

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA**

**LA MOLINA**

**ESCUELA DE POSGRADO**

**MAESTRÍA EN NUTRICIÓN**



**“EXTRACTO DEL TÉ VERDE (*Camellia sinensis*) EN LA  
TERMORREGULACIÓN DE RATAS ALBINAS OBESAS (*Holtzman*)”**

**Presentada por:**

**RUTH ESTHER CATUNTA CACHI**

**TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE MAESTRO  
MAGISTER SCIENTIAE EN NUTRICIÓN**

**Lima – Perú**

**2020**

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA  
LA MOLINA**

**ESCUELA DE POSGRADO  
MAESTRÍA EN NUTRICIÓN**

**“EXTRACTO DEL TÉ VERDE (*Camellia sinensis*) EN LA  
TERMORREGULACIÓN DE RATAS ALBINAS OBESAS (*Holtzman*)”**

**TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE MAESTRO  
MAGISTER SCIENTIAE EN NUTRICIÓN**

Presentada por:

**RUTH ESTHER CATUNTA CACHI**

Sustentada y aprobada ante el siguiente jurado:

Dra. Haydee Cárdenas de Jurado

**PRESIDENTE**

Dra. María Elena Villanueva Espinoza

**ASESOR**

Mg. Sc. Alejandrina Sotelo Méndez

**MIEMBRO**

Mg.Sc. Jeannette Díaz Novoa

**MIEMBRO**

## **DEDICATORIA**

- A mis padres Fermín y María, por sus sabios consejos y ayuda en todo tiempo.
- A mis hermanos Heber y Marcos, por su gran apoyo incondicional como familia.
- A mi esposo Abraham, por ser mi gran compañero de vida.

## **AGRADECIMIENTO**

- Agradezco a Dios, por permitirme cumplir esta meta y guiarme en cada paso que doy.
- A la Dra. María Elena Villanueva Espinoza, por ser mi asesora y darme todo su apoyo.
- A los miembros del jurado, la Dra. H. Cárdenas, Mg.Sc. A. Sotelo y Mg.Sc. J. Díaz, por su buena disposición para el cumplimiento de la investigación.
- Al Sr. Mauro Ayala y a mi compañero de clases Luis Higa, por su gran ayuda durante la parte experimental de la investigación, en el Bioterio.
- A la Universidad Nacional Agraria La Molina, la Universidad Nacional Mayor de San Marcos y al Proyecto N°014-2016-INIA-PNIA/UPMSI/IE, por financiar el desarrollo de la tesis.

# ÍNDICE GENERAL

|  |    |
|--|----|
| <b>I. INTRODUCCIÓN</b> .....   | 1  |
| <b>II. REVISIÓN DE LITERATURA</b> .....  | 3  |
| <b>2.1 OBESIDAD</b> .....  | 3  |
| 2.1.1 Obesidad como un proceso inflamatorio.....                                   | 3  |
| 2.1.2 Relación entre nutrigenómica, nutrigenética y obesidad .....                 | 5  |
| 2.1.3 Obesidad en el Perú.....   | 7  |
| <b>2.2 TÉ VERDE (<i>Camellia sinensis</i>)</b> .....                               | 8  |
| 2.2.1 Composición.....   | 8  |
| 2.2.2 Catequinas.....  | 9  |
| 2.2.3 Catequinas del té verde y la salud .....                                     | 9  |
| <b>2.3 RECEPTORES ACTIVADOS POR PROLIFERADORES<br/>        PEROXISOMALES</b> ..... | 11 |
| 2.3.1 PPAR $\alpha$ .....  | 12 |
| <b>2.4 ACOPLAMIENTO Y DESACOPLAMIENTO A NIVEL<br/>        MITOCONDRIAL</b> .....   | 13 |
| <b>2.5 PROTEÍNAS DESACOPLANTES MITOCONDRIALES (UCPs)</b> .....                     | 14 |
| 2.5.1 UCP1 y la grasa parda o marrón.....  | 15 |
| 2.5.2 UCP1 y la grasa beige .....  | 16 |
| 2.5.3 UCP 3 y músculo esquelético.....   | 17 |
| <b>2.6 GRASA CORPORAL</b> .....  | 18 |
| 2.6.1 Digestión, absorción y transporte de grasas .....                            | 19 |
| <b>2.7 PERFIL LIPÍDICO</b> .....   | 19 |
| 2.7.1 Colesterol.....  | 20 |
| 2.7.2 Triglicéridos.....   | 21 |
| <b>2.8 INDUCCIÓN A OBESIDAD CON DIETA ALTA EN GRASA</b> .....                      | 21 |
| <b>III. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....   | 22 |

|              |   |    |
|--------------|---|----|
| <b>3.1</b>   | <b>LUGAR</b> .....  | 22 |
| <b>3.2</b>   | <b>DURACIÓN DE LA EXPERIMENTACIÓN</b> .....                               | 22 |
| <b>3.3</b>   | <b>ANIMALES EXPERIMENTALES</b> .....                                      | 22 |
| <b>3.4</b>   | <b>INSTALACIONES Y EQUIPOS</b> .....                                      | 23 |
| <b>3.5</b>   | <b>EXTRACTO DE TÉ VERDE</b> .....   | 23 |
| <b>3.5.1</b> | <b>Preparación de la muestra de té verde</b> .....                        | 23 |
| <b>3.5.2</b> | <b>Extracción de catequinas y compuestos fenólicos del té verde</b> ..... | 24 |
| <b>3.6</b>   | <b>ALIMENTACIÓN</b> .....   | 24 |
| <b>3.7</b>   | <b>PARÁMETROS A EVALUAR</b> .....   | 26 |
| <b>3.7.1</b> | <b>Peso del animal, variación de peso</b> .....                           | 26 |
| <b>3.7.2</b> | <b>Consumo de alimento</b> .....  | 27 |
| <b>3.7.3</b> | <b>Perfil lipídico</b> .....  | 27 |
| <b>3.7.4</b> | <b>Índice de Lee</b> .....  | 27 |
| <b>3.7.5</b> | <b>Expresión génica relativa de UCP1, UCP3 y PPAR alfa</b> .....          | 28 |
| <b>3.8</b>   | <b>ANÁLISIS ESTADÍSTICO</b> .....   | 30 |
| <b>IV.</b>   | <b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....                                       | 32 |
| <b>4.1</b>   | <b>PESO DEL ANIMAL Y VARIACIÓN DE PESO</b> .....                          | 32 |
| <b>4.2</b>   | <b>CONSUMO DE ALIMENTO</b> .....  | 34 |
| <b>4.3</b>   | <b>PERFIL LIPÍDICO</b> .....  | 35 |
| <b>4.4</b>   | <b>ÍNDICE DE LEE</b> .....  | 38 |
| <b>4.5</b>   | <b>EXPRESIÓN RELATIVA DE UCP1, UCP3 Y PPAR alfa</b> .....                 | 39 |
| <b>V.</b>    | <b>CONCLUSIONES</b> .....   | 45 |
| <b>VI.</b>   | <b>RECOMENDACIONES</b> .....  | 46 |
| <b>VII.</b>  | <b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....                                   | 47 |
| <b>VIII.</b> | <b>ANEXOS</b> .....   | 58 |

## ÍNDICE DE CUADROS

|   |           |
|---|-----------|
| <b>Cuadro 1: Personas de 15 y más años de edad con obesidad, según sexo y área de residencia, 2014-2017 (Porcentaje).....</b> | <b>7</b>  |
| <b>Cuadro 2: Composición porcentual del té verde .....</b>  | <b>8</b>  |
| <b>Cuadro 3: Categorías de lípidos y ejemplos típicos.....</b>  | <b>18</b> |
| <b>Cuadro 4: Composición del extracto acuoso de té verde .....</b>  | <b>23</b> |
| <b>Cuadro 5: Composición nutricional de alimento comercial para ratas (DN).....</b>   | <b>25</b> |
| <b>Cuadro 6: Composición nutricional de alimento obesogénico .....</b>  | <b>25</b> |
| <b>Cuadro 7: Secuencia y tamaño de los genes empleados .....</b>  | <b>30</b> |
| <b>Cuadro 8: Peso de las ratas al finalizar cada etapa.....</b>   | <b>32</b> |
| <b>Cuadro 9: Variación de peso de las ratas entre etapas .....</b>  | <b>33</b> |
| <b>Cuadro 10: Consumo de alimento al finalizar cada etapa.....</b>  | <b>35</b> |
| <b>Cuadro 11: Niveles de triglicéridos en sangre al finalizar cada etapa.....</b>   | <b>35</b> |
| <b>Cuadro 12: Niveles de c-HDL en sangre al finalizar cada etapa .....</b>  | <b>36</b> |
| <b>Cuadro 13: Valores del Índice de Lee al finalizar cada etapa.....</b>  | <b>39</b> |
| <b>Cuadro 14: Expresión relativa del gen PPAR alfa en tejido de hígado al finalizar la etapa II .....</b>                     | <b>42</b> |
| <b>Cuadro 15 : Expresión relativa del gen UCP 3 en tejido muscular al finalizar la etapa II.....</b>                          | <b>44</b> |

## ÍNDICE DE FIGURAS

|  |           |
|--|-----------|
| <b>Figura 1: Niveles de triglicéridos en sangre por etapa.....</b>   | <b>37</b> |
| <b>Figura 2: Valores del Índice de Lee por etapa.....</b>  | <b>39</b> |
| <b>Figura 3: Expresión relativa del gen PPAR alfa en tejido de hígado al finalizar la<br/>etapa II .....</b> | <b>43</b> |
| <b>Figura 4: Expresión relativa de UCP 3 en tejido muscular al finalizar la etapa II.....</b>                | <b>44</b> |

## ÍNDICE DE ANEXOS

|  |           |
|--|-----------|
| <b>Anexo 1: Constancia N° 348-USM-2018.....</b>                                    | <b>59</b> |
| <b>Anexo 2: Guía de uso TRIzol™ Reagent .....</b>                                  | <b>60</b> |
| <b>Anexo 3: Guía de uso TURBO DNA-free™ DNase .....</b>                            | <b>66</b> |
| <b>Anexo 4: Guía de uso High-Capacity cDNA Reverse Transcription kit with.....</b> | <b>75</b> |
| <b>Anexo 5: Protocolo de uso POWER UP™ SYBR® Green Master Mix.....</b>             | <b>95</b> |

## RESUMEN

Según diversas investigaciones, el té verde puede afectar a múltiples aspectos del balance energético que, en conjunto, ayudan a combatir la obesidad. El objetivo del estudio fue evaluar la expresión génica de UCP1, UCP3, PPAR  $\alpha$  en respuesta al consumo del extracto de té verde (catequinas) y su relación con los niveles lipídicos en ratas obesas. Se emplearon dosis alta (DA) de extracto de té verde, (400 mg hojas de té verde/kg de peso corporal) y dosis baja (DB) de extracto de té verde (200 mg hojas de té verde/kg de peso corporal), cabe indicar que el extracto acuoso de hojas de té verde tuvo una concentración de 20.8 mg Eq catequina/g hojas de té verde. El experimento se dividió en dos etapas, en la primera, se procedió a inducir a obesidad a las 24 ratas con una dieta obesogénica (DO) por un período de 30 días; en la segunda, se distribuyeron aleatoriamente los animales en cada tratamiento: T1: DO + DA, T2: DO + DB, T3: DO y T4: DN (dieta normal), el tiempo de los tratamientos fue de 42 días. Los parámetros evaluados al finalizar cada etapa fueron: control de peso, Índice de Lee, consumo de alimento y perfil lipídico (niveles de triglicéridos y C- HDL en sangre). Los resultados no lograron alcanzar diferencias estadísticas ( $p < 0.05$ ) en caso del Índice de Lee, peso y perfil lipídico al concluir los tratamientos (Etapa II), sin embargo, se observó, una mayor disminución numérica en los niveles de triglicéridos cuando los animales recibieron dosis bajas o altas de extracto de té verde en comparación a las ratas obesas. Se sacrificaron las ratas al término de los 42 días, para dar lugar a los análisis de medición de expresión génica con la técnica del PCR en tiempo real, evidenciando lo siguiente: la UCP1 en el tejido adiposo blanco subcutáneo, no logró diferencias de expresión con ningún tratamiento, así como el PPAR alfa en tejido de hígado, y en caso de la UCP3 en tejido muscular (*musculus gastrocnemius*), se observó mayor tendencia de expresión con dosis altas y bajas de extracto de té verde en comparación con el grupo obeso.

**Palabra clave:** Té verde, obesidad, UCP1, UCP3 y PPAR alfa.

## ABSTRACT

According to various researches, the green tea can affect multiple aspects of the energetic balance that together, help to reduce obesity. The objective of this study was to evaluate the gene expression of UCP1, UCP3, PPAR  $\alpha$  in response to the consumption of the green tea extract (catechins) and its relationship with lipid levels in obese rats. High dose (HD) of green tea extract (400mg green tea leaves/kg body weight) and low dose (LD) (200mg of green tea extract/kg body weight) were used. It should be noted that the aqueous extract of green tea leaves had a concentration of 20.8 mg Eq catechin/g green tea leaves. The experiment was divided into two stages. In the first one, 24 rats were induced to obesity with an obesogenic diet (OD) for a period of 30 days; in the second one, the animals were randomly distributed in each treatment: T1: OD + HD, T2: OD + LD, T3: OD and T4: ND (normal diet), the treatment time was 42 days. The parameters evaluated at the end of each stage were: weight control, Lee index, food consumption and lipid profile (triglyceride levels and C-HDL in blood). The results did not show statistical differences ( $p < 0.05$ ) in the case of Lee index, weight and lipid profile at the end of all treatments (stage II), however, a greater numerical decrease in triglyceride levels was observed when animals received low or high doses of green tea extract in comparison to obese rats. At the end of 42 days rats were sacrificed, for gene expression measurement with the PCR real time technique, showing the following: the UCP1 in the subcutaneous white adipose tissue, did not show differences in expression with any treatment, as well as the PPAR alpha in liver tissue, and in the case of the UCP3 in muscle tissue (*musculus gastrocnemius*), a tendency for greater expression was observed with high and low doses of green tea extract compared to the obese group.

**Keyword:** green tea, obesity, UCP1, UCP3 and PPAR alpha.

## I. INTRODUCCIÓN

La obesidad es un problema de salud mundial, según la OMS se define como una acumulación anormal o excesiva de grasa que puede ser perjudicial para la salud. En el Perú, la obesidad está enmarcada dentro de las enfermedades no transmisibles que cada año van incrementándose según la Encuesta Demográfica y de Salud Familiar (INEI, 2018). Varios estudios han informado que la obesidad es un importante factor de riesgo de diversas enfermedades debilitantes y potencialmente mortales como la enfermedad cardiovascular, hiperlipidemia y diabetes mellitus, que conducen a elevados gastos de atención de salud en muchos países en desarrollo y los países desarrollados. Así mismo, se conoce que existen diversas formas para combatir la obesidad, las cuales implican aumentar el gasto de energía, realizando mayor actividad física o disipando la energía en forma de calor, siendo las proteínas desacoplantes (UCPs) de la fosforilación oxidativa en la membrana interna mitocondrial las que liberan esta energía almacenada en forma de calor, ejerciendo así un papel importante en la termogénesis. Las UCPs están relacionadas con el factor de transcripción PPAR (Receptores Activados por Proliferadores Peroxisomales), el cual regula la expresión de genes involucrados en el metabolismo de los lípidos, específicamente con las enzimas lipolíticas. La obesidad es un problema multifactorial y en ese sentido, uno de los aspectos a considerar es la posible utilización de alimentos funcionales que ayuden a combatir el problema. El té verde (*Camellia sinensis*), ha sido ampliamente estudiado por sus efectos beneficiosos sobre las enfermedades metabólicas y cardiovasculares, debido a los importantes principios activos que posee; dentro de ellos están los polifenoles, antioxidantes naturales, y un componente importante de ellos son las catequinas, las que han demostrado que atenúan la obesidad en animales y humanos, afectando múltiples aspectos del balance energético; aunque, su mecanismo de acción no ha sido completamente dilucidado, por lo que, es necesario revisar si se trata de un efecto sobre la expresión génica de enzimas lipolíticas, o sobre la termorregulación, lo que podría estar afectando la expresión génica del factor de transcripción PPAR $\alpha$  o de las proteínas desacoplantes de la fosforilación oxidativa, como es el caso de la UCP3 del músculo esquelético y la UCP1 propia de la grasa parda, por ello, en esta investigación se plantea como objetivo general evaluar la expresión

génica de UCP1, UCP3, PPAR $\alpha$  en respuesta al consumo de extracto del té verde (catequinas) y su relación con los niveles lipídicos en ratas obesas. Asimismo, los objetivos específicos de la tesis son: determinar la influencia del consumo de extracto del té verde en la expresión génica de UCP1, UCP3 y PPAR $\alpha$ ; evaluar la influencia del extracto de té verde en la concentración de triglicéridos y HDL en sangre de las ratas (perfil lipídico); analizar el efecto de la administración del extracto de té verde en el peso corporal y consumo de alimento de las ratas obesas.

## **II. REVISIÓN DE LITERATURA**

### **2.1 OBESIDAD**

La obesidad es la acumulación anormal o excesiva de grasa que puede ser perjudicial para la salud (OMS 2016), y es un problema de salud mundial; aunque hay muchos factores genéticos y ambientales que predisponen a los individuos propensos al aumento de peso, la causa fundamental de la obesidad es un desequilibrio entre la ingesta alimentaria y el gasto energético. El exceso de grasa se desarrolla con el tiempo a partir de un ligero desequilibrio energético positivo (Rains et al. 2011). Varios estudios han informado que la obesidad es un importante factor de riesgo de varias enfermedades debilitantes y potencialmente mortales como la enfermedad cardiovascular, hiperlipidemia y diabetes mellitus (Chen et al. 2016). La obesidad también se asocia con complicaciones del embarazo, dismenorrea, hirsutismo, incontinencia por estrés y trastornos psicológicos (depresión). La naturaleza de los riesgos para la salud relacionados con la obesidad es similar en todas las poblaciones, aunque el nivel específico de riesgo asociado a un determinado nivel de sobrepeso u obesidad puede variar en función de la raza / origen étnico, y también con la edad, el sexo y las condiciones sociales (National Institutes of Health 1998).

#### **2.1.1 Obesidad como un proceso inflamatorio**

Cuando existe un balance positivo de energía, el excedente energético se acumula en el tejido adiposo subcutáneo. Éste va aumentando por hiperplasia, es decir, a partir de la proliferación y diferenciación de los pre-adipocitos. Cuando el tejido adiposo subcutáneo es incapaz de almacenar apropiadamente el exceso de energía o se ha rebasado el umbral de almacenamiento, aumentan los depósitos de grasa visceral, que al tener menor capacidad adipogénica crecen por hipertrofia (aumento del tamaño de los adipocitos) (Izaola et al. 2015). Por tanto, la obesidad constituye un estado de disfunción adipocitaria, que implica tanto un agotamiento de la capacidad de almacenamiento de ácidos grasos como una perturbación en la función endocrinometabólica del tejido adiposo (Silveira et al. 2007).

En los últimos años se ha observado que los pacientes obesos presentan un estado inflamatorio crónico de bajo grado como una consecuencia del incremento en la masa del tejido adiposo, el cual contiene fibroblastos, preadipocitos, adipocitos y macrófagos; estos últimos contribuyen de manera importante al proceso inflamatorio sistémico con la producción de mediadores proinflamatorios (Blancas et al. 2010). De este modo, la inflamación crónica ha surgido como uno de los mecanismos fisiológicos claves que relaciona la obesidad con la resistencia a la insulina y la DM 2, además de estar íntimamente asociada con el desarrollo de otras patologías graves como la esteatohepatitis no alcohólica y las enfermedades cardiovasculares (Izaola et al. 2015).

El tejido adiposo de los sujetos obesos puede diferir en muchas de sus propiedades, como son la ubicación, el desarrollo de la red vascular, el perfil de síntesis y secreción de adipocinas, la actividad lipolítica y lipogénica, el potencial de adipogénesis (reclutamiento de células preadiposas para su paso a adipocitos maduros), la infiltración por células inmunes, entre otras. Estas características están íntimamente relacionadas entre sí, potenciándose entre ellas, pudiendo generar círculos viciosos que condicionen un tejido adiposo patológico (Reyes 2010). La inflamación sistémica se caracteriza por la elevación en los niveles circulantes de citoquinas inflamatorias, así como por el aumento de la infiltración de macrófagos en tejidos periféricos (Hernández 2018). Las citoquinas implicadas en la modulación de las respuestas fisiológicas a cargo del tejido adiposo se denominan adipocitoquinas. La leptina, adiponectina, resistina, factor de necrosis tumoral alfa (TNF $\alpha$ ) e interleucina-6 (IL-6) son algunas de las más importantes. El TNF $\alpha$  es una de las moléculas proinflamatorias más potentes, interviniendo de forma precoz y universal en todo tipo de reacciones, es sintetizada principalmente en los macrófagos, pero el descubrimiento de que, tanto el TNF $\alpha$  como su receptor (TNFR) también son producidas en el tejido adiposo siendo relacionados estas moléculas con la obesidad, la diabetes y el gasto energético (Blanco 2007).

