y *ucp1* en el tejido adiposo blanco. Además, al analizar la dispersión de tamaño de los adipocitos, se observó una alta frecuencia de adipocitos de menor tamaño en comparación con los controles, agrupándose en nichos de adipocitos pequeños, lo cual estaría relacionado a la disminución de la masa de parches adipocitarios. De igual manera, se determinó que el suplemento SupD ejercería un efecto positivo sobre la proliferación y diferenciación de preadipocitos residentes en el tejido adiposo blanco, al encontrar marcajes específicos en estos nichos de adipocitos pequeños, esto debido a que el crecimiento hiperplásico puede ejercer efectos metabólicamente beneficiosos, en comparación a los efectos de un crecimiento hipertrófico de los adipocitos y la posterior insulinoresistencia (Choe SS *et al.*, 2016). En el contexto de la obesidad el ambiente que rodea a los adipocitos es de tipo proinflamatorio, encontrándose una infiltración celular mayoritariamente polarizada hacia macrófagos M1 (Lauterbach y Wunderlich, 2017). Sin embargo, en este estudio se pudo determinar que la infiltración celular

encontrada en el tejido adiposo era en mayor parte de macrófagos polarizados hacia M2, es decir, con un perfil antiinflamatorio (Daniela Rojas *et al.*, 2018).

Lo anteriormente descrito en este estudio, se correlaciona positivamente con el enriquecimiento del tejido adiposo con PNLA tras la suplementación oral crónica, ácido graso al cual se le atribuyen los efectos benéficos de este aceite. Lo cual también fue descrito en la tesis de pregrado de Alexander Orellana, donde se logró identificar el enriquecimiento *in vivo* con PNLA del tejido adiposo visceral y subcutáneo, hígado, músculo esquelético y duodeno, desde animales bajo dieta suplementada con SupD (Orellana, 2021). Estos antecedentes permiten sugerir que la presencia de PNLA en el tejido adiposo podría estar relacionada a los efectos metabólicos anteriormente descritos que ocurren con la administración del SupD.

En base a toda esta información, resulta interesante estudiar si el aceite extraído desde semillas de *Pinus radiata*, especie arbórea altamente distribuida en nuestra zona, estimula mecanismos de regulación similares a los descritos para *Pinus koraiensis*; Determinar qué rutas del metabolismo se ven reguladas con la ingesta de este aceite; comparar y cuantificar, mediante análisis proteómico el tejido adiposo; qué proteínas participan en el mecanismo de acción del aceite de *Pinus radiata*. Bajo esta misma perspectiva, analizar si el aumento de la expresión génica de PPAR γ , Leptina y UCP1 se ve reflejada en la expresión de estas proteínas en tejido adiposo blanco.

PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

Se desconoce si la disminución de peso asociada a la suplementación dietaria *in vivo* con aceite de semillas de *Pinus radiata*, en un modelo murino de obesidad inducido por dieta, se correlaciona con la modificación del patrón de expresión proteica de PPAR γ , UCP1 y Leptina en tejido adiposo blanco y si este efecto es mediado por Ácido pinolénico.

PREGUNTA DE INVESTIGACION

¿Es la disminución de peso observada en un modelo murino de obesidad inducida por dieta bajo una suplementación dietaria con aceite de semillas de *Pinus radiata*, producida por una modificación de la expresión proteica de PPAR γ , UCP1, Leptina u otras proteínas en tejido adiposo mediado por Ácido pinolénico?

HIPÓTESIS

La suplementación oral crónica con aceite de semillas de *Pinus radiata* induce un aumento en la expresión proteica de PPAR γ , UCP1, Leptina u otras proteínas en tejido adiposo blanco mediada por Ácido pinolénico, lo que se correlaciona positivamente con la disminución de peso observada en un modelo murino de obesidad inducida por dieta.