La lipoinflamación, o inflamación crónica asociada a la obesidad, es motivo de interés actual por parte de la comunidad científica, los resultados obtenidos a partir de investigaciones recientes subrayan la importancia de algunas moléculas denominadas mediadores especializados en la resolución, como posibles dianas terapéuticas para el tratamiento de la Obesidad (Hernández 2018). Se necesita un balance negativo de energía para producir pérdida de peso y puede ser alcanzado por la disminución de la ingesta o por el gasto

creciente. Tradicionalmente se ha recurrido al consumo de infusiones para facilitar la pérdida de peso, y una de las de mayor interés es el té verde (Nomura et al. 2008).

### **2.1.2 Relación entre nutrigenómica, nutrigenética y obesidad**

La nutrigenómica estudia los mecanismos por los cuales los nutrientes actúan como señales químicas para incidir en la expresión de los genes, y de esta forma modificar la síntesis de proteínas y el funcionamiento de las diversas rutas metabólicas. Por otro lado, la nutrigenética analiza la respuesta de diferentes genotipos a la ingesta de los nutrientes y la forma en que ésta relación determina la susceptibilidad de un sujeto a padecer una enfermedad particular (Coronado et al. 2011).

La nutrición es un proceso complejo que permite el ciclo de la vida, al que abastece de sustancias que participan como fuentes de energía en la estructura celular y para el control del metabolismo, manteniendo así la función y la homeostasis corporal (Gómez 2007). Según Bourgues (2003), hace referencia que el estado nutricional es un fenotipo y por lo tanto, es el resultado de la interacción dinámica y continua de la información genética que cada persona ha heredado de sus progenitores con su historia ambiental particular, la cual a su vez está integrada por la influencia, tanto la inmediata como la acumulativa, de su historia alimentaria y su relación en el largo plazo con el medio físico (altitud, clima, etc, biológico (floraintestinal, microorganismo patógenos) emocional y social.

Los diversos nutrientes presentes en el alimento poseen ciertas características que marcan su mayor o menor efecto en la dieta de un individuo, como son su biodisponibilidad, lo que hace referencia a la proporción de los componentes individuales contenidos en los alimentos que son liberados de su matriz, a la tasa de absorción de cada uno de ellos en el lumen intestinal y al grado de metabolización de los mismos en las células periféricas del organismo (Vargas 2016), en este sentido, numerosos estudios epidemiológicos confirman la existencia de cierta asociación entre la dieta ingerida y la incidencia y gravedad de enfermedades (Gómez 2007). Razón por la cual, la nutrigenómica tiene un gran potencial en términos de salud, ya que la comparación de los cambios moleculares que ocurren en un estado saludable versus las diferentes situaciones de riesgo y las distintas condiciones de enfermedad, permitirán identificar marcas moleculares claves que darán indicios acerca de la manera en que la dieta promueve o evita la transición hacia estados patológicos futuros (Vargas 2016).

Según un modelo simplificado, los genes definen una susceptibilidad a padecer una determinada enfermedad o condición, mientras que factores ambientales como la dieta o el físico modulan o determinan esta susceptibilidad. A este modelo simplista cabe añadir el papel del azar. En el caso del sobrepeso y obesidad, los aspectos nutricionales son factores ambientales muy importantes. Existen diversos estudios de asociación de amplitud genómica (GWAS) que han permitido identificar 75 posiciones en el genoma humano

cuyas variaciones tienden a ocurrir en las personas con sobrepeso, los estudios para la identificación en las variantes genéticas o polimorfismos genéticos de un solo nucleótido (SNP) relacionados con la obesidad ha permitido avanzar en el conocimiento sobre la interacción dieta – genes (Gómez y Flores 2015). En la actualidad se han identificado a diversos genes asociados a la obesidad, el gen de la leptina (responsable de regular el contenido de grasa corporal y el balance energético), el gen *MC4R* (relacionado con el control de apetito y la saciedad), el gen *PPAR* (participa en la adipogénesis, en el metabolismo de lípidos y carbohidratos, etc.), el gen de la adiponectina (regula el metabolismo energético), los genes de la *UCP1*, *UCP2*, *UCP3* (involucrados en la regulación de la termogénesis y el gasto energético), entre otros (Silveira et al. 2007).

La regulación de la expresión genética que interviene en el desarrollo de la obesidad se lleva a cabo en dos sistemas, en primer lugar, las proteínas desacopladoras mitocondriales en el tejido adiposo marrón son las responsables de intervenir en el flujo de electrones de la cadena respiratoria y en segundo lugar, factores de transcripción nuclear actúan en conjunto para la regulación de diversos genes que modifican la maduración del adipocito, sus funciones y la tasa de oxidación; los ácidos grasos de la dieta, en especial los del tipo poliinsaturado son capaces de modificar estas dos rutas metabólicas mediante la represión o estimulación de diversos genes involucrados en el metabolismo de lípidos, esta acción es específica para cada individuo, que parte de las diferencias genéticas denominadas polimorfismos, los cuales en el futuro serán esenciales para definir mejores esquemas terapéuticos de poblaciones e individuos (Gutiérrez et al. 2006).

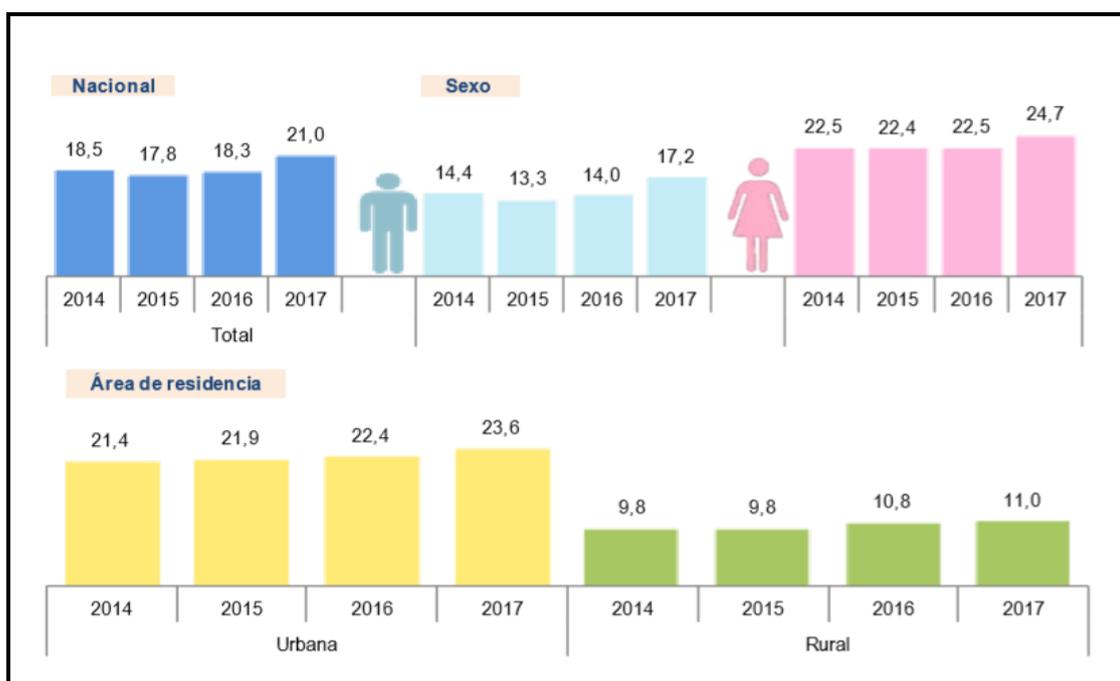
Según Martínez et al. (2013), la investigación en genómica nutricional permitirá contribuir a desarrollar dietas personalizadas hechas con base en el genotipo, así como identificar biomarcadores moleculares y nuevos componentes bioactivos en los alimentos y validar su efectividad como alimentos funcionales o nutraceuticos. Por otro lado, Silveira et al. (2007), menciona que la posibilidad de una intervención nutricional en períodos críticos del

desarrollo y la capacidad de modificar la susceptibilidad genética a ciertas enfermedades a través de la alimentación es el gran reto de la nutrigenómica, más allá del diseño de dietas o alimentos funcionales.

### 2.1.3 Obesidad en el Perú

Según información obtenida del Instituto Nacional de Estadística e Informática (INEI), la obesidad es un problema de salud que día a día va creciendo y tomando mayor fuerza entre los peruanos, los resultados (Cuadro1) de la Encuesta Demográfica y de Salud Familiar - 2017, el 21,0% de las personas de 15 y más años de edad sufren de obesidad. En el 2016, esta prevalencia fue de 18,3%. Por sexo, el 24,7% de mujeres resultaron se obesas y en hombres el 17,2%. Según área de residencia, en el área urbana el 23,6% padece de obesidad y en el área rural el 11,0%.

**Cuadro 1: Personas de 15 y más años de edad con obesidad, según sexo y área de residencia, 2014-2017 (Porcentaje)**



**FUENTE:** Instituto Nacional de Estadística e Informática – Encuesta Demográfica y de Salud familiar 2017 (2018)

## 2.2 TÉ VERDE (*Camellia sinensis*)

### 2.2.1 Composición

La composición química del té verde es compleja: proteínas (15-20% peso seco), cuyas enzimas constituyen una fracción importante; aminoácidos (peso seco 1-4%), tales como teanina o 5- N- etilglutamina, ácido glutámico, triptófano, glicina, serina, ácido aspártico, tirosina, valina, leucina, treonina, arginina y lisina; carbohidratos (peso en seco de 5-7%), tales como celulosa, pectinas, glucosa, fructosa, y sacarosa; minerales y oligoelementos (5% peso en seco), tales como calcio, magnesio, cromo, manganeso, hierro, cobre, zinc, molibdeno, selenio, sodio, fósforo, cobalto, estroncio, níquel, potasio, flúor y aluminio; y cantidades traza de lípidos (ácido linoleico y linolénico), esteroides; vitaminas (B, C, E); bases xánticas (cafeína, teofilina), pigmentos (clorofila, carotenoides), y compuestos volátiles (aldehídos, alcoholes, ésteres, lactonas, hidrocarburos). Las hojas frescas contienen, en promedio, 3-4% de alcaloides conocidos como metilxantinas, tales como cafeína, teobromina y la teofilina. Además, hay ácidos fenólicos tales como el ácido gálico. El té verde contiene polifenoles, que incluyen flavonoles, flavandioles, flavonoides y ácidos fenólicos; estos compuestos pueden representar hasta el 30% del peso seco. Los principales flavonoides del té verde son diversas catequinas, hay cuatro tipos principalmente en el té verde: epicatequina, epigallocatequina, epicatequina-3-galato, y epigallocatequina-3-galata (Chacko et al. 2010). En el Cuadro 2 se muestra la composición de las hojas del té verde.

**Cuadro 2: Composición porcentual del té verde**

| COMPONENTE              | TÉ VERDE* |
|-------------------------|-----------|
| Proteínas               | 15        |
| Aminoácidos             | 4         |
| Fibra                   | 26        |
| Otros carbohidratos     | 7         |
| Lípidos                 | 7         |
| Pigmentos               | 2         |
| Minerales               | 5         |
| Componentes fenólicos** | 30        |

\*Data referente a peso seco de las hojas de té verde

\*\* Especialmente flavonoides

**FUENTE:** Chacko et al. (2010)

### **2.2.2 Catequinas**

El té verde es una rica fuente de catequinas, que representan hasta el 30% del peso seco de la hoja, como las catequinas pueden donar hidrógenos de los grupos hidroxilo en su estructura, se ha encontrado que tienen excelente actividad antioxidante, expresada a través de su capacidad de barrido de radicales libres siendo más potente que la vitamina C, vitamina E o  $\beta$ -caroteno, también se ha demostrado que quelan los metales de transición, modulan las enzimas oxidantes y antioxidantes, y afectan la expresión génica (Voung et al. 2010).

Las catequinas tienen la estructura general de C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> con dos anillos aromáticos y varios grupos hidroxilo. Se clasifican en dos grupos; Catequinas libres y catequinas esterificadas. Las catequinas libres son la catequina, la galocatequina, la epicatequina (EC), la epigalocatequina (EGC), mientras que las catequinas esterificadas son EGCG, galato de epicatequina (ECG), galato de galocatequina (GCG) y galato de catequina (CG); las catequinas esterificadas contribuyen a una astringencia sustancial y un sabor amargo, mientras que las catequinas libres son mucho menos astringentes y tienen un sabor ligeramente dulce; entre las catequinas, la EGCG, EGC, ECG y EC son las cuatro principales catequinas encontradas en el té verde; EGCG está normalmente presente en la concentración más alta, seguida por EGC, ECG y EC (Voung et al. 2010).

Las catequinas se sintetizan en las hojas de la *C. Sinensis* a través del ácido acético-malónico y vías metabólicas del ácido shikímico-cinámico; la calcona y el ácido gálico se producen a partir de la vía del ácido shikímico desde la cual se producen estas diferentes catequinas, existe alguna variación en el contenido de las catequinas en hojas frescas de té; la composición depende de la ubicación del cultivo, la variedad, la nutrición de la planta del té, la época del año, y el tipo de hojas (hojas gruesas o jóvenes). Un perfil típico de catequina en un extracto de hojas de té verde comprende 10-15% de EGCG, 6-10% de EGC, 2-3% de ECG y 2% de EC (Vuong et al. 2011).

### **2.2.3 Catequinas del té verde y la salud**

El té verde se deriva del secado al vapor de las hojas del té frescas y por lo tanto no se produce la oxidación, dando como resultado altos niveles de catequinas (Thielecke y Boschmann 2009). Contiene una gran cantidad de polifenoles que se cree que ayudan a prevenir enfermedades cardiovasculares y a combatir la carcinogénesis; los principales

polifenoles del té son las catequinas, que tienen actividad antioxidante, antihipertensiva, anticancerígena e hipocolesterolémica; también se cree que son útiles para el tratamiento y prevención de la obesidad, ya que se ha demostrado que reducen la adiposidad inducida por la dieta en ratones, ratas y seres humanos; aunque los mecanismos por los que el té verde ayuda a tratar y prevenir la obesidad aún no se han determinado completamente, varios estudios sugieren que puede actuar por la disminución de la absorción de grasa y mediante la aceleración de la excreción de grasa fecal (Nomura et al. 2008).

La disminución de la absorción de nutrientes en el tracto gastrointestinal ha sido propuesta como un posible mecanismo que explica los efectos antiobesidad de las catequinas del té verde; los datos *in vitro* sugieren que puede reducir la absorción de glucosa mediante la inhibición de enzimas gastrointestinales implicadas en la digestión de nutrientes, en particular la actividad de  $\alpha$ -glucosidasa y la  $\alpha$ -amilasa; los estudios celulares también han demostrado que disminuye la absorción de glucosa en las células intestinales e inhibe el transportador de glucosa dependiente de sodio (Rains et al. 2011).

Según estudios realizados, se sabe que las sustancias que aumentan la oxidación hepática de ácidos grasos, tales como agonistas beta-adrenérgicos, disminuyen la ingesta voluntaria de alimentos en ratas, se ha planteado la hipótesis de que el estado de energía dentro del hígado, principalmente la producción de ATP, desencadena señales a los centros que regulan el apetito por las neuronas sensoriales vagales; y siendo que las catequinas del té verde pueden aumentar la oxidación de la grasa hepática es posible que el apetito pueda ser alterado por ellas, sin embargo, los estudios en animales provistos de catequina o EGCG son inconsistentes con respecto a los efectos sobre la ingesta de alimentos (Rains et al. 2011).

Por otro lado, las catequinas y cafeína del té verde influyen sobre la actividad del sistema nervioso simpático (SNS). Sustancias que estimulan o prolongan la presencia de norepinefrina (NE), un mediador clave de la actividad del SNS, aumentan el gasto de energía y promueven la oxidación de la grasa. Las catequinas inhiben la catecol O -metiltransferasa (COMT), la enzima que degrada la norepinefrina (activador de receptores adrenérgicos). La cafeína, es una metilxantina, que tiene impacto termogénico (Westerterp-Platenga 2010), influye en la actividad del SNS a través de la inhibición de la fosfodiesterasa, la enzima que degrada rápidamente la adenosina monofosfato cíclico (cAMP) intracelular, una señal liberada en respuesta a la NE, entonces cuando se consumen juntos, la catequina y la cafeína

actúan de forma sinérgica, dando lugar a efectos pronunciados en el SNS (Rains et al. 2011). En conjunto, estos ingredientes funcionales tienen el potencial de producir efectos significativos sobre objetivos metabólicos tales como la termogénesis y la oxidación de grasas (Dulloo et al. 2000; Westerterp-Platenga 2010). Estos hechos fueron corroborados por trabajos realizados en ratas, que demuestran que el té verde aumentó el gasto energético a través de la estimulación de la activación de los receptores adrenérgicos  $\beta$  de la termogénesis en el tejido adiposo marrón (Choo 2003). Además, de ello en otros estudios también indican aumento del gasto de energía en ratas, donde queda demostrado que la ingesta de catequinas del té verde posee efectos supresores sobre la acumulación de grasa corporal debido que parecen estar asociadas con la expresión de una variedad de genes, incluyendo el gen *UCPI* en el tejido adiposo marrón, por efecto de la estimulación de receptores  $\beta$ -adrenérgicos mediada por la norepinefrina, aumentando la capacidad termogénica (Nomura et al. 2008).

### **2.3 RECEPTORES ACTIVADOS POR PROLIFERADORES PEROXISOMALES**

PPARs (Receptores Activados por Proliferadores Peroxisomales) deben su nombre a que fueron originalmente descubiertos en 1990, por el grupo de Issemann, como factores que estimulaban la generación de peroxisomas en hígado de roedores. Ahora se sabe que los PPARs son factores de transcripción que son activados por la unión de ligandos específicos (naturales o sintéticos) provenientes del exterior de la célula y que regulan la transcripción de una multitud de genes no necesariamente relacionados a los peroxisomas (Carvajal et al. 2007). Los PPARs son una familia de receptores nucleares que se activan por unión de diversos factores, algunos son naturales como insulina, ácido araquidónico y metabolitos eicosanoides, etc.; mientras que otros son sintéticos como fibratos, herbicidas, plasticidas industriales y diferentes drogas como las glitazonas (Faut 2014).

Los PPARs estarían vinculados con la modulación de funciones críticas de la homeostasis fisiológica celular, como son el metabolismo y el transporte lipídico, y de los hidratos de carbono, así como también con múltiples efectos antiinflamatorios; los PPARs activan la transcripción de genes blanco formados por heterodímeros con el receptor del ácido 9-cis retinoico (RXR). En respuesta a la unión de sus ligandos, estos receptores nucleares sufren un cambio conformacional en su estructura proteica que permite la disociación de proteínas represoras y el reclutamiento de proteínas activadoras; de esta forma, el complejo se une a

secuencias específicas denominadas elementos de respuesta a proliferadores peroxisomales (PPRE) localizadas en el promotor de los genes blanco, que regulan la transcripción de dichos genes (Martínez et al. 2011). Por otro lado, se menciona que la regulación genética del PPARs funciona independiente de RXR pero dependiente de ligandos específicos, y consiste en la unión del complejo ligando PPAR al promotor del gen que codifica para factor de necrosis tumoral- $\kappa\beta$  (NF- $\kappa\beta$ ), inhibiendo su transcripción (Carvajal et al. 2007).

Se conocen tres isoformas de este receptor: PPAR $\alpha$ , PPAR $\beta/\delta$  y PPAR $\gamma$ . PPAR $\alpha$  está implicado en la oxidación de ácidos grasos y se expresa en mayor forma en tejidos metabólicamente activos como hígado, riñón, músculo esquelético y grasa parda, pero también se ha encontrado en corazón, monocitos, endotelio vascular y células de músculo liso. Los humanos tienen niveles de PPAR $\alpha$  más bajos que los observados en roedores. (Sandoval et al. 2009; Uauy et al. 2000). PPAR $\gamma$  está involucrado en la diferenciación de células adiposas y la sensibilidad a la insulina, y presenta dos isoformas: PPAR $\gamma$ 1 que se expresa a alto nivel en tejido adiposo, y PPAR $\gamma$ 2 de expresión en varios tejidos. PPAR $\gamma$  también se expresa en células musculares lisas del tejido vascular y en el corazón, si bien es muy escaso en este último. PPAR $\beta/\delta$  es el más extensamente distribuido en el organismo, y su nivel de expresión depende del grado de diferenciación (Sandoval et al. 2009).

### **2.3.1 PPAR $\alpha$**

Los ácidos grasos son uno de los ligandos naturales de PPAR $\alpha$ , y activan genes del catabolismo de ácidos grasos; otros ligandos naturales son los eicosanoides (derivados del ácido araquidónico por las vías de la lipooxigenasa y la ciclooxigenasa) (Sandoval et al. 2009).

Entre los ácidos grasos, el ácido linoleico (18:2 n-6) y el ácido docosahexaenoico (DHA, 22:6 n-3) son los mejores activadores de PPAR $\alpha$  (Uauy et al. 2000). Los hipolipemiantes fibratos gemfibrozil y fenofibrato, son ligandos agonistas de PPAR $\alpha$  que reducen la producción de triglicérido hepático por medio del aumento de la  $\beta$  oxidación de ácidos grasos mediada por PPAR $\alpha$  (Sandoval et al. 2009).

A nivel del hígado, se ha demostrado que los PPAR $\alpha$  están implicados en cada etapa del metabolismo de lípidos, incluyendo la movilización, el transporte, la tioesterificación en

acil-CoA, su translocación a la mitocondria y su catabolismo en la  $\beta$ -oxidación (Carvajal et al. 2007). Los genes activados por PPAR $\alpha$  codifican las enzimas de oxidación peroxisomal, como la acil-CoA oxidasa. La hidroximetilglutaril-CoA sintasa mitocondrial (mHMG-CoAS) es la principal enzima involucrada en la formación de cuerpos cetónicos y está directamente controlada por PPAR $\alpha$ . Así, los lípidos presentes en el hígado estimulan su eliminación, mediante la oxidación peroxisomal y mitocondrial como un intento de evitar la lipotoxicidad (Viana et al. 2011).

El PPAR $\alpha$  también regula la expresión de genes de la síntesis y transporte de colesterol (Uauy et al. 2000). Del mismo modo, se sabe que el PPAR $\alpha$  con PPAR $\delta$  participan en la regulación del proceso de termogénesis a través de la expresión de las proteínas desacoplantes (Uauy et al. 2000; Brun et al. 1999). Según estudios, se conoce que el PPAR $\alpha$  se expresa preferentemente en adipocitos marrones en comparación con los adipocitos blancos, por ello, se puede esperar que sea principalmente a través de PPAR $\alpha$  que el gen *UCPI* se induzca en los adipocitos marrones maduros. Asimismo, se ha demostrado que PPAR $\alpha$  desempeña un papel importante en la inducción del gen *UCP3* en respuesta a los ácidos grasos, según resultados de análisis transcriptómico de músculo o corazón de ratones transgénicos que sobre expresan PPAR $\alpha$  específicamente en estos tejidos, evidenciando que el ARNm de *UCP3* se encuentra entre los transcritos de genes más intensamente inducidos, relacionándose este gen con el catabolismo de ácidos grasos regulados por PPAR $\alpha$  en el músculo y el corazón (Villarroya et al. 2007).

#### **2.4 ACOPLAMIENTO Y DESACOPLAMIENTO A NIVEL MITOCONDRIAL**

Las mitocondrias son organelas celulares encargadas de suministrar la mayor parte de la energía necesaria para la actividad celular (respiración celular). Actúan, por lo tanto, como centrales energéticas de la célula y sintetizan adenosín trifosfato (ATP) a expensas de los carburantes metabólicos (glucosa, ácidos grasos y aminoácidos) (D'Otencio y Navigante, 2016). La serie de reacciones que aseguran la producción de ATP en la mitocondria se denominan globalmente fosforilación oxidativa (Rial y Gonzáles 2007).

Este proceso consta de cinco complejos multiproteicos localizados en la membrana mitocondrial interna y organizados según su potencial redox. Durante la respiración, los electrones cedidos a la cadena respiratoria por moléculas reductoras producidas durante el metabolismo oxidativo (NADH y FADH<sub>2</sub>) se transfieren de un complejo a otro adyacente,

con potencial redox superior (Cámara 2005). La energía disponible tras estos procesos de óxido-reducción es utilizada para bombear protones desde la matriz hacia el espacio intermembranal, generándose una gradiente de potencial electroquímico de protones (Rial y González 2007), la misma que, es utilizada por la ATP sintasa (Complejo V). Este fenómeno denominado acoplamiento de la fosforilación con la oxidación de sustratos, asegura la coordinación entre las necesidades de ATP y el consumo de sustratos (Cámara 2005). El reingreso de protones a través de mecanismos que no involucran la síntesis de ATP, se conoce como desacoplamiento, que resulta en la liberación de calor, como es el caso de las proteínas desacoplantes ubicadas en la membrana interna mitocondrial tales como la UCP1 (Liesa y Shirihai 2013).

## **2.5 PROTEÍNAS DESACOPLANTES MITOCONDRIALES (UCPs)**

Las proteínas desacoplantes mitocondriales (UCPs) son transportadores, que son importantes para la termogénesis (Gong et al.1997).

A finales de los años 70, se descubrió la proteína desacoplante UCP1 o termogenina, ubicada en la membrana interna mitocondrial de los adipocitos del tejido adiposo pardo, siendo más abundante en mamíferos neonatos que en adultos. Posteriormente, se descubrieron nuevas UCPs fuera de la grasa parda, que abrían un nuevo campo de investigación en el estudio de la obesidad, diabetes y otras enfermedades relacionadas con la producción de radicales libres, la regulación de la ratio ADP/ATP, el metabolismo hidrocarbonado y lipídico o con la exportación de aniones lipídicos (Cordero et al. 2007).

En mamíferos, se han descrito cuatro genes de este tipo que codifican para: UCP2, UCP3, UCP4 y BMCP1 (proteína portadora mitocondrial cerebral 1, también denominada UCP5), (Ramsden et al. 2012; Yu et al. 2000).

En contraste con UCP1, tanto UCP2 como UCP3 se expresan en un grado sustancial en los seres humanos adultos. El ARNm de UCP2 está presente en un gran número de tejidos y está en niveles altos en el tejido adiposo blanco (WAT), el bazo y las células  $\beta$  pancreáticas. A pesar de la presencia omnipresente de mRNA UCP2, la proteína UCP2 se ha detectado en sólo unos pocos tejidos (Lanni et al. 2003).

### **2.5.1 UCP1 y la grasa parda o marrón**

El tejido adiposo marrón fue descrito por primera vez en pequeños mamíferos y los infantes como una adaptación para defenderse del frío. Era originalmente conocido como el órgano de hibernación debido a su función en el mantenimiento de la temperatura corporal en animales en períodos de hibernación (Wu et al. 2013).

Los principales depósitos de adipocitos marrones en roedores están en la región interescapular (placas intercapulares, axilares y cervicales) incrustados alrededor de los músculos profundos de la espalda. Un depósito de adipocito marrón interescapular también ha sido notado en lactantes humanos, pero está ausente en adultos (Harms y Seale 2013).

El adipocito marrón suele ser más pequeño que el blanco y su forma es elíptica, con el núcleo redondo u ovalado situado en el centro. El volumen del citoplasma es grande y contiene múltiples gotitas de lípidos, el retículo endoplásmico es pobre y presenta alta cantidad de mitocondrias, lo cual, da lugar a la termogénesis (producción de calor). Además, el contenido de los cofactores hemo en la enzima mitocondrial citocromo oxidasa da al tejido la respuesta de color macroscópico marrón al frío (Cedikova et al. 2016).

Según estudios, la exposición a la temperatura fría promueve rápidamente la activación alternativa de los macrófagos del tejido adiposo produciendo las catecolaminas (noradrenalina), que son liberadas por terminales nerviosos simpáticos para actuar sobre los receptores b-adrenérgicos y estimular la expresión de genes termogénicos de los adipocitos marrones, así como la lipólisis del tejido adiposo blanco (Nguyen et al. 2011). La señalización simpática en el frío se ve incrementada, y la exposición crónica al frío resulta en la activación y expansión de los adipocitos marrones, así también, este adipocito está regulado por las contribuciones endocrinas de la hormona tiroidea, entre otras (Wu et al. 2013).

Por otro lado, la UCP1 transporta  $H^+$  a través de la membrana mitocondrial interna provocando un desacoplamiento, pero esta actividad estaría regulada por la presencia de algunos ácidos grasos. En numerosos modelos se ha observado la capacidad de UCP1 de translocar ácidos grasos a través de la membrana. La UCP1 podría también tener un comportamiento dual según la concentración de  $H^+$ , teniendo una actividad de transporte

protónico basal, y comportándose como transportador de ácidos grasos, únicamente cuando éstos se encuentren en elevadas concentraciones (Cámara 2005).

### **2.5.2 UCP1 y la grasa beige**

Según algunos estudios, se ha identificado la aparición del tejido adiposo marrón activo en humanos adultos y adipocitos de tipo marrón inducibles en depósitos de tejido adiposo blanco en respuesta a estímulos apropiados ("proceso de dorado"). Adipocitos de color marrón que aparecen en depósitos de grasa blanca han sido denominados adipocitos "brite" (de marrón en blanco) o "beige" y tienen características similares a adipocitos marrones, en particular la capacidad para la respiración desacoplada (Bonet et al. 2013). Según investigaciones llevadas a cabo, se observa que la grasa blanca contiene células precursoras que son capaces de expresar UCP1 y otras características del tejido adiposo marrón (Harms y Seale 2013).

Es importante indicar que, el tejido adiposo blanco está especializado en el almacenamiento y liberación de reservas energéticas en forma de triacilgliceroles (triglicéridos), lo que le otorga un papel central en la regulación de la homeostasis energética en mamíferos (Pujol 2005), de esta manera, el tejido adiposo blanco se define como un órgano heterogéneo, que está formado por diversos depósitos, tanto subcutáneos como viscerales, localizados a lo largo del cuerpo. En ratas, los depósitos grasos viscerales más abundantes son el gonadal (ovárico o epididimal), que se encuentra rodeando las gónadas, y el mesentérico, que rodea los intestinos. El depósito subcutáneo más abundante en ratas es el que se encuentra en la región inguinal (Pujol 2005 y Cinti 2002).

El adipocito beige tiene las características mixtas del adipocito blanco y marrón. Durante el estado basal, muestra una morfología unilocular como adipocito blanco (de forma esférica y grande con núcleo aplanado, que se sitúa en la periferia porque está casi completamente lleno con una sola gota de lípidos, el citoplasma contiene pocas mitocondrias así como un ligero pero reconocible retículo endoplasmático liso), pero cuando es estimulado por el frío o por receptores beta adrenérgicos, su aspecto adquiere rasgos intermedios (incrementa presencia de mitocondrias), la morfología finalmente resulta en la expresión de proteínas típicas para el adipocito marrón y la transformación de la grasa almacenada en él en pequeñas gotas de lípidos típicas de los adipocitos marrones (Cedikova et al. 2016).

Existen diferentes determinantes fisiológicas, farmacológicas y dietéticas que se han relacionado con la remodelación de la grasa blanca a marrón y los mecanismos moleculares involucrados aún se revisan en detalle, motivo por el cual, este tema aún sigue en controversia, independientemente a ello, la inducción al pardeamiento de la grasa blanca representa una estrategia potencial atractiva para la gestión y el tratamiento de la obesidad y complicaciones relacionadas (Bonet et al. 2013).

### **2.5.3 UCP 3 y músculo esquelético**

La UCP 3 tiene una homología discretamente mayor por la UCP 1 que por la UCP 2. Su gen se localiza cercano al de la UCP 2 y su respuesta fisiológica en el tejido adiposo es similar a la descrita para UCP 1 (Aguilar 2002).

La UCP3 se expresa en altos niveles en el músculo y tejido adiposo marrón. Los niveles de ARNm de la UCP3, están regulados por manipulaciones hormonales y dietéticas, un experimento realizado en ratas, indicó que los niveles de UCP3 del músculo se redujeron 3 veces en las ratas con hipotiroidismo y aumentaron 6 veces en ratas con hipertiroidismo. Por lo tanto, la UCP3 es un fuerte candidato para explicar los efectos de la hormona tiroidea en la termogénesis. Los niveles de UCP3 del tejido adiposo blanco se incrementaron en gran medida por el tratamiento con el agonista  $\beta$ 3-adrenérgico, lo que sugiere otra vía para el aumento de la termogénesis. Los niveles de ARNm de UCP3 también estaban regulados por la dexametasona, la leptina, y el hambre, aunque de forma diferente en el músculo y el tejido adiposo marrón. La inanición causó un incremento de UCP3 en el músculo y la disminución de UCP3 del tejido adiposo marrón, lo que sugiere que el músculo asume un papel más importante en la termorregulación durante la inanición (Gong et al. 1997).

Según investigaciones, realizadas en ratones recién nacidos, la expresión de la UCP3 fue alterada en el músculo esquelético en respuesta a la ingesta de leche, así también evidenciaron el efecto del PPAR $\alpha$  para la transcripción del gen UCP3 (Pedraza et al. 2006), del mismo modo, en otro estudio, realizado a ratones diabéticos, quienes tienen un metabolismo energético cardíaco anormal asociado con altas concentraciones de ácidos grasos libres en plasma, activaron al PPAR $\alpha$  para aumentar los niveles de UCP3 (Murray et al. 2005). Por otro lado, durante la obesidad, el incremento de ácidos grasos libres resulta tóxico para las células pancreáticas que son sensibles a la oxidación e induce alteraciones en

la liberación de insulina, lo que puede llevar a los individuos a desarrollar diabetes por el daño que sufren dichas células, se realizó una investigación comparando sujetos con diabetes tipo 2 y sujetos sanos, que demostró que los diabéticos tienen sólo 50% de UCP 3 en músculo esquelético (Martínez et al. 2005).

Existen investigaciones genéticas sobre la asociación entre formas polimórficas del gen *UCP3* y situaciones de alteración en el equilibrio energético y la obesidad. Uno de los polimorfismos hallados más frecuentemente en el gen *UCP3* es el cambio de un sólo nucleótido en la región proximal del promotor transcripcional del gen (cambio de C a T en -55). Así, una variante nucleotídica silente en el exón 3 ha sido asociada con fenotipos relacionados con la obesidad y con la respuesta metabólica a la hiperfagia y a las hormonas tiroideas (Villarroya 2003). Del mismo modo, la información recopilada, indica que los polimorfismos de la UCP2 y UCP3, más allá de ser disipadores de energía, también están asociados con el metabolismo de grasas, obesidad y diabetes (Brondani et al. 2014; Jia et al. 2009; Gamboa et al. 2018).

## 2.6 GRASA CORPORAL

Según la FAO, los lípidos son pequeñas moléculas hidrófobas o anfipáticas (o anfifílicas) que pueden originarse completamente o en parte a través de condensaciones de tioésteres o unidades de isopreno. Partiendo de este enfoque, los lípidos de los tejidos biológicos se clasifican en ocho categorías diferentes tal y como se puede apreciar en el Cuadro 3:

**Cuadro 3: Categorías de lípidos y ejemplos típicos**

| <b>CATEGORÍA</b>    | <b>EJEMPLO</b>                                     |
|---------------------|--|
| Ácidos grasos       | Ácido oleico                                       |
| Glicerolípidos      | Triglicérido                                       |
| Glicerofosfolépidos | Fotidilcolina                                      |
| Esfingolípidos      | Esfingosina  |
| Esteroles           | Colesterol   |
| Isoprenoides        | Farnesol   |
| Glucolípidos        | UDP-3-0(3hidroxitetradecanoil)-N-acetilglucosamina |
| Policétidos         | Aflatoxina   |

**FUENTE:** FAO y FINUT (2012)

### **2.6.1 Digestión, absorción y transporte de grasas**

El proceso digestivo es muy complicado y requiere una coordinación de las funciones lingual, gástrica, intestinal, biliar y pancreática. Al principio, la grasa se mastica y se mezcla con la lipasa lingual, seguida de una hidrólisis por la lipasa gástrica en el estómago y más tarde por la lipasa pancreática en el intestino delgado. La hidrólisis de los triglicéridos produce 2-monoacil-sn-glicerol y ácidos grasos libres. La formación de 2-monosn-glicerol facilita la absorción de los ácidos grasos poliinsaturados en la posición sn-2 y la retención de estos ácidos grasos en los glicerolípidos que se generan y transfieren posteriormente a los tejidos. Los otros productos de la hidrólisis, como son los ácidos grasos de cadena larga, el 2-monoacilglicerol, los lisofosfolípidos y el colesterol, se mezclan con las sales biliares y la lecitina para formar micelas, que son por el absorbidas por el enterocito. Los triglicéridos recién sintetizados, los fosfolípidos y los ésteres de colesterol se combinan con apolipoproteínas sintetizadas *de novo* para formar quilomicrones que son transportados fuera del enterocito e incorporados al torrente sanguíneo a través de los vasos linfáticos. Dentro del torrente sanguíneo, los triglicéridos de los quilomicrones son hidrolizados a ácidos grasos libres y glicerol por la lipoproteinlipasa. A continuación, los ácidos grasos y el glicerol pasan a través de las paredes capilares para ser utilizados por las células como energía o almacenados como grasas en el tejido adiposo. Los remanentes de los quilomicrones son eliminados de la circulación por receptores específicos y por los receptores de las LDL. El hígado cataboliza los restos de los quilomicrones, vuelve a sintetizar triglicéridos a partir de los ácidos grasos y produce lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), que se componen principalmente de triglicéridos y pequeñas cantidades de colesterol y fosfolípidos, que se liberan a la circulación. Las VLDL son las principales portadoras de triglicéridos y los sustratos para la lipoproteinlipasa endotelial y, además, suministran ácidos grasos libres a los tejidos adiposo y muscular (FAO y FINUT 2012).

### **2.7 PERFIL LIPÍDICO**

La prueba de perfil lipídico o lipograma, se ha considerado una de las herramientas para ayudar a diagnosticar enfermedades cardiovasculares, diversas investigaciones acumuladas básicas, epidemiológicas y clínicas han establecido una estrecha relación entre el aumento en los niveles de colesterol y el riesgo elevado de presentación de enfermedad cardiovascular coronaria (Caicedo 2012). Un perfil lipídico anormal constituye una condición patológica, que se caracteriza por una alteración del metabolismo lipídico que determina una

concentración fuera del rango de normalidad de lípidos y proteínas en la sangre (Biere y Tohá 2007).

### **2.7.1 Colesterol**

El colesterol (3-hidroxi-5,6 colesteno) es una molécula indispensable para la vida, desempeña funciones estructurales y metabólicas que son vitales para el ser humano. Se encuentra anclado estratégicamente en las membranas de cada célula donde modula la fluidez, permeabilidad y en consecuencia su función (Maldonado et al. 2012). El colesterol, que puede provenir de la dieta o de la síntesis *de novo* prácticamente todas las células humanas, juega varios papeles importantes. Es el esteroide mayoritario en el hombre, y es un componente de virtualmente todas las superficies celulares, así como de las membranas intracelulares. Es particularmente abundante en las estructuras mielinizadas del cerebro y del sistema nervioso central; pero está también presente en pequeñas cantidades en la membrana interna de la mitocondria. A diferencia de lo que ocurre en el plasma, la mayor parte del colesterol de las membranas celulares se encuentra en forma libre, no esterificada (Parreño y Gutiérrez 2010).

#### **Transporte de colesterol: Lipoproteínas**

Los lípidos plasmáticos (triglicéridos, ésteres del colesterol, fosfolípidos y colesterol libre), son insolubles en medios acuosos como la sangre, de tal forma que deben ser empaquetados en partículas de lipoproteína para su transporte, cerca del 70% del colesterol se encuentra unido a lipoproteínas plasmáticas en forma de ésteres de colesterol, las lipoproteínas son ensamblados macromoleculares de proteínas y lípidos, además las lipoproteínas cuentan con distintas densidades, esto se debe a la proporción relativa de lípidos y proteínas que posee cada partícula; dentro de las lipoproteínas de mayor importancia clínica encontramos las de alta densidad (HDL, del inglés, High-Density Lipoprotein), de baja densidad (LDL, del inglés, Low-Density Lipoprotein), de muy baja densidad (VLDL, del inglés, Very Low-Density Lipoprotein), de densidad intermedia (IDL, del inglés, Intermediate-Density Lipoprotein), la lipoproteína (a) y los quilomicrones (QM), asimismo, las c-LDL (colesterol unido a las LDL) son sintetizadas en el hígado: Tienen una concentración alta de colesterol, moderada de fosfolípidos, y muy baja en triglicéridos, nuestro organismo cuenta con receptores específicos para las c-LDL en casi todas las membranas celulares, los que identifican, captan e interiorizan a las c-LDL; debido a su alta aterogenicidad, son de gran

interés clínico, típicamente representan entre 60-70% del colesterol sérico total y su función es transportar el colesterol desde el hígado hacia los tejidos periféricos (Maldonado et al. 2012).