OBJETIVO GENERAL

Correlacionar el efecto de disminución de peso observado en un modelo murino de obesidad inducido por dieta suplementado con aceite a base de semilla de *Pinus radiata*, con los mecanismos asociados a la modificación del patrón de expresión proteica de PPAR γ , UCP1 y Leptina en tejido adiposo blanco mediados por Ácido pinolénico.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Describir el proteoma de adipocitos suplementados con aceite de semillas de *Pinus radiata* y Ácido pinolénico.
2. Comparar los patrones de expresión proteica *in vivo* de PPAR γ , UCP1 y Leptina desde adipocitos suplementados con aceite de semillas de *Pinus radiata*.
3. Correlacionar los patrones de expresión proteica con parámetros antropométricos.

MATERIALES Y MÉTODOS

7.1. Tejidos murinos

Se utilizará tejido adiposo obtenidos en el marco del Proyecto FONDEF D11i1067 “Obtención de un extracto lipídico con actividad inhibidora del apetito a partir de semillas de gimnospermas introducidas”, almacenado a -80°C obtenidos previamente mediante la disección de ratones hembra *C57BL/6* (n = 35) obesas que fueron alimentadas con una dieta alta en grasa (HFD) suplementada por 4 meses con:

- Grupo 1 (n = 7): sin suplemento.
- Grupo 2 (n = 7): 15% p/p de aceite de Glycine max (soya).
- Grupo 3 (n = 7): 15% p/p de aceite de semilla de *Pinus koraiensis* (Pinnothin®).
- Grupo 4 (n = 7): 15% p/p de aceite de semilla de *Pinus radiata*.
- Grupo 5 (n = 7): 15% p/p de Suplemento D.

7.2. Cultivo y diferenciación de células 3T3-L1

La 3T3-L1 es una línea celular murina que se utiliza ampliamente en la investigación biológica del tejido adiposo. Las células 3T3-L1 tienen una morfología similar a la de los fibroblastos, pero, en condiciones apropiadas, las células se diferencian en un fenotipo similar al de los adipocitos. A este respecto, se utilizará el protocolo de diferenciación propuesto por U545-Institut de Lille,

Francia. En primer lugar, se expandirá el clon celular plaqueando las células 3T3-L1 en DMEM con 10% de Calf Serum (Pan Biotech GMBH). Luego se realizará la diferenciación, se plaquearán las células en DMEM con 10% Fetal Calf Serum (Pan Biotech GMBH), se esperará que las células estén confluentes, posterior a 2 días después de la confluencia se cultivarán 2 días en presencia del cocktail de diferenciación (1 μ M Dexametasona, 0.5 μ M IBMX, 5 μ g/mL Insulina) y se reemplazará el medio por otro suplementado con insulina 5 μ g/mL y 1 μ M Rosiglitazona. Al cabo de 2 días se reemplazará el medio por otro suplementado solamente con 1 μ M Rosiglitazona. Finalmente, se esperará 2 días y se reemplazará el medio por otro suplementado con 1 μ M Rosiglitazona.

7.3. Purificación de proteínas

Se utilizarán los tejidos adiposos obtenidos en el marco del Proyecto FONDEF D11i1067 “Obtención de un extracto lipídico con actividad inhibidora del apetito a partir de semillas de gimnospermas introducidas”. Se aislarán proteínas usando el protocolo TRI (*Sigma Aldrich*, Número Catálogo: T9424). Brevemente, 50-100 mg de tejido serán homogenizados en 0,5 mL de TRI en tubos *Precellys CK14 Lysing Kit*, utilizando 3 ciclos de 20 segundos a 6800 RPM, con pausas de 30 segundos. Posterior a esto, se centrifugará la mezcla obtenida a 12000 RPM por 10 minutos a 4°C, se eliminará la capa de grasa insoluble y se aislará el sobrenadante dejando reposar por 5 minutos a temperatura ambiente.