El C-HDL (colesterol unido a las HDL) es generalmente conocido como “colesterol bueno”, arrastra el colesterol de las arterias al hígado para ser eliminado, transformándose así en un factor protector del organismo para evitar la acumulación de colesterol en células y arterias (Biere y Tohá 2007).

### **2.7.2 Triglicéridos**

Los esteres de los ácidos grasos y del alcohol glicerina se llaman acilglicéridos o glicéridos. Cuando los tres grupos hidroxilo de la glicerina se hallan esterificados con ácidos grasos, la estructura se llama triacilglicérido. Los triacilglicéridos constituyen la familia más abundante de lípidos y los principales componentes de los lípidos de depósito o de reserva de las células animales y vegetales. Los triacilglicéridos, que funcionan como lípidos de depósito o de almacenamiento, son activamente sintetizados en las células de los vertebrados, particularmente en las células hepáticas y adiposas (Parreño y Gutiérrez 2010).

## **2.8 INDUCCIÓN A OBESIDAD CON DIETA ALTA EN GRASA**

Existen diversos estudios que indican haber inducido a obesidad con dietas altas en grasas, como Eu et al. (2010) que aplicaron una dieta en base al 60% de calorías provenientes de manteca vegetal durante cuatro semanas, Jim et al. (2013), emplearon una dieta alta en grasa que contenía 16.20% de grasa y Woods et al. (2003), trabajaron con una dieta elaborada con 20 g de grasa/100 g de alimento.

Por otro lado, el tiempo de la dieta es variado, Lee et al. (2011), establecieron su modelo obesogénico en 3 semanas con dietas altas en grasas comprobando los índices obesogénicos (Índice de Lee). En otros estudios, Lim et al. (2013) y Tan et al. (2014), lograron inducir a obesidad con dietas altas en grasa, en períodos de 6 semanas (con manteca de cerdo) y 4 semanas respetivamente.

### **III. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1 LUGAR**

El presente trabajo se realizó en el bioterio, perteneciente al departamento de Nutrición de la facultad de Zootecnia de la Universidad Nacional Agraria la Molina. El análisis químico proximal de las dietas en el Laboratorio de Evaluación Nutricional de Alimentos, LENA - UNALM, la determinación de la expresión génica en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Zootecnia – UNALM, y el extracto de té verde (catequinas) junto al contenido de compuestos fenólicos, en los laboratorios del Instituto de Investigación de Bioquímica y Nutrición de la Facultad de Medicina de la UNMSM.

#### **3.2 DURACIÓN DE LA EXPERIMENTACIÓN**

La investigación inició previamente con una adaptación de los animales, el tiempo fue de 17 días, dando lugar posteriormente a los 72 días de experimentación, los cuales fueron distribuidos en las siguientes etapas:

- Etapa 0 : Acondicionamiento de los animales.
- Etapa I : Duración de 30 días con una dieta para inducir a la obesidad.
- Etapa II : Duración de 42 días con las dietas experimentales.

#### **3.3 ANIMALES EXPERIMENTALES**

Se trabajó con 24 ratas albinas macho (*Holtzman*) con 60 - 70 días de edad, con un peso promedio de 215.79 gramos, distribuidos aleatoriamente en 4 tratamientos (T1 y T2: 7 animales, T3 y T4: 5 animales). Todos los procedimientos realizados con los individuos de experimentación siguieron los parámetros establecidos por el Centro Interdisciplinario de Estudios en Bioética de la Universidad de Chile para el cuidado y uso de animales de laboratorio (Cardozo et al. 2007).

### 3.4 INSTALACIONES Y EQUIPOS

El experimento se llevó a cabo en jaulas individuales, con un comedero y bebedero, así mismo se contó con bandejas individuales para recibir las excretas de los animales. Las jaulas estuvieron en un ambiente especial con temperatura equilibrada y renovación constante de aire, con control de 12 horas luz y 12 horas de oscuridad. El control de humedad (%) y temperatura ambiental (°C) se realizó con un termohidrómetro (Marca BOECO Germany), los valores fueron de 63-67 % y 23-25°C respectivamente.

### 3.5 EXTRACTO DE TÉ VERDE

Se trabajó con hojas té verde procedente de la provincia de La Convención, Cusco. Se realizó el trámite debido para la identificación taxonómica de la hoja de té verde ante el Herbario San Marcos del Museo de Historia Natural, de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (ANEXO 1: Constancia N° 348-USM-2018). Todos los análisis de extracción del té verde fueron realizados en los laboratorios de la Universidad Mayor de San Marcos, bajo la dirección de la Dra. Silvia Suárez Cunza y los resultados obtenidos de la extracción acuosa de las hojas de té verde se muestran en el Cuadro 4.

**Cuadro 4: Composición del extracto acuoso de té verde**

| <b>CAPACIDAD ANTIOXIDANTE (FRAP)</b> | <b>POLIFENOLES</b> | <b>FLAVONOIDES</b>    |
|--------------------------------------|--------------------|-----------------------|
| mg Eq Fe <sup>+2</sup> / g té        | mg Eq AG/ g té     | mg Eq Catequina/ g té |
| 198.8                                | 72.84              | 20.8                  |

**FUENTE:** Laboratorios del Instituto Centro de Investigación de Bioquímica y nutrición “Alberto Guzmán Barrón”, Universidad Mayor de San Marcos.

#### 3.5.1 Preparación de la muestra de té verde

Las hojas de té verde fueron desecadas, molidas y pasadas por tamiz para homogenizar el tamaños de las partículas. En todos los procedimientos de extracción se empleó la relación de masa/agua (0.5 g/100 ml) para realizar los respectivos análisis del extracto de té verde. Se aplicó la extracción por el método convencional de infusión (agua caliente hasta punto de bullición y luego se dejó reposar por 15 minutos y se filtró), cabe

mencionar que, las catequinas son solubles en agua y en solventes orgánicos polares (etanol, metanol y acetona).

### **3.5.2 Extracción de catequinas y compuestos fenólicos del té verde**

#### **a. Técnica capacidad antioxidante mediante el poder reductor del $Fe^{+3}$**

El poder reductor se determinó siguiendo la metodología reportada por Benzie y Strain (1996). El fundamento está basado en la capacidad de la molécula 2, 4, 6-tripiridil-s-triazina (TPTZ) de actuar como un ligando altamente estabilizador de  $Fe^{+2}$ . El ión  $Fe^{+3}$  en presencia de TPTZ fácilmente oxida a los antioxidantes, generándose el complejo reducido TPTZ- $Fe^{+2}$ . La absorción se incrementará en función de la presencia de antioxidantes (reductores). Se utilizó como referencia una solución de sulfato ferroso a concentraciones de 100 – 750  $\mu$ M. La lectura se realizó en un espectrofotómetro a 593 nm. El poder reductor de los extractos guarda una relación directa con el valor de la absorbancia.

#### **b. Cuantificación de polifenoles mediante el uso del reactivo Folin Ciocalteu**

La cuantificación del contenido de polifenoles se realiza siguiendo el procedimiento de la International Organization for Standardization (ISO) 14502-1. Se empleó como estándar una solución de ácido gálico 20  $\mu$ g/ml.

#### **c. Cuantificación de flavonoides mediante la técnica de Zhishen, Mengcheng y Jianming (1999)**

Basada en la propiedad complejante de los flavonoides, en especial de las catequinas, frente al aluminio en presencia de  $NaNO_2$  en medio alcalino. La coloración de la reacción final se lee a 510 nm. La catequina es el estándar preferido para este procedimiento.

## **3.6 ALIMENTACIÓN**

### **Etapa I: Inducción a obesidad**

En esta investigación los 24 animales recibieron una dieta obesogénica, la cual estuvo formulada por un 85% de alimento comercial para ratas (Cuadro 5) y 15 % de manteca vegetal, marca comercial Tropical, en el Cuadro 6 se muestra el resultado del análisis

próximo del alimento alto en grasa.. Existen diversos estudios que indican haber inducido a obesidad con dietas altas en grasas, como Jim et al. (2013) y Woods et al. (2003). El tiempo de la dieta obesogénica fue estimado hasta que las ratas alcanzarán valores que cumplan con los lineamientos del Índice de Lee (Novelli et al. 2007), situación similar al que establecieron su modelo obesigénico por Lee et al. (2011).

**Cuadro 5: Composición nutricional de alimento comercial para ratas (DN)**

| INGREDIENTES      | COMPOSICIÓN |
|-------------------|-------------|
| Prot. Dig. (%)    | 17          |
| Fibra (%)         | 4           |
| Grasa (%)         | 6           |
| E.M. (Mcal/Kg)    | 2.9         |
| Lisina Dig. (%)   | 0.92        |
| Met+Cis Dig. (%)  | 0.98        |
| Fósforo Disp. (%) | 0.37        |
| Ca (%)            | 0.63        |
| Humedad (%)       | 12          |

**FUENTE:** Programa de Investigación y Proyección Social en Alimentos - UNALM, elaborado con harina de maíz, torta de soya 48, harina integral extruida de soya, subproductos de trigo, aceite vegetal, carbonato de calcio, fosfato dicálcico, cloruro de colina 60%, cloruro de sodio, aminoácidos sintéticos, pre mezcla vitaminas - minerales, antioxidantes y antifúngicos.

**Cuadro 6: Composición nutricional de alimento obesogénico**

| INGREDIENTES        | CANTIDAD |
|---------------------|----------|
| Proteína. total (%) | 17, 71   |
| Fibra Cruda (%)     | 3,37     |
| Grasa (%)           | 15,07    |
| Ceniza (%)          | 4,29     |
| ELN (%)             | 46,63    |
| Humedad (%)         | 12.93    |

## **Etapa II: Tratamientos**

Los animales fueron seleccionados al azar y asignados aleatoriamente a cada tratamiento:

- T1: Dieta obesogénica con inclusión de extracto de té verde 400 mg hojas de té verde/kg peso corporal\* (DO+DA), contenía 4.16 mg Eq. catequina.
- T2: Dieta obesogénica con inclusión de extracto de té verde 200 mg hojas de té verde/kg peso corporal\* (DO+DB), contenía 8.32 mg Eq. catequina.
- T3: Dieta obesogénica (DO)\*\*
- T4: Dieta normal (DN)\*\*

\*Se determinó el peso promedio de todos los animales al término de la etapa I. La dosis aplicada fue tomada en base a los estudios realizados por Ramadan et al. (2009), quien aplicó dosis de 50 y 100 mg/kg peso en un tiempo de 4 semanas en modelos de ratas obesas, en esta investigación se administró cada dosis con la ayuda de una cánula orogástrica.

\*\* Estos animales no recibieron extracto de té verde, por ello, se les administró agua destilada a través de la cánula orogástrica.

La alimentación fue *ad libitum*, sin embargo, se brindó las mismas cantidades a cada unidad experimental y se midió el residuo de alimento diariamente, además se suministró agua de mesa tratada en cada bebedero, durante todos los días en horas de 10 am – 12 pm.

## **3.7 PARÁMETROS A EVALUAR**

### **3.7.1 Peso del animal, variación de peso**

Se realizó el pesado de cada unidad experimental (animal), al iniciar el período I y II, así como los controles de peso semanales, la variación de peso se calculó entre el peso inicial y final de cada período. Se trabajó con una balanza para pesar el animal, balanza CAVORY capacidad 3000 gramos.

### **3.7.2 Consumo de alimento**

Se realizaron controles diarios del consumo de alimento, el cual fue estimado a través de la diferencia de peso entre lo administrado en cada comedero y el alimento no consumido junto al residuo, recolectado y pesado a partir de las 11:00 horas del día siguiente. Se empleó una para la preparación de los alimentos, balanza digital SOEHNLE de capacidad máxima de 5000 gramos y una balanza para administrar el alimento, balanza MING HENG POCKET SCALE capacidad 200 gramos.

### **3.7.3 Perfil lipídico**

Se tomó muestra de sangre de la cola de cada rata, empleando un kit comercial (Medidor de Colesterol Mission) para realizar mediciones de Colesterol, HDL y triglicéridos con las siguientes características.

#### **Metodología:**

Fotómetro de reflexión

#### **Rangos de medida:**

|              |                 |
|--------------|-----------------|
| Colesterol   | 100 – 500 mg/dl |
| HDL          | 15 – 100 mg/dl  |
| Triglicérido | 45 – 650 mg/dl  |

#### **Muestra:**

Sangre total, plasma o suero

#### **Volumen de muestra:**

10 µl para examen individual y 30 µl para examen 3 – 1

### **3.7.4 Índice de Lee**

Al inicio y fin de cada período, se realizó el control de peso y se midió al animal, según indica el método del índice de Lee (Novelli et al. 2007), el cual es un parámetro antropométrico predictor de obesidad: Raíz cúbica del peso corporal (g) entre la longitud hocico-ano (cm).

- Un valor menor o igual a 0.300 es considerado normal.
- Un valor mayor a 0.300 es considerado con obesidad.

### **3.7.5 Expresión génica relativa de UCP1, UCP3 y PPAR alfa**

Pasado el período de experimentación, se procedió a la eutanasia, previo ayuno nocturno de 12 horas, donde se aplicó sobredosis anestésica, se inició con el proceso de anestesiarse a los animales con una dosis de ketamina/xilacina (90/10 mg/Kg) vía intraperitoneal, la cual se aplicó con una aguja hipodérmica de 25G, luego se procedió a realizar la eutanasia con una sobredosis de pentobarbital vía intracardiaca (IC) con una dosis de 180 mg/kg p.v (dosis triplicada), se contó con el apoyo de un médico veterinario para todo el procedimiento, quien confirmó que el animal no tuviese signos vitales, luego se procedió a realizar un corte en el abdomen para identificar los órganos requeridos para el estudio como fueron tejido hepático, tejido muscular (*musculus gastrocnemius*) y tejido adiposo blanco subcutáneo (región inguinal), se pesaron y tomaron las respectivas muestras de tejidos que fueron colocados en tanques de nitrógeno líquido a  $-80^{\circ}\text{C}$  para su conservación hasta el momento de los análisis de expresión génica. El método aplicado en esta investigación se basa en el PCR real time (Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real), que permite la cuantificación sensible, específica y reproducible de ácidos nucleicos, siendo empleado en diversos campos del diagnóstico molecular (Arya et al. 2005).

#### **a. Extracción de ARN**

Para este proceso se aplicó el método de Chomczynsky, utilizando TRIzol<sup>TM</sup> Reagent (Marca Invitrogen by ThermoFisher Scientific), el cual está diseñado para aislar el ARN total de alta calidad de las células de diferentes tejidos de origen humano, animal, vegetal, de levadura o bacteriano, para lo cual, se siguieron las instrucciones del fabricante (ANEXO2: Guía de uso TRIzol<sup>TM</sup> Reagent) y mediante electroforesis en gel de agarosa se verificó la calidad por medio de espectrofotometría con el NanoDrop One (NanoDrop Technologies; se cuantificó la cantidad extraída de ARN y se empleó un ratio de absorbancia a 260 nm y 280 nm, siendo la relación de 260/280 con valores de 1.8 – 2, considerados como aceptables (Tian et al. 2013).

#### **b. Limpieza de trazas de ADN**

Con el fin de obtener una muestra de ARN total limpia, se utilizó el kit de limpieza de la Marca Ambition by ThermoFisher Scientific, el reactivo fue TURBO DNA-free<sup>TM</sup> DNasa, que tiene como objetivo eliminar trazas de ADN contaminante de las preparaciones de ARN y luego elimina el DNasa junto a otros cationes divalentes de la

muestra. Durante todo el proceso se tomaron en consideración las instrucciones de uso provistas por el proveedor (ANEXO 3: Guía de uso TURBO DNA-free™ DNase). Para verificar la limpieza se analizaron nuevamente las muestras de cada tejido por espectrofotometría con el equipo de NanoDrop One y realizó un PCR control, con el propósito de no amplificar algún tipo de ADN genómico no deseado que pudiera interferir con los resultados finales.

### **c. Generación de cDNA**

Para la generación de cDNA, se usó el kit de transcripción inversa de cDNA de alta capacidad con inhibidor de RNasa (Marca Applied Biosystems), este kit permitió generar una cadena complementaria de ADN a partir del ARN que obtuvimos anteriormente. Se utilizó un termociclador modelo Quant Studio 5 Applied Biosystems ThermoFisher Scientific así como se aplicó los procedimientos de uso del kit, de acuerdo a las especificaciones del fabricante (ANEXO 4: Guía de uso High-Capacity cDNA Reverse Transcription kit with RNase inhibitor).

### **d. Cuantificación relativa (PCR – RT: reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real)**

Luego de obtener de cada muestra de tejido en estudio su respectivo cDNA, se procedió a estandarizar los primers (cebadores) y protocolos de PCR – real time, empleando el reactivo POWER UP™ SYBR® Green Master Mix (Marca Applied Biosystems), según recomendaciones del fabricante (ANEXO 5: Protocolo de uso POWER UP™ SYBR® Green Master Mix), en el Cuadro 7 se muestra la secuencia de cada primer y gen endógeno empleado. Luego que se consiguió determinar la temperatura ideal de trabajo de cada gen de interés y genes endógenos, se realizaron diluciones seriadas para generar una curva estándar, con la cual se verificó la eficiencia de la PCR. Los niveles de expresión de los genes de interés se normalizaron a través de la expresión de los genes endógenos GAPDH (Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa) y 18S ribosomal RNA.

Para la cuantificación de los genes a través de PCR en tiempo real se utilizó el método de Pfaffl et al. (2002), que emplea un software llamado REST (herramienta de software de expresión relativa), que está basado en un modelo matemático de cuantificación relativa que permite establecer la relación de expresión de un gen de interés o estudio en relación a otro que no se ve afectado por el tratamiento aplicado al animal (gen endógeno o de

referencia), siendo que la relación de expresión relativa, se calcula en función de la eficiencia de la PCR en tiempo real y la diferencia del punto de cruce (Ct o CP), de una muestra desconocida versus un control ( $\Delta Ct$ ).

Arya et al. (2005) definen al CT como el número de ciclo fraccional de PCR en el que la fluorescencia del indicador es mayor que el nivel mínimo de detección. El Ct es un principio básico de PCR en tiempo real y es un componente esencial en la producción de datos exactos y reproducibles.

**Cuadro 7: Secuencia y tamaño de los genes empleados**

| GEN        | SECUENCIA                             | TAMAÑO DE PRODUCTO |
|------------|---------------------------------------|--------------------|
| UCP1       | 5'-AGGGTTTGCGCCTTCTTT-3'              | 92 pb              |
|            | 5'-GGGACTTCATCAGCTCTTTCTT-3'          |                    |
| GAPDH      | 5'-ACC ACG AGA AAT ATG ACA ACT CCC-3' | 100 pb             |
|            | 5'-CCA AAG TTG TCA TGG ATGACC-3'      |                    |
| PPAR-alpha | 5'-AAT CCA CGA AGC CTA CCT GA-3'      | 132 pb             |
|            | 5'-GTC TTC TCA GCC ATG CAC AA-3'      |                    |
| 18s        | 5'-GGAGAGGGAGCCTGAGAAAC-3'            | 128 pb             |
|            | 5'-CAATTACAGGGCCTCGAAAG-3'            |                    |
| UCP3       | 5`- GACTCACAGGCAGCAAAGGAA- 3`         | 131 pb             |
|            | 5`- GAGGAGATCAGCAAAACAGGC-3`          |                    |

### 3.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se empleó el Diseño Completamente al Azar (DCA). Los promedios de los valores obtenidos de peso, consumo de alimento, triglicéridos y HDL fueron evaluados mediante el análisis de varianza, de acuerdo a los procedimientos de ANOVA del programa MINITAB y para la diferencia de medias se empleó la prueba Tukey con un nivel de significancia  $p < 0.05$ .

El modelo aditivo lineal fue el siguiente:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + R_j + \epsilon_{ij}$$

Donde:

$Y_{ij}$  = Variable respuesta en la j-ésima repetición del i-ésimo tratamiento

$\mu$  = Media general.

$T_i$  = Efecto del i-ésimo tratamiento.

$R_j$  = Efecto de la j-ésima unidad experimental

$\varepsilon_{ij}$  = Efecto de la j-ésima unidad experimental a la que se aplicó el i-ésimo tratamiento (error experimental).

## IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 PESO DEL ANIMAL Y VARIACIÓN DE PESO

Los resultados del peso al finalizar la Etapa I, demostraron incremento respecto a la Etapa 0 (Cuadro 8), sin presentar diferencias significativas entre los pesos de cada tratamiento para iniciar la Etapa II, indicando que los resultados al final del experimento no se verían influenciados por variaciones del peso inicial de los animales. Finalizada la Etapa II (Cuadro 8), no se logró encontrar diferencias significativas en los pesos por cada tratamiento, aunque, según la data sí se observó incremento de peso en los 4 grupos, la variación no alcanzó diferencias al finalizar la Etapa II (Cuadro 9). Estos resultados son similares a los obtenidos por Nomura et al. (2008), que observaron que la suplementación de catequina del té verde no tuvo efecto sobre el peso corporal o la ingesta de energía, independientemente de la dieta usada (alta en grasa 35 % y normal 5%), así como, Chen et al. (2009), que evaluando el efecto de dosis de té verde (2 g de té verde por litro) y Epigallocatequina-3-galato (1 mg/kg por día) en ratas alimentadas con alto contenido de grasa no lograron encontrar diferencias significativas en el peso corporal de todos sus tratamientos.

**Cuadro 8: Peso de las ratas al finalizar cada etapa**

| TRATAMIENTO | PESO (g)                    |                             |                             |
|-------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
|             | ETAPA 0                     | ETAPA I                     | ETAPA II                    |
| DO + DA     | 214.00 ± 26.72 <sup>a</sup> | 348.29 ± 19.60 <sup>a</sup> | 385.14 ± 31.66 <sup>a</sup> |
| DO + DB     | 233.00 ± 9.11 <sup>a</sup>  | 331.86 ± 35.96 <sup>a</sup> | 360.57 ± 26.16 <sup>a</sup> |
| DO          | 209.20 ± 33.78 <sup>a</sup> | 343.00 ± 33.49 <sup>a</sup> | 382.00 ± 25.21 <sup>a</sup> |
| DN          | 200.80 ± 26.45 <sup>a</sup> | 331.40 ± 25.54 <sup>a</sup> | 368.00 ± 20.33 <sup>a</sup> |

Los valores representan el promedio ± SD. En todos los casos, se realizó la prueba ANOVA entre los tratamientos. Se aplicó la prueba de Tukey, letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos ( $p < 0.05$ ). Dieta obesogénica + inclusión de extracto de té verde 400 mg/kg (DA), Dieta obesogénica + inclusión de extracto de té verde 200 mg/kg (DB), Dieta obesogénica (DO) y Dieta Normal (DN).

**Cuadro 9: Variación de peso de las ratas entre etapas**

| TRATAMIENTO | VARIACIÓN DE PESO (g)       |                            |
|-------------|-----------------------------|----------------------------|
|             | ETAPA 0 – I                 | ETAPA I – II               |
| DO + DA     | 134.29 ± 20.33 <sup>a</sup> | 36.86 ± 19.74 <sup>a</sup> |
| DO + DB     | 98.86 ± 35.76 <sup>a</sup>  | 28.71 ± 20.56 <sup>a</sup> |
| DO          | 133.80 ± 7.60 <sup>a</sup>  | 39.00 ± 9.97 <sup>a</sup>  |
| DN          | 130.6 ± 21.47 <sup>a</sup>  | 36.60 ± 15.45 <sup>a</sup> |

Los valores representan el promedio ± SD. En todos los casos, se realizó la prueba ANOVA entre los tratamientos. Se aplicó la prueba de Tukey, letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos ( $p < 0.05$ ). Dieta obesogénica + inclusión de extracto de té verde 400 mg/kg (DA), Dieta obesogénica + inclusión de extracto de té verde 200 mg/kg (DB), Dieta obesogénica (DO) y Dieta Normal (DN).

Sin embargo, en otros estudios como el que realizó Friedrich et al. (2012), en un experimento con dietas con 40% de energía de grasa en animales suplementando por corto plazo (4-7 días) con EGCG (Epigallocatequina - 3- galato, marca TEAVIGO), con diferentes dosis (0.25 y 0.5% p/p), consiguió una pérdida de peso y reducción de grasa corporal, explicando que el efecto de antiobesidad se debería a la disminución de la digestibilidad de los alimentos que afecta el metabolismo del sustrato en la mucosa intestinal y el hígado, lo que llevaría a una mayor oxidación de grasa posprandial y a una menor incorporación de lípidos provenientes de la dieta a los tejidos, siendo que aumentó la excreción de energía, la pérdida fecal estuvo acompañada por una mayor excreción de grasa y nitrógeno. Similar interpretación, tuvieron Hamdaoui et al. (2016), al obtener aumento de la excreción fecal de triglicéridos con la consiguiente reducción del peso corporal en ratas alimentadas con dieta alta en grasa a las que administraron vía oral extracto de té verde (50 g hojas té verde / litro obtenido con 15 min. de cocción), en un volumen de 28 ml/día por rata durante 10 semanas, afirmando que el consumo de extracto de té verde puede tener efectos beneficios para la salud. Zhang et al. (2018), aplicaron dosis de polifenoles del té verde (0.1% p/p), también provocaron una disminución significativa del peso en un modelo de ratones inducidos a obesidad con dietas altas en grasa (60 % calorías de grasa), en un período de 8 semanas.

En un estudio longitudinal con humanos, 11 mujeres con obesidad grado III recibieron suplementos con 450 mg/día de galato de epigallocatequina (EGCG) – extracto de té verde descafeinado, por un período de ocho semanas consiguiendo efectos positivos en la

expresión génica de UCP 3 pero no se obtuvo pérdida de peso y no se alteraron los parámetros antropométricos (Quinhoneiro et al. 2018).

Según los estudios recientes mencionados, la administración del té verde, en sus diferentes presentaciones puede lograr reducir el peso, sin embargo, los resultados reportados son contradictorios y en esta investigación (Cuadros 8 y 9), no se consiguió evidenciar tal situación, la misma se apoya en pruebas realizadas en humanos, existiendo así un contraste entre los diversos estudios, que aún debe ser materia de análisis.

## **4.2 CONSUMO DE ALIMENTO**

La Etapa I, duró 30 días con dietas obesogénicas altas en grasa, el resultado del consumo de alimento promedio realizado por cada animal no presentó diferencias estadísticas al finalizar ese período, sin embargo, al finalizar la Etapa II (Cuadro 10), luego de aplicar tanto la dosis alta de extracto de té verde (400 mg/kg de peso corporal) y dosis baja de extracto de té verde (200 mg/kg de peso corporal), sí consiguió diferencia significativa ( $p$  value =0.002), específicamente con el grupo de animales que en este tiempo recibieron una dieta normal (dieta sin suplementación de manteca), pero no alcanzó diferencia con el grupo ratas que continuaron recibiendo dieta alta en grasa (ratas obesas), probablemente la manteca haya causado algún efecto en la ingesta del alimento.

Los resultados mostrados en el Cuadro 10, coinciden con diversos estudios en animales que tampoco lograron encontrar diferencias significativas en el consumo del alimento durante la aplicación de té verde, independientemente de la dosis que decidieran aplicar, es el caso de lo reportado por, Chen et al. (2011), al administrar a ratones machos una suplementación dietética de EGCG (3.2g/kg de dieta), en un experimento que duró 17 semanas, en el que la dieta variaba entre tratamientos en cuanto al contenido de grasa y micronutrientes, o a los reportados por Sae – Tan et al. (2011), que estudiaron el aumento del peso corporal y marcadores de diabetes tipo II en ratones con dietas con alto contenido de grasa (60% de calorías provenientes de grasa), y no observaron efecto de la administración de EGCG en el aumento de peso corporal, consumo de alimento, ni en los marcadores de diabetes tipo II luego de ser alimentados por 16 semanas. Cuando se administraron por vía oral, 28 ml/día de un extracto simple de té verde obtenido por la cocción de 50 g hojas té verde / litro durante 15 min. de cocción, a ratas por 10 semanas, Hamdaoui et al. (2016), no encontraron tampoco diferencia significativa en la ingesta de alimento con el grupo control.

Sugiriendo que la cantidad de alimento consumida, la misma que tampoco presentó diferencias en los tratamientos en este experimento (Cuadro 10), no es responsable de la reducción de peso que sí consiguieron algunos autores.

**Cuadro 10: Consumo de alimento al finalizar cada etapa**

| TRATAMIENTO | CONSUMO DIARIO (g)          |                              |
|-------------|-----------------------------|------------------------------|
|             | ETAPA I                     | ETAPA II                     |
| DO + DA     | 19.663 ± 1.58 <sup>a</sup>  | 18.787 ± 2.016 <sup>b</sup>  |
| DO + DB     | 18.413 ± 1.967 <sup>a</sup> | 17.611 ± 1.615 <sup>b</sup>  |
| DO          | 19.736 ± 1.452 <sup>a</sup> | 19.302 ± 0.842 <sup>ab</sup> |
| DN          | 20.005 ± 1.434 <sup>a</sup> | 21.663 ± 0.600 <sup>a</sup>  |

Los valores representan el promedio ± SD. En todos los casos, se realizó la prueba ANOVA entre los tratamientos. Se aplicó la prueba de Tukey, letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos ( $p < 0.05$ ). Dieta obesogénica + inclusión de extracto de té verde 400 mg/kg (DA), Dieta obesogénica + inclusión de extracto de té verde 200 mg/kg (DB), Dieta obesogénica (DO) y Dieta Normal (DN).

#### 4.3 PERFIL LIPÍDICO

Los resultados de los niveles de triglicéridos (TG) y Lipoproteínas de alta densidad (HDL o C-HDL) en sangre, tanto para la Etapa 0, Etapa I y Etapa II, no lograron alcanzar diferencias estadísticas, su p value fue mayor a 0.05, los datos promedios de cada tratamiento se muestran en el Cuadro 11 y 12.

**Cuadro 11: Niveles de triglicéridos en sangre al finalizar cada etapa**

| TRATAMIENTO | TRIGLICÉRIDOS (mg/dl)      |                            |                            |
|-------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
|             | ETAPA 0                    | ETAPA I                    | ETAPA II                   |
| DO + DA     | 50.29 ± 5.56 <sup>a</sup>  | 98.95 ± 32.4 <sup>a</sup>  | 64.29 ± 19.88 <sup>a</sup> |
| DO + DB     | 59.57 ± 12.50 <sup>a</sup> | 82.71 ± 18.98 <sup>a</sup> | 53.14 ± 6.31 <sup>a</sup>  |
| DO          | 49.8 ± 6.57 <sup>a</sup>   | 65.80 ± 15.19 <sup>a</sup> | 60.80 ± 15.24 <sup>a</sup> |
| DN          | 51.4 ± 4.83 <sup>a</sup>   | 74.00 ± 27.4 <sup>a</sup>  | 57.40 ± 8.91 <sup>a</sup>  |

Los valores representan el promedio ± SD. En todos los casos, se realizó la prueba ANOVA entre los tratamientos. Se aplicó la prueba de Tukey, letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos ( $p < 0.05$ ). Dieta obesogénica + inclusión de extracto de té verde 400 mg/kg (DA), Dieta obesogénica + inclusión de extracto de té verde 200 mg/kg (DB), Dieta obesogénica (DO) y Dieta Normal (DN).

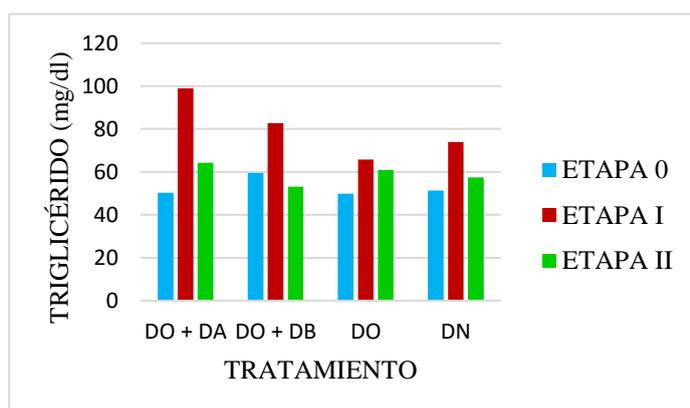
**Cuadro 12: Niveles de c-HDL en sangre al finalizar cada etapa**

| TRATAMIENTO | c-HDL (mg/dl)               |                           |                            |
|-------------|-----------------------------|---------------------------|----------------------------|
|             | ETAPA 0                     | ETAPA I                   | ETAPA II                   |
| DO + DA     | 38.86 ± 4.91 <sup>b</sup>   | 37.14 ± 6.47 <sup>a</sup> | 35.57 ± 8.87 <sup>a</sup>  |
| DO + DB     | 48.29 ± 13.11 <sup>ab</sup> | 41.57 ± 6.83 <sup>a</sup> | 43.29 ± 5.47 <sup>a</sup>  |
| DO          | 55.80 ± 4.60 <sup>a</sup>   | 43.60 ± 4.22 <sup>a</sup> | 45.40 ± 10.64 <sup>a</sup> |
| DN          | 52.00 ± 10.12 <sup>ab</sup> | 37.20 ± 9.73 <sup>a</sup> | 41.20 ± 7.40 <sup>a</sup>  |

Los valores representan el promedio ± SD. En todos los casos, se realizó la prueba ANOVA entre los tratamientos. Se aplicó la prueba de Tukey, letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos ( $p < 0.05$ ). Dieta obesogénica + inclusión de extracto de té verde 400 mg/kg (DA), Dieta obesogénica + inclusión de extracto de té verde 200 mg/kg (DB), Dieta obesogénica (DO) y Dieta Normal (DN).

Sin embargo, se observan en la Figura 1, variaciones numéricas de las concentraciones de triglicéridos en el tiempo total que duró el experimento (72 días), demostrando que la dieta alta en grasa sí aumentó los niveles iniciales de los animales, al mismo tiempo que los valores logrados al finalizar la etapa de inducción a obesidad (Etapa I), fueron disminuidos por los tratamientos, encontrando una mayor disminución según el valor promedio de variación alcanzado por las dosis de té verde (dosis alta: 34.57 mg/dl y dosis baja: 29.57 mg/dl ) versus la dieta normal (16.6 mg/dl) y dieta obesogénica (5 mg/dl). Cunha et al (2013), consiguieron resultados similares en los niveles de triglicéridos séricos y colesterol total, sin embargo, sus niveles de c-HDL sérico en el grupo de dieta alta en grasa con extracto de té verde (0.1 ml de agua más 400 mg extracto de té verde/kg de peso corporal/día) en comparación con el grupo de dieta alto en grasa (0.1ml de agua/día) en un tiempo de dos meses, si mostraron un incremento significativo en comparación con la dieta alta en grasa. Así como en un estudio anterior realizado por Raederstorff et al. (2003), investigando la respuesta a la dosis y el mecanismo de acción del epigallocatequina – 3 - galato (EGCG) sobre estos parámetros en ratas Wistar, alimentadas con una dieta alta en colesterol y grasa que contenía tres concentraciones diferentes de dosis de EGCG: 0,25% (0,2 g / día / kg de peso corporal), 0,5% (0,4 g / día / kg de peso corporal) y 1,0% (0,7 g / día / kg de peso corporal), observaron que después de 4 semanas de tratamiento, los triglicéridos plasmáticos y los niveles de lipoproteínas de alta densidad no cambiaron significativamente en ninguno de sus tratamientos. Un resultado positivo en cuanto a la disminución significativa en los niveles de triglicéridos pero no c- HDL, mostraron Snoussi et al. (2014), empleando dosis aguda del extracto de

hojas de té verde cocidas en ratas que recibieron una dieta alta en grasa (22% grasa) por 6 semanas, lo mismo que Hamdaoui et al. (2016), al emplear vía oral un volumen de 28 ml/día por rata durante 10 semanas, de extracto de té verde (50 g hojas té verde / litro obtenido con 15 min de cocción) lograron disminuir significativamente los niveles de triglicéridos plasmáticos y colesterol total, pero no el nivel de c-HDL.



**Figura 1: Niveles de triglicéridos en sangre por etapa**

Las evidencias de los últimos estudios citados antes, refuerzan los resultados de esta investigación, que a pesar de tener efecto el té verde en combatir la obesidad obtenida con dietas altas en grasa, los niveles de c-HDL se mantienen en su mayoría sin variación tal cual se observa en el Cuadro 12, demostrando que no existe una regulación asociada con la remoción del exceso de colesterol proveniente de los tejidos periféricos; cabe indicar, que el c-HDL es conocido por ser protector contra las enfermedades cardiovasculares, extrae colesterol de las lesiones ateroscleróticas y lo transporta hasta el hígado para su posterior metabolismo y eliminación intestinal junto con las heces (Maldonado et al. 2012).

Sin embargo existen casos, en que la administración de extracto de té verde rico en catequinas (30%), aplicado en ratas hembras Sprague Dawley con dosis al 1% y 3 % de catequinas (GT), en un dieta alta en grasa (40% calorías de grasa), logran resultados no significativos en los niveles de c-HDL y colesterol total con dosis al 1% de GT, aunque, cuando emplearon dosis al 3% GT, incrementaron el nivel de colesterol y c-HDL, estos resultados se obtuvieron luego de 4 semanas de alimentación, es preciso señalar que a pesar de ello, se consiguió reducir significativamente los triglicéridos en todos los

tratamientos (Suziki et al. 2012), por otro lado, Hashem et al. (2018), estudiando ratas albinas machos que consumieron una dieta alta en grasa (60% grasa) y una dosis de extracto de té verde (300 mg/kg de peso corporal) en 1 ml de agua destilada por sonda diariamente durante 45 días, lograron encontrar diferencias en la disminución de triglicéridos y aumento de HDL significativamente en comparación con el grupo obeso.

#### **4.4 ÍNDICE DE LEE**

El peso y la longitud corporal fueron utilizados para obtener el Índice de Lee, que es un predictor de obesidad, empleado en diversos estudios como Xu et al. (2015), que demostraron el efecto antiobesidad de los polisacáridos, polifenoles y cafeína del té verde en ratas Sprague-Dawley alimentadas con una dieta rica en grasas durante seis semanas. Por su parte Liu et al. (2016), evaluaron el efecto modulador de infusiones de té verde, té oolong y té negro en microbiota intestinal en ratones obesos con alto contenido de grasa (45% de energía proveniente de grasa) en un tiempo de trece semanas. Wu et al. (2016), realizaron un estudio de los polifenoles y polisacáridos del té negro que mejoran la composición corporal, aumentan el ácido graso fecal y regulan el metabolismo de las grasas en ratas obesas inducidas por una dieta alta en grasas en un tiempo de 2 semanas, confirmando su grado de obesidad mediante el Índice de Lee.

Del mismo modo existen otros estudios que emplearon este parámetro antropométrico para establecer su modelo obesogénico con dietas altas en grasa; es el caso, De Araújo et al. (2016), que evaluaron los efectos de la ingestión de beta-glucanos (*Saccharomyces cerevisiae*) en el metabolismo de ratas que reciben una dieta alta en grasas (20% grasa de cerdo) durante 60 días.

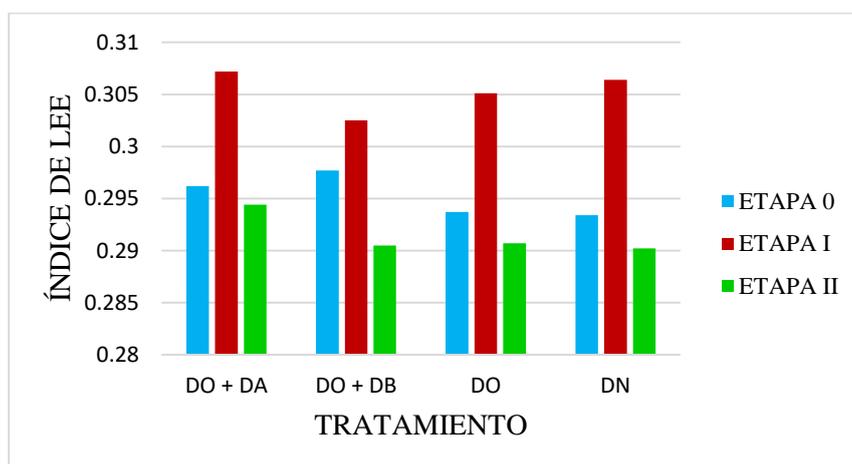
De acuerdo a los estudios antes mencionados, el Índice de Lee, es frecuentemente usado en modelos de inducción a obesidad, por ello fue empleado en este estudio, obteniendo los datos que se muestran el Cuadro 13, que señalan que las ratas al finalizar la Etapa I, consiguieron la condición de obesas, pero al finalizar la Etapa II sus valores promedio fueron menores a 0.300 (Figura 2), muy independiente del tratamiento aplicado, demostrando que retomaron a su condición de no obesas tal cual fueron al iniciar el experimento, estos resultados probablemente se deban a que se empleó una cánula orogástrica en los 4 tratamientos, dosis acuosa de extracto de té verde (alta y baja) así

como el agua de mesa para las ratas que recibieron dieta alta en grasa y dieta normal, la decisión fue tomada con el fin de estandarizar la situación y reducir cualquier efecto de estrés ocasionado por la cánula en el animal, sin embargo, Rains et al. (2011), realizaron una revisión de varios estudios que evalúan el efecto antiobesidad brindado por el té verde, indicando que el grado de influencia se debe a diversos mecanismos, dentro de ellos mencionan, el método de ingesta (por ejemplo, estómago vacío o lleno, suplemento, bebida preparada, etc.) y la duración de la ingesta entre otros, pudiendo haberse presentado efecto del uso de cánula orogástrica.

**Cuadro 13: Valores del Índice de Lee al finalizar cada etapa**

| TRATAMIENTO | ÍNDICE DE LEE  |                |                |
|-------------|----------------|----------------|----------------|
|             | ETAPA 0        | ETAPA I        | ETAPA II       |
| DO + DA     | 0.2962 ± 0.004 | 0.3072 ± 0.005 | 0.2944 ± 0.005 |
| DO + DB     | 0.2977 ± 0.003 | 0.3025 ± 0.002 | 0.2905 ± 0.13  |
| DO          | 0.2937 ± 0.007 | 0.3051 ± 0.005 | 0.2907 ± 0.003 |
| DN          | 0.2934 ± 0.004 | 0.3064 ± 0.005 | 0.2902 ± 0.009 |

Los valores menores a 0.3000 se considera no obesa, valores iguales o mayores a 0.3000 se considera obeso. Los valores representan el promedio ± SD. Dieta obesogénica + inclusión de extracto de té verde 400 mg/kg (DA), Dieta obesogénica + inclusión de extracto de té verde 200 mg/kg (DB), Dieta obesogénica (DO) y Dieta Normal (DN).



**Figura 2: Valores del Índice de Lee por etapa**

#### 4.5 EXPRESIÓN RELATIVA DE UCP1, UCP3 Y PPAR alfa

Basado en la distribución del tejido adiposo blanco, se analizó para observar los resultados del efecto de las dosis de extracto de té verde (baja y alta) en ratas macho

inducidas a obesidad, el tejido adiposo blanco subcutáneo (región inguinal), sin embargo, los resultados observados no indicaron variaciones en la expresión para la UCP1. Villarroya et al. (2007), indican que el gen UCP1 está bajo el control dual de PPAR  $\gamma$  y PPAR  $\alpha$  en relación con la diferenciación de adipocitos marrones y la oxidación de lípidos, respectivamente. Así como, Boström et al. (2012), que demostraron que el PGC1- $\alpha$ , un cofactor transcripcional del PPAR  $\gamma$ , aumenta la expresión de FNDC5, una proteína de membrana que se escinde y secreta como una hormona recientemente identificada, la irisina, que actúa sobre las células adiposas blancas en cultivo e in vivo para estimular la expresión de UCP1, con efecto similar a la grasa marrón, dando como resultado mejoras en la obesidad y la homeostasis de la glucosa. Según lo antes mencionado, se indican los siguientes estudios que difieren en la expresión de UCP1, de acuerdo al tejido graso seleccionado, como Sae – tan et al. (2015), que no lograron obtener diferencias significativas en la expresión de UCP1 (medido a nivel de ARNm en el depósito adiposo visceral (epididimal) cuando administraron dosis de (7.7 g/ de extracto de té verde descafeinado rico en EGCG) en ratones alimentados con dietas altas en grasas y sólo cuando este tratamiento se combinó con ejercicio pudo obtener mayor diferencia estadística (el tratamiento en los ratones machos duró 16 semanas), asimismo, no encontró diferencias con la expresión de PPAR  $\gamma$ ); sin embargo, Chen et al. (2017), empleando ratas macho Sprague Dawley y analizando el tejido graso visceral (epididimal), lograron que la expresión de ARNm de la UCP1 fuera significativamente más alta en los grupos tratados con dos tipos de dosis de extracto de té verde (77.5 mg / kg / día, y con 155 mg / kg / día) y dieta alta en energía (% elevados de sacarosa, fructosa y lípidos), el extracto de polvo té verde empleado contenía 96.6% de polifenoles totales y 1,8% de cafeína, que fue disuelto 1 ml de agua destilada y administrado por vía oral a los grupos por sonda durante ocho semanas.

En un estudio en humanos, la suplementación con extracto de té verde descafeinado (450 mg de EGCG), aplicado durante 8 semanas en mujeres con obesidad grado III, los niveles de UCP1 permanecieron inalterados, pero si se reguló de forma positiva la UCP3, que puede funcionar como un mecanismo de adaptación, lo que justificaría el mantenimiento del peso corporal, los resultados pertenecen al análisis en muestras de tejido adiposo blanco subcutáneo (Quinhoneiro, et al. 2018). En otro estudio, se evidenció que al administrar catequinas del té verde (100mg/kg de peso corporal), en dietas altas en grasa (15% grasa saturada, 1 % colesterol y 84% dieta estándar), disminuye la expresión de

PPAR $\gamma$  en el tejido adiposo blanco visceral (mesentérico) pero se incrementa la expresión en el tejido adiposo blanco subcutáneo, lo cual no concuerda, con sus resultados de incremento de la expresión de la UCP1 en el tejido blanco subcutáneo y visceral (Yan et al. 2013), según lo mencionado, existen discrepancias de expresión de la UCP1 y van de acuerdo al tejido graso blanco seleccionado para en el análisis, situación que podría ser tomada en consideración para los resultados obtenidos de la UCP1 cuando las ratas recibieron dosis alta y baja de extracto de té verde (400 mg/ kg y 200 mg/kg).

Por otro lado, Neyrinck et al. (2017), realizaron un estudio en ratones obesos inducidos con una dieta alta en grasa (60%) para determinar el efecto antiobesidad del extracto de hojas de té verde (95% polifenoles) asociado con la activación del pardeamiento en el tejido graso blanco subcutáneo, observando mayor expresión de UCP1 en el tratamiento que recibió la dosis del extracto de polifenoles del té verde con una dieta alta en grasa en comparación del grupo que recibió sólo la dieta alta grasa, así como obtuvieron una disminución de peso significativa del tejido adiposo blanco subcutáneo y epididimal, el experimento duró 8 semanas. Este último estudio, brinda información que no coincide con los resultados obtenidos en la investigación en cuestión (dosis alta y baja de extracto de té verde), estableciéndose un amplio tema en debate, debido que se planteó el efecto del té verde en termogénesis (expresión UCP1) en el tejido blanco, muy independiente de cual fuese su ubicación, los estudios debatidos anteriormente, hacen ver que existe gran diferencia de expresión aún dentro del mismo tejido blanco.

A partir de una revisión de la literatura realizada, Yang et al. (2015), proponen que el té verde presenta dos mecanismos principales de acción: primero, disminución de la absorción de lípidos y proteínas por los constituyentes del té en el intestino, reduciendo así la ingesta de calorías; segundo, activación de la AMPK (proteína quinasa activada por monofosfato de adenosina) por efecto de los polifenoles del té que están biodisponibles en el hígado, el músculo esquelético y los tejidos adiposos, esta última vía, fue demostrada por Li et al. (2018), cuando el EGCG disminuyó la obesidad y ganancia de peso del tejido adiposo blanco a través de la activación de AMPK en ratones. Considerando, la importancia del hígado por ser un órgano vital para el procesamiento metabólico de diferentes nutrientes, y el órgano principal para la lipogénesis y la gluconeogénesis, así como el músculo que es el sitio principal de producción de ATP y consumo de energía; los análisis se basaron en los siguientes tejidos para expresión génica

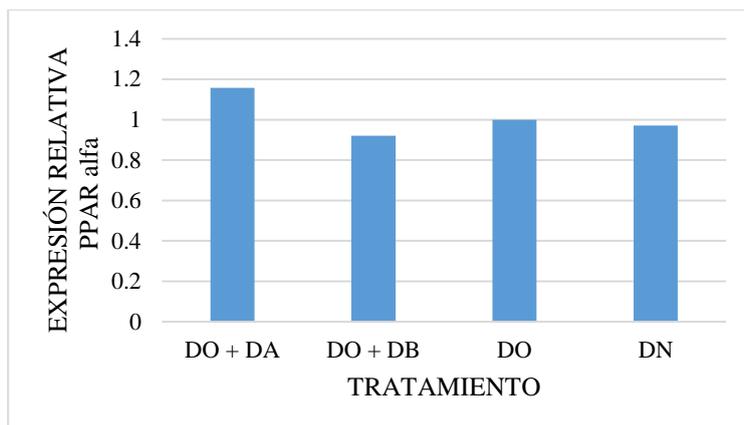
relativa de PPAR alfa en el tejido de hígado y UCP3 en el tejido muscular (*musculus gastrocnemius*).

En el Cuadro 14, se muestran los valores promedio de expresión relativa de PPAR alfa, observando que no existen diferencias estadísticas en los tratamientos que recibieron una dieta obesogénica con inclusión de dosis alta o baja de extracto de té verde (Figura 3), comparadas con el tratamiento que recibió sólo dieta alta en grasa, siendo estos datos similares a los reportados por Yan et al. (2013), al medir el efecto de las catequinas del té verde (98% de pureza) para prevenir la obesidad a través de la modulación de los PPARs, en ratas inducidas a obesidad con dietas altas en grasa, que no encontraron incrementos de los valores del PPAR alfa medidos en el hígado. Sin embargo, Sae – Tan et al. (2013), sí lograron obtener diferencias significativas en la expresión de PPAR alfa (medido en los tejidos de hígado de ratones) cuando administraron dosis de extracto de té verde descafeinado en un grupo alimentado con dietas altas en grasas comparadas con el grupo control (dieta alta en grasa), por un período de 16 semanas. Así como, Chen et al. (2009), cuando estudiaron en ratas alimentadas con alto contenido de grasa por un tiempo de 24 semanas, con dosis oral de té verde (2 g de té verde por litro) y demostraron un aumento de expresión de PPAR alfa (hígado) pero cuando emplearon Epigallocatequina-3-galato (1 mg/kg por día), no tuvo efecto en la expresión del gen.

**Cuadro 14: Expresión relativa del gen PPAR alfa en tejido de hígado al finalizar la etapa II**

| <b>TRATAMIENTO</b> | <b>EXPRESIÓN GÉNICA RELATIVA</b> |
|--------------------|----------------------------------|
| DO + DA            | 1.1582                           |
| DO + DB            | 0.9198                           |
| DO                 | 1                                |
| DN                 | 0.9708                           |

Los valores representan el promedio de acuerdo a los datos brindados por el método de Pfafft et al. (2012) con la aplicación del programa REST para expresión génica relativa. Dieta obesogénica + inclusión de extracto de té verde 400 mg/kg (DA), Dieta obesogénica + inclusión de extracto de té verde 200 mg/kg (DB), Dieta obesogénica (DO) y Dieta Normal (DN).



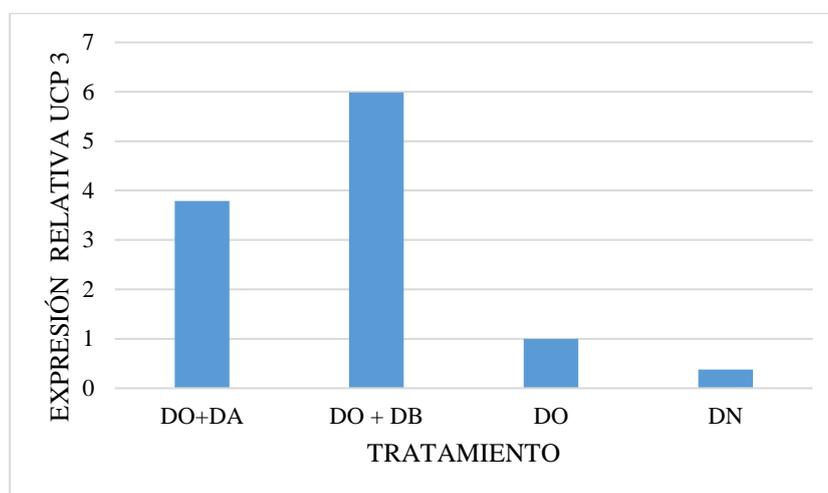
**Figura 3: Expresión relativa del gen PPAR alfa en tejido de hígado al finalizar la etapa II**

En el Cuadro 15, se muestra la expresión relativa de UCP3, que alcanzó mayor incremento de expresión numérica cuando se aplicó la dosis alta y baja de extracto de té verde en comparación con el grupo obeso, siendo mayor el valor con 200 mg/ kg de extracto de té verde (dosis baja), sin embargo, no fue suficiente para alcanzar diferencia estadísticas, estos resultados coinciden con lo indicado por, Serrano et al. (2012), que reportan que la ingesta dietética de polifenoles del té (principalmente EGCG) verde reguló la sensibilidad a la insulina con un aumento en el contenido de proteína quinasa activada por AMP y cambios en los complejos respiratorios mitocondriales, sin que la UCP3 analizada en el músculo esquelético (*rectus femoris*), tuviese diferencias en su expresión. En otro estudio llevado a cabo por, Chen et al. (2009), la UCP3 no logró diferencias de expresión en el tejido muscular (cuadriceps), al evaluar el efecto de dosis de té verde (2 g de té verde por litro) y Epigallocatequina-3-galato (1 mg/kg por día) en ratas alimentadas con alto contenido de grasa. Sin embargo, Sae – Tan et al. (2011), observaron que el efecto de EGCG en el aumento de peso corporal y en los marcadores de diabetes tipo II en ratones con alto contenido de grasa (60% de calorías provenientes de grasa), están asociados con una mayor expresión de genes relacionados con la oxidación de ácidos grasos en el músculo esquelético, demostrando aumento en los niveles de UCP3, los resultados se obtuvieron luego de 16 semanas.

**Cuadro 15 : Expresión relativa del gen UCP 3 en tejido muscular al finalizar la etapa II**

| TRATAMIENTO | EXPRESIÓN GÉNICA RELATIVA |
|-------------|---------------------------|
| DO + DA     | 3.789                     |
| DO + DB     | 5.99                      |
| DO          | 1                         |
| DN          | 0.38                      |

Los valores representan el promedio de acuerdo a los datos brindados por el método de Pfafft et al. (2012) con la aplicación del programa REST para expresión génica relativa. Dieta obesogénica + inclusión de extracto de té verde 400 mg/kg (DA), Dieta obesogénica + inclusión de extracto de té verde 200 mg/kg (DB), Dieta obesogénica (DO) y Dieta Normal (DN).



**Figura 4: Expresión relativa de UCP 3 en tejido muscular al finalizar la etapa II**

## V. CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos bajo las condiciones en que fue desarrollado el presente estudio, se concluye:

1. La expresión génica relativa de la UCP1 analizada en el tejido adiposo blanco subcutáneo (región inguinal) no mostró diferencias, por otro lado, la UCP3 (tejido del músculo - *musculus gastrocnemius*), demostró tendencias a incrementar la expresión comparada con el grupo obeso cuando los tratamientos recibieron dosis alta y baja de extracto de té verde, situación que no ocurrió con el PPAR alfa (tejido de hígado) donde sólo la dosis alta de extracto de té verde brindó valores mayores al grupo obeso pero no alcanzó diferencias estadísticas.
2. Los niveles de triglicéridos en sangre disminuyeron numéricamente en todos los tratamientos y en el caso de los tratamientos con extracto de té verde su efecto fue mayor en comparación con los que sólo recibieron una dieta alta en grasa, los niveles de c-HDL no presentaron diferencias estadísticas en todos los tratamientos.
3. El peso corporal y el consumo de alimento no demostraron diferencias significativas entre los tratamientos con una dieta alta en grasa y dosis diferentes del extracto de té verde.

## **VI. RECOMENDACIONES**

Tomando como base los resultados obtenidos, se propone las siguientes recomendaciones:

- Comparar el efecto de los polifenoles y epigallocatequina- 3- galato del té verde proveniente de la ciudad de Cuzco, en diferentes dosis sobre el peso corporal y el perfil lipídico.
- Realizar evaluaciones morfológicas de los tejidos adiposos en sus diferentes ubicaciones y observar el cambio por efecto del extracto de té verde.
- Evaluar el efecto de PPAR $\gamma$  en relación a la expresión de UCP1 en tejido graso blanco subcutáneo y visceral cuando se administra té verde en animales inducidos a obesidad.

## VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aguilar, C. A. 2002. Las proteínas desacoplantes en la patogenia de la obesidad. Revista de Endocrinología y Nutrición, 10(3): 165 - 170.

Arya, M., Shergill, I., Williamson, M., Gommersall, L., Ayra, N., Patel, H. 2005. Basic principles of real time quantitative PCR. Expert Review of Molecular Diagnostics, 5(2): 209 -219.

Benzie, I. F., & Strain, J. J. 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. Analytical biochemistry, 239(1): 70-76.

Biere, J., Tohá, C. 2007. Comparación de la eficiencia hipolipemiante de *Commiphora mukul* y *Monascus purpureus* en ratas. Universidad de Chile Facultad de Medicina Escuela de Kinesiología.

Blancas, G., Almanza, J., López, R., Alarcón, F., García, R., Cruz, M. 2010. La obesidad como un proceso inflamatorio. Boletín médico del Hospital Infantil de México, 67(2): 1665 – 1146.

Blanco, A. 2007. Obesidad y respuesta inflamatoria. Boletín de la sociedad de pediatría de Asturias, Cantabria, Castilla y León, 47:237 -249.

Bonet, M. L., Oliver, P., Palou, A. 2013. Pharmacological and nutritional agents promoting browning of white adipose tissue Biochimica et Biophysica Acta, 1831: 969–985.

Boström, P., Wu, J., Jedrychowski, M., Korde, A., Ye, L., Lo, J., Rasbach, K., Broström, E., Choi, J., Long, J., Kajimura, S., Zingaretti, M., Vind, B., Tu, H., Cinti, S., Hojlund, K., Gygi, S., Spiegelman, B. 2012. A Pgc1 –  $\alpha$ - dependent myokine that drives brown – fat – like development of white fat and thermogenesis. Nature, 481(7382): 463 – 468.

Bourges, R.H. 2003. La nutriología a partir de la «doble hélice». *Rev Invest Clin.*, 55: 220 - 6.

Brondani, L.A., Assmann, T.S., Souza, B.M., Boucas, A.P., Canani, L.H., Crispim, D. 2014. Meta – analysis reveals the association of common variants in the coupling protein (UCP) 1-3 genes with body mass index variability. *PLos. One*, 9(5): 96411.

Brun, S., Carmona, M. C., Mampel, T., Viñas, O., Giralt, M., Iglesias, R., Villarroya, F. 1999. Activators of peroxisome proliferator – activated receptor – alpha induce the expression of the uncoupling protein – 3 gene in skeletal muscle – A potential mechanism for the lipid intake – dependent activation of uncoupling protein – 3 gene expression at birth. *Diabetes*, 48(6): 1217 - 1222.

Caicedo, M. 2012. Caracterización del perfil lipídico como uno de los factores de riesgo cardiovascular en los trabajadores usuarios evaluados por una institución de salud ocupacional. Bogotá 2007-2009. Universidad Nacional de Colombia Facultad de Enfermería.

Cámara, Y. 2005. Estudio funcional de la proteína desacopladora mitocondrial UCP3 en relación con la apoptosis y las especies reactivas de oxígeno. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de Barcelona, España.

Cardozo CA., Mrad, A., Martínez, C., Rodríguez, E., Lolas, F. 2007. El animal como sujeto experimental: Aspectos técnicos y éticos. Centro Interdisciplinario de Estudios en Bioética de la Universidad de Chile.

Carvajal, K., Hernández, M., Moreno, R. 2007. PPARs, síndrome metabólico y enfermedad cardíaca. *Medigraphic Artemisa en línea Archivos de Cardiología de México*, 77 Supl. 4/Octubre-Diciembre: S4, 66-76.

Cedikova, M., Kripnerová, M., Dvorakova, J., Pitule, P., Grundmanova, M., Babuska, V., Mullerova, D., Kuncova, J. 2016. Mitochondria in white, brown, and beige adipocytes. *Stem Cell International*, 2016: 1 - 11.

Chacko, S.M., Thambi, P., Kuttan, R., Nishigaki, I., 2010. Beneficial effects of green tea: A literature review. *Journal Chinese Medicine*, 5(1):13.

Chen, I.J., Liu, C.Y., Chiu, J.P., Hsu, C.H. 2016. Therapeutic effect of high-dose green tea extract on weight reduction: A randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial. *Clinical Nutrition*, 35: 592 - 599.

Chen, L., Chien, Y., Liang, C., Chan, C., Fan, M., Huang, H. 2017. Green tea extract induces genes related to browning of white adipose tissue and limits weight – gain in high energy diet – fed rat. *Food Nutrition Research*, 61(1): 1654 – 6628.

Chen, N., Bezzina, R., Hinch, E., Lewandowski, P., Cameron – Smith, D., Mathai, M., Jois, M., Sinclair, A., Begg, D., Wark, J., Weisnger, H., Weisinger, R. 2009. Green tea, black tea, and epigallocatechin modify body composition, improve glucose tolerance, and differentially alter metabolic gene expression in rats fed a high-fat diet. *Nutrition Research*, 29(11): 784 – 793.