Seguido, se agregarán 100 μ L de cloroformo, agitando durante 15 segundos y dejando reposar a temperatura ambiente por 15 minutos. Finalmente, se centrifugará a 12000 RPM durante 15 minutos a 4°C, obteniendo una mezcla separada en 3 fases, donde se procederá a trabajar con la fase orgánica. Posterior a esto se seguirá el protocolo del reactivo TRI para "*Protein Isolation*". A la fase orgánica obtenida, se le agregarán 150 μ L de etanol al 99%, agitando durante 5 minutos y dejando reposar posteriormente durante 3 minutos a temperatura ambiente. Luego, se centrifugará a 2000 RPM durante 5 minutos a 4°C, y se guardará el sobrenadante en tubos Eppendorf de 1.5 mL. Posterior a esto, se precipitarán las proteínas resuspendiendo con 750 μ L de isopropanol, dejando reposar la solución a temperatura ambiente por al menos 10 minutos. La solución resultante se centrifugará a 12000 RPM durante 10 minutos a 4°C, descartando el sobrenadante. El pellet obtenido se lavará 3 veces, resuspendiendo con 1 mL de cloruro de guanidinio 0.3M/etanol 95%, dejando las muestras 20 minutos en la solución durante cada lavado. Posterior al lavado, se centrifugará a 7500 RPM por 5 minutos a 4°C y se adicionará 1 mL de etanol al 99%, mezclando en vortex y dejando reposar por 20 minutos a temperatura ambiente. Seguido, se centrifugará a 7500 RPM durante 5 minutos a 4°C y retirará la mayor cantidad de etanol con micropipeta. Posteriormente, se secará el pellet con Nitrógeno y una vez seco se disolverá con 200 μ L de SDS al 1%, dejando en agitación. Finalmente, se centrifugará la solución a 10000 RPM por

10 minutos a 4°C para eliminar cualquier material insoluble. El sobrenadante se guardará a -20°C para posteriormente realizar *westernblot*.

7.4. Cuantificación de proteínas

Se utilizará el protocolo *Pierce BCA Protein Assay Kit* (Thermo Fisher Scientific). Brevemente, 25 µL de diluciones de muestras 1:10 serán mezclados con 200 µL de reactivo de trabajo y dispuestos en pocillos de microplacas (BD Falcon PRO-BIND™) y cuantificados a 562 nm en equipo lector de placas (BioTek® Synergy™ 2). La concentración de proteínas será estimada por interpolación en curva de calibrado de BSA en el rango 20-2000 µg/mL.

7.5. Westernblot

7.5.1. Eletroforesis

En base al protocolo de *westernblot* del Grupo de Investigación en Función Endotelial de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Concepción, se procederá a preparar un gel de poliacrilamida al 12% v/v con pocillos de 1.5 mm. Este estará constituido de un gel separador, compuesto por agua destilada, acril/bisacril (30%/80%), tris 1.5 M pH 8.8, SDS 10% p/v, PSA 20% p/v y TEMED; y por un gel concentrador compuesto por agua destilada, acril/bisacril (30%/80%), tris 0.5 M pH 6.8, SDS 10% p/v, PSA 20% p/v y TEMED. Se prepararán las muestras realizando las respectivas diluciones con SDS 1% p/v y agregando tampón comercial de carga para proteínas (Tampón Laemmli 2X Bio-

Rad) . Finalmente, se realizará la electroforesis en condiciones denaturantes a 100 mV por aproximadamente 100 minutos.

7.5.2. Transferencia

Se realizará la transferencia del gel en cámara húmeda a una membrana de nitrocelulosa o PVDF, a 250 mA con un máximo de 100 mV por aproximadamente 90 minutos.

7.5.3. Inmunodetección

Se realizará el blotting de la membrana haciendo uso de un anticuerpo primario (anti PPAR γ , anti UCP1 y anti leptina) diluido 1:1000 en BSA 1% p/v PBS-Tween (0,05%); y un anticuerpo secundario (anti mouse) diluido 1:2000 en PBS-Tween. Finalmente, se revelará haciendo uso del kit *Pierce® ECL Western Blotting Substrate* (Prod # 32106) y del equipo LI-COR (Modelo: 3600).

7.6. Cuantificación densitométrica de bandas

Para cuantificar las bandas entre los distintos *westernblot*, se hará uso del software *ImageJ* para determinar el grado de sobreexpresión de las distintas proteínas.