Chen, Y., Cheung, C., Reuhl, K., Ba Iu, A., Lee, M., Lu, Y., Yang, C. 2011. Effects of green tea polyphenol (-) - epigallocatechin-3-gallate on a newly developed high-fat/western-style diet induced obesity and metabolic syndrome in mice. *J. Agric. Food. Chem*, 59(21): 11862 – 11871.

Choo, J.J. 2003. Green tea reduces body fat accretion caused by high fat diet in rats through activation of  $\beta$ -adrenergic receptors thermogenesis in brown adipose tissue. *Journal Nutritional Biochemistry*, 14 (11): 671- 676.

Cinti, S. 2002. Adipocyte differentiation and transdifferentiation: plasticity of the adipose organ. *Journal of Endocrinological Investigation*, 25: 823–835.

Cordero, P., Solomon, A., Martínez, J.A. 2007. Eficiencia y metabolismo mitocondrial: ¿un eje etiológico de la obesidad?. *Rev. Med. Univ. Navarra*, 51(3):13 – 18.

Coronado, M., Vega y León, S., Gutiérrez, R., Pérez, G., Peláez, K. 2011. Nutrigenética aplicada: Dieta personalizada y formación académica para la práctica profesional. *Revista Chilena de Nutrición*, 38 (4): 492 - 500.

Cunha, C.A., Lira, F. Rosa, J., Pimentel, G.D., Souza, G., Da Silva, C., De Souza, C.T., Ribeiro, E.B., Sawaya, A.C., Oller Do Nascimento, C.M., Rodrigues, B., De Oliveira, P., Oyama, L. 2013. Green tea extract supplementation induces the lipolytic pathway,

attenuates obesity, and reduces low – grade inflammation in mice fed a high – fat diet. *Mediators of inflammation*, 8.

D' Otencio, A., Navigante, A. 2016. Disfunción mitocondrial y enfermedades cardiovasculares. *Insuficiencia cardíaca* 11(4): 201 - 214.

De Araújo, T., Andrade, E., Lobato, R., Orlando, D., Gomez, N., De Sousa, R., Pereira, L. 2016. Effects of beta – glucans ingestión (*Saccharomyces cerevisiae*) on metabolism of rats receiving high fat dieta. *Journal of animal physiology and animal Nutrition*, 101(2): 349 – 358.

Dulloo, A. G., Seydoux, J., Girardier, L., Chantre, P., Vandermander, J. 2000. Green tea and thermogenesis: interactions between catechin polyphenols, caffeine and sympathetic activity. *International Journal of Obesity*, 24: 252 – 258.

Eu, C., Lim, W., Ton, S., Kadir, K. 2010. Glycyrrhizic acid improved lipoprotein lipase expression, insulin sensitivity, serum lipid and lipid deposition in high – fat diet – induced obese rats. *Lipids in Health and Disease*, 9: 81.

Faut, M. 2014. Rol de los receptores nucleares activados por proliferadores peroxisomales gamma frente al exceso de andrógenos durante la foliculogénesis temprana. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Friedrich, M., Petzke, k., Raederstorff, D, Wolfram, S., Klaus, S. 2012. Acute effects of epigallocatechin gallate from green tea on oxidation and tissue incorporation of dieta lipids in mice fed a high fat diet. *International journal of obesity*, 36: 735 – 743.

Gamboa, R., Huesca, C., López, V., Posadas, R., Cardoso, G., Medina, A., Juárez, J.G., Soto, M., Posadas, C., Vargas, G. 2018. The UCP2 – 866G/A, Ala55Val and UCP3 – 55C/T polymorphisms are associated with premature coronary artery disease and cardiovascular risk factors in Mexican population. *Genet. Mol. Biol*, 41(2).

Gómez, A. E. 2007. Nutrigenómica y nutrigenética. La relación entre la alimentación, la salud y la genómica *Ámbito farmacéutico: Nutrición*. *Revista OFFARM*, 26 (4): 78 – 85.

Gómez, E., Flores, A. 2015. Genética en el tratamiento de la obesidad: Nutrigenética y nutrigenómica en la era de la medicina personalizada y preventiva. Máster en medicina cosmética y del envejecimiento. Universidad Autónoma de Barcelona. España.

Gong, D.W., He, Y., Karas, M., Reitman, M. 1997. Uncoupling Protein-3 Is a Mediator of Thermogenesis Regulated by Thyroid Hormone,  $\beta$ 3-Adrenergic Agonists, and Leptin. *Journal of biological chemistry*, 272(39); 24129 – 24132.

Gutiérrez, J. G., Meléndez, G., Zúñiga, A., Serralde, A. 2006. Genómica nutricional y obesidad. *Revista de endocrinología y Nutrición*, 14 (4): 247 – 256.

Hamdaoui, M., Snoussi, C., Dhaouadi, K., Fattouch, S., Ducroc, R., Le Gall, M., Bado, A. 2016. Tea decoctions prevent body weight gain in rats fed high – fat; black tea being more efficient than green tea. *Journal of Nutrition Intermediary Metabolism*, (6): 33 - 40.

Harms, M., Seale, P. 2013. Brown and beige fat: development, function and therapeutic potential. *Nature Medicine*, 29(10):1252 – 1263.

Hashem, M., Nasr El Deen, N., Ghareeb, O. 2018. Biochemical effects of ginger and/or green tea extracts in high fat diet – induced obese rats. *Solv. Vet. Res.*, 55(Suppl 20): 241 – 249.

Hernández, R. J. 2018. La obesidad y la inflamación crónica de bajo grado. *Revista Cubana de Endocrinología*, 29 (3).

Instituto Nacional de Estadística e Informática (INEI). 2018. Perú: Enfermedades no transmisibles y transmisibles, 2017.

Izaola, O., De Luis, D., Sajoux, I., Domingo, J. C., Vidal, M., 2015. Inflamación y obesidad (lipoinflamación). *Nutr. Hosp.*, 31(6): 2352 – 2358.

Jia, J.J., Zhang, X., Ge, C.R., Jois, M., 2009. The polymorphisms of UCP2 and UCP3 genes associated with fat metabolism, obesity and diabetes. *Obesity Reviews*, 10(5): 519 – 26.

- Jin, D., Xu, Y., Mei, X., Meng, Q., Gao, Y., Li, B., Tu, Y. 2013. Antiobesity and lipid lowering effects of theaflavins on high-fat diet induced obese rats. *Journal of Functional Foods*, 5(3): 1142 – 1150.
- Lanni, A., Moreno, M., Lombardi, A., Goglia, F. 2003. Thyroid hormone and uncoupling proteins. *FEBS Letters*, 543, Issue 1-3, Pages 5–10.
- Lee, S., Kim, J. Lee, Y., Yang, S., Lee, I., Suh, J., Kim, S. 2011. Anti-obesity Effect of *Monascus pilosus* Mycelial Extract in High Fat Diet-induced Obese rats. *J. Appl. Biol. Chem.*, 54(3): 197-205.
- Li, F., Gao, C., Yan, P., Zhang, M., Wang, Y., Hu, Y., Wu, X., Wang, X., Sheng, J. 2018. EGCG reduces obesity and white adipose tissue gain partly through AMPK activation in mice. *Frontiers in Pharmacology*, (9): 1366.
- Liesa, M., Shirihai, O. 2013. Mitochondrial Dynamics in the regulation of nutrient utilization and energy expenditure. *Cell Metabolism* 17: 491 – 506.
- Lim, D. Kim, Y., Jang, Y., Kim, Y., Han, D. 2013. Anti-Obesity Effect of *Artemisia capillaris* Extracts in High-Fat Diet-Induced Obese Rats. *Molecules*, 18(8): 9241-9252.
- Liu, Z., Chen, Z., Guo, H., He, D., Zhao, H., Wang, Z., Zhang, W., Zhang, C., Ni, L. 2016. The modulatory effect of infusions of green tea, oolong tea, and black tea on gut microbiota in high – fat induced obese mice. *Food Function*, 7(12); 4869 – 4879.
- Maldonado, O., Ramírez, I., García, J., Ceballos, G., Méndez, E. 2012. Colesterol: Función biológica e implicaciones médicas. *Revista mexicana de ciencias farmacéuticas*, 43(2).
- Martínez, E., García, M., Campos, W., Gonzáles, K. 2013. Genómica nutricional: Conceptos y expectativas. *Revista de Endocrinología y Nutrición*, 21 (1): 22 – 34.
- Martínez, E., Sánchez, M., El Hafidi, M. 2005. Participación De la mitocondria en el desarrollo de estreses oxidativo en la obesidad. *Bioquímics*, 30(3): 82 – 89.
- Martínez, N., Mazzucco, M., Kurtz, M. 2011. El receptor activado por proliferadores perxisomales – alfa y su función reguladora del metabolismo lipídico fetal y placentario. *Revista SAEGRE*, 18(3).

Murray, A., Panagia, M., Hautons, D., Gibbons, G., Clarke, K. 2005. Plasma free fatty acids and peroxisome proliferator – activated receptor  $\alpha$  in the control of myocardial uncoupling protein levels. *Diabetes* 54(12):3496 -502.

National Institutes Of Health. 1998. Clinical Guidelines on the Identification, Evaluation, and Treatment of Overweight and Obesity in Adults. U.S.A. Report N° 98-4083.

Neyrinck, A., Bindels, L., Geurts, L., Van Hul, M., Cani, P., Delzenne, N. 2017. A polyphenolic extract from green tea leaves activates fat browning in high- fat- diet induced obese mice. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 49: 15 – 21.

Nguyen, K. D., Qiu, Y., Cui, X., Goh, Y.P., Mwangi, J., David, T., Mukundan, L, Brombacher, F., Locksley, R.M., Chawla, A. 2011. Alternatively activated macrophages produce catecholamines to sustain adaptive thermogenesis. *Nature*, 480 (7375): 104-8.

Nomura, S., Ichinose, T., Jinde, M., Kawashima, Y., Tachiyashiki, K. M., Imaizumi, K. 2008. Tea catechins enhance the mRNA expression of uncoupling protein 1 in rat brown adipose tissue. *Journal of Nutritional Biochemistry* 19: 840–847.

Novelli, E.L.B., Diniz, Y.S., Galhardi, C.M., Ebaid, G.M.X., Rodrigues, H.G., Mani, F., Fernandes, A.A., Cicogna, A.C., Novelli Filho, J.L. 2007. Anthropometrical parameters and markers of obesity in rats. *Laboratory Animals*, 41:111.

Organismo Mundial De La Salud. 2016. Nota descriptiva N° 311: Obesidad y sobrepeso.

Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) y la Fundación Iberoamericana de Nutrición (FINUT). 2012. Grasas y ácidos grasos en nutrición humana. Consulta de expertos. Estudio FAO Alimentación y nutrición 91. España. Pag.21.

Parreño, J., Gutiérrez, E. 2010. Colesterol y triglicéridos y su relación con el índice de masa corporal en pacientes adultos en Lima Metropolitana. *Revista de Investigación de la Universidad Norbert Wiener*, 59-74.

Pedraza, N., Rosell, M., Villarroya, J., Iglesias, R., Gonzalez, F., Solanes, G. Villarroya, F., 2006. Developmental and tissue – specific involment of peroxisome proliferator-activated receptor-  $\alpha$  in the control of mouse uncoupling protein- 3 gene expression. *Endocrinology* 147(10):4695 – 4704.

Pfaffl, M., Horgan, G., Dempfle, L. 2002. Relative expression software tool (REST) for group – wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real time PCR. *Nucleic Acids Research*, 30:9.

Pujol, M. E. 2005. Efectos del género, la localización anatómica del tejido y la situación hormonal sobre la capacidad lipolítica del tejido adiposo blanco. *Universitat de les Illes Balears – España*.

Quinhoneiro, D., Nicoletti, C., Pinhel, M., Noronha, N., Braga, C., Oliveira, B., Nonino, C. 2018. Green tea supplementation upregulates uncoupling protein 3 expression in severe obese women adipose tissue but does not promote wight loss. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 0963 – 7486.

Raederstorff, G., Schlachter, M., Elste, V., Weber, P. 2003. Effect of EGCG on lipid absorption and plasma lipid levels in rats. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 14: 326 – 332.

Rains, T., Agarwal, S., Maki, K. 2011. Antiobesity effects of green tea catechins: a mechanistic review. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 22: 1–7.

Ramadan, G., El-Beih, N., Abd El-Ghffar, E.A. 2009. Modulatory effects of black v. green tea aqueous extract on hyperglycaemia, hyperlipidaemia and liver dysfunction in diabetic and obese rats models. *British Journal of Nutrition*, 102: 1611 – 1619.

Ramsden, D. Ho, P., Ho, J., Liu, M., So, D., Tse, H., Chan, K. Ho, S. 2012. Humana neuronal uncoupling proteins 4 and 5 (UCP4 and UCP5): structural properties, regulation, and physiological role in protection against oxidative stress and mitochondrial dysfunction. *Brain and behavior*, 2(4): 468 – 478.

Reyes, M. 2010. Características inflamatorias de la obesidad. *Revista chilena de nutrición*, 37 (4): 498 – 504.

Rial, E., González, M. 2007. La proteína desacoplante UCP1 del tejido adiposo café: mecanismo, estructura, función y regulación. *Mensaje Bioquímico*, 31: 30 – 43.

Sae – Tan, S. Rogers, C., Lambert, J. 2013. Voluntary exercise and green tea enhance the expression of genes related to energy utilization and attenuate metabolic syndrome in high fat fed mice. *Molecular Nutrition & Research*, 58(5): 1156 – 1159.

Sae – Tan, S. Rogers, C., Lambert, J. 2015. Decaffeinated green tea and voluntary exercise induce gene changes related to beige adipocyte formation in high fat – fed obese mice. *Journal of functional Foods*, 14:210 – 214.

Sae -Tan, S., Grove, K., Kennett, M., Lambert, J. 2011. (-)-Epigallocatechin-3-gallate increases the expression of genes related to fat oxidation in the skeletal muscle of high fat – fed mice. *Food Funct.*, 2(2): 111 – 116.

Sandoval, A., Manzur, F., Gómez, D., Gómez, C. 2009. Receptores nucleares y metabolismo de lípidos: implicaciones cardiovasculares. *Revista Colombiana de Cardiología*, 16(1): 0120 – 5633.

Serrano, J. Gonzalo – Benito, H., Jové, M., Fourcade, S., Cassanyé, A., Boada, J., Delgado, M., Espinel, A., Pamplona, R., Portero – Otín, M. 2012. Dietary intake of Green tea polyphenols regulates insulin sensitivity with an increase in AMP-activated protein kinase alfa content and changes in mitochondrial respiratory complexes. *Molecular Nutrition & Food Research*, 57(3); 459 – 470.

Silveira, M., Piñeiro, L., Carraro, R. 2007. Nutrigenómica, obesidad y salud pública. *Revista Española de Salud Pública*, 81(5): 2173 – 9110.

Snoussi, C., Ducroc, R., Hamdaoui, M., Dhaouadi, K., Abaidi, H., Cluzeaud, F., Nazaret, C., Le Gall, N., Bado, A. 2014. Green tea decoction improves glucose tolerance and reduces weight gain of rats fed normal and high – fat diet. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 25: 557 -564.

Suzuki, T., Takagi, T., Takahashi, M. 2012. Catechin rich green tea extract increases serum cholesterol levels in normal diet and high diet- fed rats. *BMC Proceedings*, 6(Suppl. 3): 47.

Tan, S., Gao, B., Tao, Y., Guo, J., Su, Z. 2014. Antiobese Effects of Capsaicin–Chitosan Microsphere (CCMS) in Obese Rats Induced by High Fat Diet. *J. Agric. Food Chem*, 62(8): 1866–1874.

Thielecke, F., Boschmann, M., 2009. The potential role of green tea catechins in the prevention of the metabolic syndrome – A review. *Phytochemistry*, 70: 11–24.

- Tian, C., Ye, X., Zhang, R., Long, L., Ren, W., Ding, S., Liao, D., Jin, X., Wu, H., Xu, S., Ying, C. 2013. Green tea polyphenols reduced fat deposits in high fat – fed rats via  $er1/2$  – PPAR $\gamma$  – adiponectin pathway. *PLoS One*, 8(1): 53796.
- Uauy, R., Martínez, J., Rojas, C. 2000. Nutrición molecular, papel del Sistema PPAR en el metabolismo lipídico y su importancia en obesidad y diabetes mellitus. *Rev. Méd. Chile*, 128(4).
- Vargas, J. E. 2016. Nutrigenómica humana: Efectos de los alimentos o sus componentes sobre la expresión RNA. *Rev. Fac. Med.*, 64(2): 339-349.
- Viana, M., Esteves De Oliveira, F.C., Bressan, J. 2011. Peroxisome proliferator - activated receptor: effects on nutritional homeostasis, obesity and diabetes mellitus. *Nutrición Hospitalaria*, 26(2): 271 – 279.
- Villarroya, F. 2003. La proteína desacoplante mitocondrial UCP3, ¿un nuevo actor en el metabolismo muscular de los ácido grasos?. *Clin. Invest. Arterioscl.*, 15(3):114 – 23.
- Villarroya, F., Iglesias, R., Giralt, M. 2007. PPARs in the control of coupling proteins gene expression. *PPAR Research*, 2007: 12.
- Vuong, Q.V., Golding, J.B., Nguyen, M., Roach, P.D. 2010. Extraction and isolation of catechins from Tea. *Journal of Separation Science*, 33(21): 3415–3428.
- Vuong, Q., Stathopoulos, C., Nguyen, M., Golding, J., Roach, P. 2011. Isolation of Green Tea catechins and their utilization in the food industry. *Food Reviews International*, 27(3): 227 – 247.
- Westerterp-Platenga. 2010. Green tea catechins, caffeine and body weight regulation. *Physiology Behavior*, 100 (1): 42 - 46.
- Woods, S., Seeley, R., Rushing, P., D'alessio, D., Tso, P. 2003 A controlled high – fat induces an obese syndrome in rats. *The journal of Nutrition*, 4(133): 1081 – 1087.
- Wu, J., Cohen, P., Spiegelman, B. 2013. Adaptive thermogenesis in adipocytes: Is beige the new brown?. *Gene & Development*, 27: 234 – 250.

Wu, T., Guo, Y., Liu, R., Wang, K., Zhang, M. 2016. Black tea polyphenols and polysaccharides improve body composition, increase fecal fatty acid, and regulate fat metabolism in high – fat diet induced obese rats. *Food Function*, 7(5): 2469 – 2478.

Xu, Y., Zhang, M., Wu, T., Dai, S., Xu, J., Zhou, Z. 2015. The anti-obesity effect of Green tea polysaccharides, polyphenols and caffeine in rats fed with a high – fat diet. *Food Funtion*, 6(1): 296 – 303.

Yan, J., Zhao, Y., Zhao, B. 2013. Green tea catechins prevent obesity through modulation of peroxisome proliferator – activated receptors. *Science China Life Sciences*, 56 (9): 804 – 10.

Yang, C., Zhang, J., Zhang, L., Huang, J., Wang. 2015. Mechanisms of body weight reduction and metabolic syndrome alleviation by tea. *Mol. Nutr. & Food. Res*, 60(1): 160 -174.

Yu, X., Mao, W., Zhong, A., Schow, P., Brush, J., Sherwood, S., Adams, S., Pan, G. 2000. Characterization of novel UCP5/BMCP1 isoforms and differential regulation of UCP4 Y UCP5 expression through dietary or temperature manipulation. *The FASEB Journal*, 14(11): 1611 – 1618.

Zhang, X., Zhang, M. Ho, C., Guo, X., Wu, Z., Weng, P., Yan, M., Cao, J. 2018. Metagenomics analysis of gut microbiota modulatory effect of green tea polyphenols by high fat diet – induced obesity mice model. *Journal of Functional Foods*, 46: 268 - 277

Zhishen, J., Mengcheng, T., & Jianming, W. 1999. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food chemistry*, 64(4): 555-559.

## **VIII. ANEXOS**

## Anexo 1: Constancia N° 348-USM-2018



**UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS**  
Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA  
VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO  
**MUSEO DE HISTORIA NATURAL**



*"Año del Diálogo y la Reconciliación Nacional"*

### CONSTANCIA N° 348-USM-2018

EL JEFE DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM) DEL MUSEO DE HISTORIA NATURAL, DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS, DEJA CONSTANCIA QUE:

La muestra vegetal (planta estéril), recibida de **Ruth Esther Catunta Cachi** ; estudiante de la Universidad Nacional Agraria La Molina, Departamento de Nutrición, ha sido estudiada y clasificada como: ***Camellia sinensis*** (L.) Kuntze y tiene la siguiente posición taxonómica, según el Sistema de Clasificación de Cronquist (1988):

**DIVISION: MAGNOLIOPHYTA**

**CLASE: MAGNOLIOPSIDA**

**SUB CLASE: DILLENIIDAE**

**ORDEN: THEALES**

**FAMILIA: THEACEAE**

**GENERO: *Camellia***

**ESPECIE: *Camellia sinensis*** (L.) Kuntze

Nombre vulgar: "Te verde"

Determinado por: Mag. Hamilton Wilmer Beltrán Santiago

Se extiende la presente constancia a solicitud de la parte interesada, para los fines que estime conveniente.