7.7. Análisis Proteómico

En este contexto, se realizará un flujo de trabajo *Bottom Up*, en el cual básicamente se utilizará nuevamente el protocolo TRI (*Sigma Aldrich*, Número

Catálogo: T9424) para la purificación de proteínas. Posterior a esto se realizará la separación de las proteínas por medio un SDS-PAGE, siguiendo el protocolo de *westernblot* del Grupo de Investigación en Función Endotelial de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Concepción anteriormente descrito para la electroforesis en gel de poliacrilamida. Luego se realizará una digestión de proteínas desde el gel siguiendo el protocolo del kit *In-Gel Tryptic Digestion* (Thermo Scientific™).

En primer lugar, se realiza una preparación y decoloración de la banda, para lo cual se deberá cortar la banda de proteína de interés, colocar en un tubo receptor de 600 μ L, agregar 200 μ L de solución decolorante (80 mg Bicarbonato de amonio, 20 mL Acetonitrilo y 20 mL Agua ultrapura), incubar la muestra a 37°C durante 30 minutos con agitación, retirar y desechar la solución decolorante, y repetir el proceso.

Posteriormente, se agregará 30 μ L de buffer reductor (3.3 μ L TCEP, 30 μ L Buffer de digestión) y se incubará a 60°C por 10 minutos. Luego, se reemplazará el buffer reductor por el buffer de alquilación (7 μ L Yodoacetamida 5X, 28 μ L Buffer de digestión) y se incubará 1 hora a temperatura ambiente en la oscuridad. Finalizado el tiempo, se retirará el buffer y se lavará dos veces la muestra con 200 μ L de solución decolorante a 37°C por 15 minutos. Finalmente, se realizará el proceso de digestión, para lo cual se agregará a la muestra de gel 50 μ L de acetonitrilo y se incubará por 15 minutos a temperatura ambiente. Seguido a esto, se removerá el acetonitrilo, se dejará secar el gel al aire por 5 a

10 minutos e incubará con 10 μ L de solución de tripsina (cubriendo el gel completamente) a temperatura ambiente por 15 minutos, para posteriormente agregar 25 μ L de buffer de digestión (10 mg Bicarbonato de amonio, 5 mL Agua ultrapura) e incubar a 37°C por 4 horas o a 30°C durante la noche con agitación.

Finalmente, la muestra será separada por cromatografía líquida y posterior a esto se realizará un análisis MS/MS, con la finalidad de identificar las proteínas de interés. La identificación de estas se realizará interpretando los resultados por bioinformática, haciendo uso de las bases de datos de proteínas ya secuenciadas. Por otra parte, se podrá realizar un análisis SILAC con la finalidad de analizar la expresión de proteínas frente a la suplementación de SupD.

7.8. Análisis estadístico

Para la realización del análisis estadístico se hará uso del software GraphPad Prism.

Se analizarán diferencias intergrupos aplicando test ANOVA o Kruskal-Wallis según evaluación de normalidad.

Se evaluará la correlación entre parámetros antropométricos y bioquímicos sanguíneos, y el nivel de expresión de proteínas, utilizando una correlación no paramétrica de Spearman.

CARTA GANTT

Objetivos específicos (Actividad/Meses)	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D	E	M	A	M	J	J	A
1. Describir el proteoma de adipocitos suplementados con aceite de semillas de <i>Pinus radiata</i> y ácido pinolénico.																	
Cultivo y diferenciación de la línea celular 3T3-L1.																	
Estandarización de cultivo suplementado con aceite de semilla de <i>Pinus radiata</i> y ácido pinolénico	X	X															
Aislamiento de proteínas desde tejidos y células y electroforesis			X	X													
Digestión de proteínas y análisis por LC/MS e interpretación por bioinformática					X	X	X	X									
2. Comparar los patrones <i>in vivo</i> de expresión proteica de PPARγ, UCP1 y Leptina desde adipocitos suplementados con aceite de semillas de <i>Pinus radiata</i>.																	
Aislamiento de proteínas desde tejidos y células, cuantificar proteínas, realizar <i>westernblot</i> y cuantificación densitométrica de bandas									X	X	X						
3. Correlacionar los patrones de expresión proteica con parámetros antropométricos.																	
Análisis estadístico												X	X				
Escritura y defensa														X	X	X	X

BIBLIOGRAFÍA

Adams, M., Montague, C. T., Prins, J. B., Holder, J. C., Smith, S. A., Sanders, L., Digby, J. E., Sewter, C. P., Lazar, M. A., Chatterjee, V. K. and O'Rahilly, S. (1997). Activators of peroxisome proliferator-activated receptor gamma have depot-specific effects on human preadipocyte differentiation. *The Journal of clinical investigation*, 100(12), 3149–3153.

Álvarez V. (2012). Tratamiento farmacológico de la obesidad. *Revista Medica Clínica Las Condes*; 23(2) 173-179.

Arteaga A MA, Rigotti A, Cortes V. (2016). Manual de Dislipidemias. Metabolismo y clínica. Editorial Mediterraneo, Santiago de Chile, 192 p.

Becerra J., Pérez C., Hernández V., Durán. Sandoval D., Díaz P., Silva J. and Fuentealba C. (2017). Un producto nutracéutico modulador del apetito y sensibilizador a la Insulina en mamíferos.

Cannon B. and Nedergaard J. (2004). Brown Adipose Tissue: Function and Physiological Significance. *Physiological Reviews*, 84, 277–359.

Cefalu WT, Bray GA, Home PD, Garvey WT, Klein S, Pi-Sunyer FX, Hu FB, Raz I, Van Gaal L, Wolfe BM and Ryan DH. (2015). Advances in the Science, Treatment, and Prevention of the Disease of Obesity: Reflections From a Diabetes Care Editors' Expert Forum. *Diabetes Care*, 38,1567-1582.

Choe SS, Huh JY, Hwang IJ, Kim JI, Kim JB (2016). Adipose Tissue Remodeling: Its Role in Energy Metabolism and Metabolic Disorders. *Front Endocrinol*, 7(30), 1-16.

Christodoulides C. and Vidal-Puig A. (2009). PPARs and adipocyte function. *Molecular and celular endocrinology*, 318, 61-68.

Christofides A, Konstantinidou E, Jani C, Boussiotis VA. (2021). The role of peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR) in immune responses. *Metabolism*, 114, 1-13.

Cuadrado C. *et al.* (2016). Medición de la carga económica actual de la obesidad en Chile y proyección al año 2030: propuesta de un modelo de análisis validado para la realidad del país. *FONIS*, código: SA14ID0176.

FAO y OPS. (2017). Panorama de la Seguridad Alimentaria y Nutricional en América Latina y el Caribe. Santiago de Chile.

Feldmann HM, Golozoubova V, Cannon B and Nedergaard J. (2009). UCP1 ablation induces obesity and abolishes diet-induced thermogenesis in mice exempt from thermal stress by living at thermoneutrality. *Cell Metab.*,9, 203-209.

Fruh S. M. (2017). Obesity: Risk factors, complications, and strategies for sustainable long-term weight management. *Journal of the American Association of Nurse Practitioners*, 29(S1), S3–S14.

González E., Aguilar M., García C., García P., Álvarez J and Padilla C. (2010). Leptina: un péptido con potencial terapéutico en sujetos obesos. *Elsevier: Endocrinología y Nutrición*, 57, 322-327.

Hoan Le N., Shin S., Hien Tu T., Kim C., Kang J., Tsuyoshi G., Teruo K., Nim Han S. and Yu R. (2012). Diet Enriched with Korean Pine Nut Oil Improves Mitochondrial Oxidative Metabolism in Skeletal Muscle and Brown Adipose Tissue in Diet-Induced Obesity. *Journal of agricultural and food chemistry*, 60, 11935-11941.

Hughes G., Boyland E., Williams N., Mennen L., Scott C., Kirkham T., Harrold J., Keizer H. and Halford J. (2008). The effect of Korean pine nut oil (PinnoThin™) on food intake, feeding behaviour and appetite: A double-blind placebo-controlled trial. *Lipids in Health and Disease*, 7, 6.

Kang J. and Park C. (2012). Anti-Obesity Drugs: A Review about Their Effects and Safety. *Diabetes & Metabolism Journal*, 36, 13-25.

Kershaw E. and Flier J. (2004). Adipose Tissue as an Endocrine Organ. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 89, 2548-2556.

Lauterbach M., Wunderlich T. (2017). Macrophage function in obesity-induced inflammation and insulin resistance. *Pflugers Arch - Eur J Physiol*, 469(3-4), 385-396.

Lee BC, Lee J. (2014). Cellular and molecular players in adipose tissue inflammation in the development of obesity-induced insulin resistance. *Biochim Biophys Acta.*, 1842(3), 446-462.

Lewis GF, Carpentier A, Adeli K, Giacca A (2002). Disordered fat storage and mobilization in the pathogenesis of insulin resistance and type 2 diabetes. *Endocr Rev*, 23, 201–229.

Macedo M. and Calder P. (2018). Obesity, Inflammation, Toll-Like Receptor 4 and Fatty Acids. *Nutrients*, 10, 432.

Maluenda F. (2012). Bariatric Surgery. *Revista Médica Clínica Las Condes*, 23,180-188.

Ministerio de Salud de Chile. (2018). Orientación Técnica Dislipidemias. Departamento de Enfermedades No Transmisibles. Santiago de Chile.

Ministerio de Salud de Chile. (2017). Encuesta Nacional de Salud 2016-2017. Departamento de Epidemiología. Santiago de Chile.

Nedergaard, J., Bengtsson, T., and Cannon, B. (2007). Unexpected evidence for active brown adipose tissue in adult humans. *Am. J. Physiol.* 293, E444– E452.

Park S., Lim Y., Shin S. and Nim Han S. (2013). Impact of Korean pine nut oil on weight gain and immune responses in high-fat diet-induced obese mice. *Nutrition research and practice*, 7, 352-358.

Pasman W., Heimerikx J., Rubingh C., van den Berg R., O'Shea M., Gambelli L., Hendriks H., Einerhand A., Scott C., Keizer H. and Mennen L. (2008). The effect of Korean pine nut oil on in vitro CCK release, on appetite sensations and on gut hormones in post-menopausal overweight women. *Lipids in Health and Disease*, 7,10.

Reiner Z, Catapano AL, De Backer G, Graham I, Taskinen MR, Wiklund O, Agewall S, Alegria E, Chapman MJ, Durrington P, Erdine S, Halcox J, Hobbs R, Kjekshus J, Filardi PP, Riccardi G, Storey RF, Wood D (2011). ESC/EAS Guidelines for the management of dyslipidaemias. *Eur Heart J.*, 32(14), 1769-1818.

Rojas D. (2018). Identificación de los mecanismos que median la disminución de peso influenciada por una dieta enriquecida con aceite de semilla de *Pinus radiata* en un modelo murino de obesidad inducido por dieta. Tesis de Magister, Facultad de Farmacia, Universidad de Concepción, 117 pp.

Rousset S, Alves-Guerra MC, Mozo J, Miroux B, Cassard-Doulcier AM, Bouillaud F, Ricquier D. The biology of mitochondrial uncoupling proteins. *Diabetes*. 2004 Feb;53 Suppl 1:S130-5. doi: 10.2337/diabetes.53.2007.s130. PMID: 14749278.

Sharma A.M. and Staels B. (2007). Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ and Adipose Tissue—Understanding Obesity-Related Changes in Regulation of Lipid and Glucose Metabolism. *The journal of clinical endocrinology & metabolism*, 92, 386-395.

Turcotte LP, Fisher JS. Skeletal muscle insulin resistance: roles of fatty acid metabolism and exercise. *Phys Ther.* 2008 Nov;88(11):1279-96. doi: 10.2522/ptj.20080018. Epub 2008 Sep 18

Uauy R., Martínez J. and Rojas C. (2000). Molecular nutrition: regulation of lipid metabolism by peroxisome proliferator activated receptors (PPAR). Their

relationship to obesity and diabetes mellitus. *Revista Médica de Chile*, 128, 437-446.

Vázquez-M. (2016). Unraveling the Effects of PPAR β/δ on Insulin Resistance and Cardiovascular Disease. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 27, 319-334.

Vera F., Pino J., Campos-Cabaleiro V., Ruiz-Fernández C., Mera A., Gonzalez-Gay M., Gómez R. and Gualillo O. (2018). Obesity, Fat Mass and Immune System: Role for Leptin. *Frontiers in Physiology*, 9, 1-20.

Villarroya F, Cereijo R, Gavaldà-Navarro A, Villarroya J, Giralt M. (2018). Inflammation of brown/beige adipose tissues in obesity and metabolic disease. *J Intern Med*. 284(5), 492-504.

Wajchenberg BL 2000 Subcutaneous and visceral adipose tissue: their relation to the metabolic syndrome. *Endocr Rev* 21:697–738

Zhao A., Yu J., Lew J.L., Huang L., Wright S.D. and Cui J. (2004). Polyunsaturated Fatty Acids Are FXR Ligands and Differentially Regulate Expression of FXR Targets. *DNA and cell biology*, 23, 519-526.

JUSTIFICACIÓN DE RECURSOS SOLICITADOS

10.1. Personal Técnico

Personas que ejercen funciones de carácter técnico permanente a la investigación durante la ejecución del proyecto:

Personal Técnico	Horas de dedicación		Meses de dedicación		Remuneración / Honorarios m(\$)
	Semana	Mes	Año 1	Año 2	
Personal 1	40	160	11	6	6.000

Describa aquí las labores de cada personal técnico:

Personal 1- Tareas	Apoyo en la realización de experimentos, responsable del funcionamiento del laboratorio y de los alumnos tesistas
---------------------------	---

10.2. Personal de Apoyo

Personas que ejercen funciones de apoyo permanente a las actividades asociadas a la ejecución del proyecto:

Personal de Apoyo	Horas de dedicación		Meses de dedicación		Remuneración / Honorarios m(\$)
	Semana	Mes	Año 1	Año 2	
Personal 1	20	80	11	6	3.400

Describa aquí las labores de cada personal de apoyo:

Personal 1- Tareas:	Preparación de reactivos y medios de cultivo, encargado de los insumos del laboratorio.
----------------------------	---

10.3. Becas para Tesistas/Memoristas

Informe las tesis de pre y postgrado que pretende financiar a través del proyecto.

	Número de tesis a formar, justificar solicitud
Año 1	2 Becas para alumnos tesis de pregrado para la colaboración del desarrollo del proyecto

10.4. Viajes al extranjero

Por concepto de reuniones científicas o congresos se financia como máximo un viaje por año.

	Pasajes m(\$)	Viáticos m(\$)	Destino	Nº Días	Propósito del viaje
Año 1	1.200	500	Barcelona	2	Asistencia a V Congreso Internacional de Obesidad y Enfermedades

10.5. Viajes nacionales

	Pasajes m(\$)	Viáticos m(\$)	Destino	Nº Días	Propósito del viaje
Año 1	70	200	Santiago	3	Asistencia a XXIV Congreso Chileno de Obesidad 2022

10.6. Gastos de operación general

Subítem	Fundamente solicitud	Año 1 m(\$)	Año 2 m(\$)
Materiales	Material fungible de laboratorio (tales como placas petri, tubos de ensayo, frascos de cultivo, pipetas serológicas desechables, raspador de células, placas de cultivo, guantes de nitrilo, tubos precellys, etc). Reactivos para la realización y mantención de cultivos celulares (medios de cultivo, suero fetal bovino, agua libre de nucleasas, etc.). Kits para la extracción, purificación y cuantificación de proteínas (Reactivo Trizol, BCA Protein Assay Kit). Reactivos y anticuerpos para la realización de <i>westernblot</i> y kits comerciales para realizar análisis proteómico.	6500	6500
Capacitaciones			
Inscripción seminarios, congresos, talleres, etc.			
Publicaciones, Propiedad Intelectual e Industrial			

Material bibliográfico y suscripciones			
Gastos en difusión			
Softwares			
Costos de garantías de boletas, pólizas y pagarés			
Reparación y arriendo de equipos	Arriendo de Espectrómetro de Masas acoplado a Cromatografía Líquida en Laboratorio de Análisis Instrumental	500	
Movilizaciones y traslados			
Atención de reuniones			
Otros gastos de operación	Para llevar a cabo este proyecto serán necesarios artículos de oficina (tales como papel, lápices, marcadores, cartuchos de tinta, etc.).	500	500
TOTAL:		7500	7000

10.7. Equipamiento

	Nombre Equipamiento	Costo m(\$)(*)	Fundamente solicitud
Año 1	Mini-PROTEAN® Tetra Cell, Mini Trans-Blot® Module, and PowerPac™ Basic Power Supply	2152	Este kit se utilizará para la realización de electroforesis y posterior westernblot, es fundamental para hacer la correcta separación de las proteínas de cada muestra en un gel de poliacrilamida
Año 1	SET DE MICROPIPETAS PLUS AUTOCLAVABLES P/10; P/20 ;P/200 y P/1000	430	Instrumentación fundamental para la preparación de muestras y reactivos.

10.8. Infraestructura y mobiliario

Subítem	Fundamente solicitud	Año 1 m(\$)	Año 2 m(\$)
Acondicionamiento de espacios físicos	Mejoramiento de la ventilación en laboratorio principal, debido a la temperatura que se genera en la época de primera-verano, lo cual podría afectar tanto al personal como a las muestras que se tratan en el laboratorio.	1000	
Mobiliario	Mejoramiento de la sala de estudio añadiendo escritorios y sillas suficientes para los estudiantes que trabajan en el laboratorio.	500	
Total:		1500	

RECURSOS DISPONIBLES

El Laboratorio de Bioquímica Clínica e inmunología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Concepción, cuenta con la infraestructura y la mayor parte del equipamiento necesario para llevar a cabo el desarrollo de este proyecto, dentro de lo cual se incluye:

- 1.- Una sala de cultivo celular que cuenta con gabinetes de flujo laminar, refrigeradores, centrifugas y estufas de incubación.
- 2.- Una sala de trabajo que cuenta con mesones, refrigeradores a -80°C para el almacenamiento de muestras, refrigeradores para el almacenamiento de reactivos y equipo homogenizador Precellys.
- 3.- Una sala con equipo lector de placas Biotek Synergy 2 utilizado para la cuantificación de proteínas.
- 4.- Laboratorio con mesones de trabajo, anaqueles de reactivos, balanza de precisión para la preparación de reactivos, centrifuga con enfriamiento, 4 refrigeradores para el almacenamiento de reactivos y muestras, equipo Li-Cor para la lectura de membranas de *westerblot*.
- 5.- Sala de estudio para estudiantes con algunos escritorios y sillas.

ANEXO

12.1. Procedimientos de tratamientos de desechos biológicos y/o químicos.

Los procedimientos para almacenaje y eliminación de sustancias peligrosas se realizan en base al “Reglamento de Manejo de Sustancias Peligrosas” de MATPEL establecido en el Decreto U. de C. N° 2014-016; basado en el Decreto Supremo N°148, la NCh 382 y NCh 2120.

1. Se consideran residuos químicos:

- Tóxicos: solventes halogenados, metales pesados, bromuro de etidio, otros.
- Inflamables: aceite, parafina, solventes no halogenados, formalina, acetonitrilo, otros.
- Corrosivos: ácidos y bases, sólidos y líquidos.
- Reactivos: peróxidos, sólidos inflamables, oxidantes (cloratos, nitratos).

2. Se consideran residuos biológicos:

- Biológicos y derivados de procedimientos: placenta, restos humanos en general, animales, apósitos, algodones infectados con agentes patógenos, entre otros.
- Residuos corto punzantes: agujas, navajas, bisturí, entre otros.

3. Flujograma para el proceso de operación de residuos peligrosos efectuado por MATPEL en la Universidad de Concepción.