Lima, 25 de setiembre de 2018

**Mag. ASUNCIÓN A. CANO ECHEVARRIA**  
JEFE DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM)

ACE/ddb

## Anexo 2: Guía de uso TRIzol™ Reagent

invitrogen

USER GUIDE

### TRIzol™ Reagent

Catalog Numbers 15596026 and 15596018

Doc. Part No. 15596026.PPS Pub. No. MAN0001271 Rev. A.0

**WARNING!** Read the Safety Data Sheets (SDSs) and follow the handling instructions. Wear appropriate protective eyewear, clothing, and gloves. Safety Data Sheets (SDSs) are available from [thermofisher.com/support](http://thermofisher.com/support).

#### Product information

Invitrogen™ TRIzol™ Reagent is a ready-to-use reagent, designed to isolate high quality total RNA (as well as DNA and proteins) from cell and tissue samples of human, animal, plant, yeast, or bacterial origin, within one hour. TRIzol™ Reagent is a monophasic solution of phenol, guanidine isothiocyanate, and other proprietary components which facilitate the isolation of a variety of RNA species of large or small molecular size. TRIzol™ Reagent maintains the integrity of the RNA due to highly effective inhibition of RNase activity while disrupting cells and dissolving cell components during sample homogenization. TRIzol™ Reagent allows for simultaneous processing of a large number of samples, and is an improvement to the single-step RNA isolation method developed by Chomczynski and Sacchi (Chomczynski and Sacchi, 1987).

TRIzol™ Reagent allows to perform sequential precipitation of RNA, DNA, and proteins from a single sample (Chomczynski, 1993). After homogenizing the sample with TRIzol™ Reagent, chloroform is added, and the homogenate is allowed to separate into a clear upper aqueous layer (containing RNA), an interphase, and a red lower organic layer (containing the DNA and proteins). RNA is precipitated from the aqueous layer with isopropanol. DNA is precipitated from the interphase/organic layer with ethanol. Protein is precipitated from the phenol-ethanol supernatant by isopropanol precipitation. The precipitated RNA, DNA, or protein is washed to remove impurities, and then resuspended for use in downstream applications.

- Isolated RNA can be used in RT-PCR, Northern Blot analysis, Dot Blot hybridization, poly(A)+ selection, in vitro translation, RNase protection assay, and molecular cloning.
- Isolated DNA can be used in PCR, Restriction Enzyme digestion, and Southern Blots.
- Isolated protein can be used for Western Blots, recovery of some enzymatic activity, and some immunoprecipitation.

TRIzol™ Reagent can also be used with Phasemaker™ Tubes to isolate RNA. Refer to *TRIzol™ Reagent and Phasemaker™ Tubes Complete System User Guide* (MAN0016163) for the full protocol.

#### Contents and storage

| Contents        | Cat. No. 15596026<br>{100 reactions} | Cat. No. 15596018<br>{200 reactions} | Storage |
|-----------------|--------------------------------------|--------------------------------------|---------|
| TRIzol™ Reagent | 100 mL                               | 200 mL                               | 15–30°C |

#### Required materials not supplied

Unless otherwise indicated, all materials are available through [thermofisher.com](http://thermofisher.com). MLS: Fisher Scientific ([fisherscientific.com](http://fisherscientific.com)) or other major laboratory supplier.

Table 1 Materials required for RNA, DNA, and protein isolation

| Item  | Source |
|---|--------|
| <b>Equipment</b>  |        |
| Centrifuge and rotor capable of reaching 12,000 × g and 4°C | MLS    |
| <b>Tubes</b>  |        |
| Polypropylene microcentrifuge tubes                         | MLS    |
| <b>Reagents</b>   |        |
| Chloroform  | MLS    |

Table 2 Materials required for RNA isolation

| Item                                | Source |
|-------------------------------------|--------|
| <b>Equipment</b>                    |        |
| Water bath or heat block at 55–60°C | MLS    |
| <b>Reagents</b>                     |        |
| Isopropanol                         | MLS    |
| Ethanol, 75%                        | MLS    |
| RNase-free water of 0.5% SDS        | MLS    |
| [Optional] RNase-free glycogen      | MLS    |

Table 3 Materials required for DNA isolation

| Item                                | Source |
|-------------------------------------|--------|
| <b>Reagents</b>                     |        |
| Ethanol, 100%                       | MLS    |
| Ethanol, 75%                        | MLS    |
| 0.1 M sodium citrate in 10% ethanol | MLS    |
| 8 mM NaOH                           | MLS    |
| HEPES                               | MLS    |

Table 4 Materials required for protein isolation

| Item   | Source |
|--|--------|
| <b>Equipment</b>                             |        |
| [Optional] Dialysis membranes                | MLS    |
| <b>Reagents</b>                              |        |
| Isopropanol                                  | MLS    |
| Ethanol, 100%                                | MLS    |
| 0.3 M Guanidine hydrochloride in 95% ethanol | MLS    |
| 1% SDS                                       | MLS    |

For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures.

**ThermoFisher**  
SCIENTIFIC

## Input sample requirements

**IMPORTANT!** Perform RNA isolation immediately after sample collection or quick-freeze samples immediately after collection and store at  $-80^{\circ}\text{C}$  or in liquid nitrogen until RNA isolation.

| Sample type               | Starting material per 1 mL of TRIzol™ Reagent  |
|---------------------------|--|
| Tissues <sup>[1]</sup>    | 50–100 mg of tissue  |
| Cells grown in monolayer  | $1 \times 10^5$ – $1 \times 10^7$ cells grown in monolayer in a 3.5-cm culture dish (10 cm <sup>2</sup> )      |
| Cells grown in suspension | $5$ – $10 \times 10^6$ cells from animal, plant, or yeasty origin or $1 \times 10^7$ cells of bacterial origin |

<sup>[1]</sup> Fresh tissues or tissues stored in RNA<sup>later</sup>™ Stabilization Solution (Cat. No. AM7020).

## Procedural guidelines

- Perform all steps at room temperature (20–25°C) unless otherwise noted.
- Use cold TRIzol™ Reagent if the starting material contains high levels of RNase, such as spleen or pancreas samples.
- Use disposable, individually wrapped, sterile plastic ware and sterile, disposable RNase-free pipettes, pipette tips, and tubes.
- Wear disposable gloves while handling reagents and RNA samples to prevent RNase contamination from the surface of the skin; change gloves frequently, particularly as the protocol progresses from crude extracts to more purified materials.
- Always use proper microbiological aseptic techniques when working with RNA.
- Use RNaseZap™ RNase Decontamination Solution (Cat. no. AM9780) to remove RNase contamination from work surfaces and non-disposable items such as centrifuges and pipettes used during purification.

## Lyse samples and separate phases

- Lyse and homogenize samples in TRIzol™ Reagent according to your starting material.
  - Tissues:**  
Add 1 mL of TRIzol™ Reagent per 50–100 mg of tissue to the sample and homogenize using a homogenizer.
  - Cell grown in monolayer:**
    - Remove growth media.

- Add 0.3–0.4 mL of TRIzol™ Reagent per  $1 \times 10^5$ – $10^7$  cells directly to the culture dish to lyse the cells.
  - Pipet the lysate up and down several times to homogenize.
- Cells grown in suspension:**
    - Pellet the cells by centrifugation and discard the supernatant.
    - Add 0.75 mL of TRIzol™ Reagent per 0.25 mL of sample ( $5$ – $10 \times 10^6$  cells from animal, plant, or yeasty origin or  $1 \times 10^7$  cells of bacterial origin) to the pellet.  
**Note:** Do not wash cells before addition of TRIzol™ Reagent to avoid mRNA degradation.

**Note:** Do not wash cells before addition of TRIzol™ Reagent to avoid mRNA degradation.

**Note:** The sample volume should not exceed 10% of the volume of TRIzol™ Reagent used for lysis.

**STOPPING POINT** Samples can be stored at 4°C overnight or at  $-20^{\circ}\text{C}$  for up to a year.

- (Optional)* If samples have a high fat content, centrifuge the lysate for 5 minutes at  $12,000 \times g$  at  $4$ – $10^{\circ}\text{C}$ , then transfer the clear supernatant to a new tube.
- Incubate for 5 minutes to permit complete dissociation of the nucleoproteins complex.
- Add 0.2 mL of chloroform per 1 mL of TRIzol™ Reagent used for lysis, then securely cap the tube.
- Incubate for 2–3 minutes.
- Centrifuge the sample for 15 minutes at  $12,000 \times g$  at 4°C.  
The mixture separates into a lower red phenol-chloroform, and interphase, and a colorless upper aqueous phase.
- Transfer the aqueous phase containing the RNA to a new tube.
- Transfer the aqueous phase containing the RNA to a new tube by angling the tube at  $45^{\circ}$  and pipetting the solution out.

**IMPORTANT!** Avoid transferring any of the interphase or organic layer into the pipette when removing the aqueous phase.

Proceed directly to “Isolate RNA” on page 2.

Save the interphase and organic phase if you want to isolate DNA or protein. See “Isolate DNA” on page 3 or “Isolate proteins” on page 4 for detailed procedures. The organic phase can be stored at 4°C overnight.

## Isolate RNA

- 1 Precipitate the RNA**
  - (Optional)* If the starting sample is small ( $<10^6$  cells or  $<10$  mg of tissue), add 5–10  $\mu\text{g}$  of RNase-free glycogen as a carrier to the aqueous phase.  
**Note:** The glycogen is co-precipitated with the RNA, but does not interfere with subsequent applications.
  - Add 0.5 mL of isopropanol to the aqueous phase, per 1 mL of TRIzol™ Reagent used for lysis.
  - Incubate for 10 minutes.
  - Centrifuge for 10 minutes at  $12,000 \times g$  at 4°C.  
Total RNA precipitate forms a white gel-like pellet at the bottom of the tube.
  - Discard the supernatant with a micropipettor.
- 2 Wash the RNA**
  - Resuspend the pellet in 1 mL of 75% ethanol per 1 mL of TRIzol™ Reagent used for lysis.  
**Note:** The RNA can be stored in 75% ethanol for at least 1 year at  $-20^{\circ}\text{C}$ , or at least 1 week at 4°C.
  - Vortex the sample briefly, then centrifuge for 5 minutes at  $7500 \times g$  at 4°C.
  - Discard the supernatant with a micropipettor.
  - Vacuum or air dry the RNA pellet for 5–10 minutes.

**IMPORTANT!** Do not dry the pellet by vacuum centrifuge. Do not let the RNA pellet dry, to ensure total solubilization of the RNA. Partially dissolved RNA samples have an  $A_{230/280}$  ratio  $<1.6$ .

- 3 Solubilize the RNA**
- Resuspend the pellet in 20–50  $\mu\text{L}$  of RNase-free water, 0.1 mM EDTA, or 0.5% SDS solution by pipetting up and down.
- IMPORTANT!** Do not dissolve the RNA in 0.5% SDS if the RNA is to be used in subsequent enzymatic reactions.
- Incubate in a water bath or heat block set at 55–60°C for 10–15 minutes.
- Proceed to downstream applications, or store the RNA at –70°C.

**4 Determine the RNA yield** Determine the RNA yield using one of the following methods.

| Method   | Procedure  |
|--|--|
| <p>Absorbance</p> <p>Absorbance at 260 nm provides total nucleic acid content, while absorbance at 280 nm determines sample purity. Since free nucleotides, RNA, ssDNA, and dsDNA absorb at 260 nm, they all contribute to the total absorbance of the sample.</p> | <ol style="list-style-type: none"> <li>Dilute sample in RNase-free water, then measure absorbance at 260 nm and 280 nm.</li> <li>Calculate the RNA concentration using the formula <math>A_{260} \times \text{dilution} \times 40 = \mu\text{g RNA/mL}</math>.</li> <li>Calculate the <math>A_{260}/A_{280}</math> ratio.<br/>A ratio of ~2 is considered pure.</li> </ol> <p>RNA samples can be quantified by absorbance without prior dilution using the NanoDrop™ Spectrophotometer. Refer to the instrument's instructions for more information.</p> |
| <p>Fluorescence</p> <p>Fluorescence selectively measures intact RNA, but does not measure protein or other contaminant present in the sample</p>   | <ul style="list-style-type: none"> <li>Quantify RNA yield using the appropriate Qubit™ or Quant-iT™ RNA Assay Kit [Cat. Nos. Q32852, Q10210, Q33140, or Q10213]. Refer to the kit's instructions for more information.</li> </ul>  |

**Table 5** Typical RNA ( $A_{260/280}$  of >1.8) yields from various starting materials

| Starting material          | Quantity              | RNA yield           |
|----------------------------|-----------------------|---------------------|
| Epithelial cells           | $1 \times 10^6$ cells | 8–15 $\mu\text{g}$  |
| New tobacco leaf           | —                     | 73 $\mu\text{g}$    |
| Fibroblasts                | $1 \times 10^6$ cells | 5–7 $\mu\text{g}$   |
| Skeletal muscles and brain | 1 mg                  | 1–1.5 $\mu\text{g}$ |
| Placenta                   | 1 mg                  | 1–4 $\mu\text{g}$   |
| Liver                      | 1 mg                  | 6–10 $\mu\text{g}$  |
| Kidney                     | 1 mg                  | 3–4 $\mu\text{g}$   |

## Isolate DNA

Isolate DNA from the interphase and the lower phenol-chloroform phase saved from “Lyse samples and separate phases” on page 2.

- 1 Precipitate the DNA**
- Remove any remaining aqueous phase overlying the interphase.  
This is critical for the quality of the isolated DNA.
  - Add 0.3 mL of 100% ethanol per 1 mL of TRIzol™ Reagent used for lysis.
  - Cap the tube, mix by inverting the tube several times.
  - Incubate for 2–3 minutes.
  - Centrifuge for 5 minutes at  $2000 \times g$  at 4°C to pellet the DNA.
  - Transfer the phenol-ethanol supernatant to a new tube.  
The supernatant is used for protein isolation (see “Isolate proteins” on page 40, if needed, and can be stored at –70°C for several months.
- 2 Wash the DNA**
- Resuspend the pellet in 1 mL of 0.1 M sodium citrate in 10% ethanol, pH 8.5, per 1 mL of TRIzol™ Reagent used for lysis.
  - Incubate for 30 minutes, mixing occasionally by gentle inversion.  
**Note:** The DNA can be stored in sodium citrate/ethanol for at least 2 hours.
  - Centrifuge for 5 minutes at  $2000 \times g$  at 4°C.
  - Discard the supernatant with a micropipettor.
  - Repeat step 2a–step 2d once.  
**Note:** Repeat step 2a–step 2d twice for large DNA pellets (>200  $\mu\text{g}$ ).
  - Resuspend the pellet in 1.5–2 mL of 75% ethanol per 1 mL of TRIzol™ Reagent used for lysis.
  - Incubate for 10–20 minutes, mixing occasionally by gentle inversion.  
**Note:** The DNA can be stored in 75% ethanol at several months at 4°C.
  - Centrifuge for 5 minutes at  $2000 \times g$  at 4°C.
  - Discard the supernatant with a micropipettor.
  - Vacuum or air dry the DNA pellet for 5–10 minutes.
- IMPORTANT!** Do not dry the pellet by vacuum centrifuge.

- 3 Solubilize the DNA**
- Resuspend the pellet in 0.3–0.6 mL of 8 mM NaOH by pipetting up and down.  
**Note:** We recommend resuspending the DNA in a mild base because isolated DNA does not resuspend well in water or Tris buffer.
  - Centrifuge for 10 minutes at  $12,000 \times g$  at 4°C to remove insoluble materials.
  - Transfer the supernatant to a new tube, then adjust pH as needed with HEPES.
- Proceed to downstream applications, or store the DNA at 4°C overnight. For longer-term storage at –20°C, adjust the pH to 7–8 with HEPES and add 1 mM EDTA.

**4 Determine the DNA yield** Determine the DNA yield using one of the following methods.

| Method  | Procedure  |
|---|--|
| <p><b>Absorbance</b></p> <p>Absorbance at 260 nm provides total nucleic acid content, while absorbance at 280 nm determines sample purity. Since free nucleotides, RNA, ssDNA, and dsDNA absorb at 260 nm, they all contribute to the total absorbance of the sample.</p> | <ol style="list-style-type: none"> <li>Dilute sample in water or buffer (pH &gt;7.5), then measure absorbance at 260 nm and 280 nm.</li> <li>Calculate the DNA concentration using the formula <math>A_{260} \times \text{dilution} \times 50 = \mu\text{g DNA/mL}</math>.</li> <li>Calculate the <math>A_{260}/A_{280}</math> ratio.<br/>A ratio of ~1.8 is considered pure.</li> </ol> <p>DNA samples can be quantified by absorbance without prior dilution using the NanoDrop™ Spectrophotometer. Refer to the instrument's instructions for more information.</p> |
| <p><b>Fluorescence</b></p> <p>Fluorescence selectively measures intact DNA, but does not measure protein or other contaminant present in the sample</p>   | <ul style="list-style-type: none"> <li>Quantify dsDNA yield using the appropriate Qubit™ or Quant-iT™ ds DNA Assay Kit (Cat. Nos. Q32850, Q32851, Q33120, or Q33130). Refer to the kit's instructions for more information.</li> </ul>   |

**Table 6** Typical DNA ( $A_{260}/A_{280}$  of 1.6–1.8) yields from various starting materials

| Starting material          | Quantity              | DNA yield |
|----------------------------|-----------------------|-----------|
| Fibroblasts                | $1 \times 10^6$ cells | 5–7 µg    |
| Cultured cells, mammal     | $1 \times 10^6$ cells | 5–7 µg    |
| Skeletal muscles and brain | 1 mg                  | 2–3 µg    |
| Placenta                   | 1 mg                  | 2–3 µg    |
| Liver                      | 1 mg                  | 3–4 µg    |
| Kidney                     | 1 mg                  | 3–4 µg    |

### Isolate proteins

Isolate the proteins from the phenol-ethanol supernatant saved from “Precipitate the DNA” on page 3 using either “Precipitate the proteins” on page 4 or “Dialyse the proteins” on page 5.

- 1 Precipitate the proteins**
- Add 1.5 mL of isopropanol to the phenol-ethanol supernatant per 1 mL of TRIzol™ Reagent used for lysis.
  - Incubate for 10 minutes.
  - Centrifuge for 10 minutes at  $12,000 \times g$  at 4°C to pellet the proteins.
  - Discard the supernatant with a micropipettor.
- 2 Wash the proteins**
- Prepare a wash solution consisting of 0.3 M guanidine hydrochloride in 95% ethanol.
  - Resuspend the pellet in 2 mL of wash solution per 1 mL of TRIzol™ Reagent used for lysis.
  - Incubate for 20 minutes.  
**Note:** The proteins can be stored in wash solution for at least 1 month at 4°C or for at least 1 year at –20°C.
  - Centrifuge for 5 minutes at  $7500 \times g$  at 4°C.
  - Discard the supernatant with a micropipettor.
  - Repeat step 2b–step 2e twice.
  - Add 2 mL of 100% ethanol, then mix by vortexing briefly.
  - Incubate for 20 minutes.
  - Centrifuge for 5 minutes at  $7500 \times g$  at 4°C.
  - Discard the supernatant with a micropipettor.
  - Air dry the protein pellet for 5–10 minutes.
- IMPORTANT!** Do not dry the pellet by vacuum centrifuge.
- 3 Solubilize the proteins**
- Resuspend the pellet in 200 µL of 1% SDS by pipetting up and down.  
**Note:** To ensure complete resuspension of the pellet, we recommend that you incubate the sample at 50°C in a water bath or heat block.
  - Centrifuge for 10 minutes at  $10,000 \times g$  at 4°C to remove insoluble materials.
  - Transfer the supernatant to a new tube.
- Proceed directly to downstream applications, or store the sample at –20°C.

#### 4 Determine the protein yield • Measure protein concentration by Bradford assay.

**Note:** SDS concentration must be <0.1%.

### Dialyse the proteins

1. Load the phenol-ethanol supernatant into the dialysis membrane.

**Note:** The phenol-ethanol solution can dissolve some types of dialysis membranes (cellulose ester, for example). Test dialysis tubing with the membrane to assess compatibility before starting.

2. Dialyze the sample against 3 changes of 0.1% SDS at 4°C. Make the first change of solution after 16 hours, the second change 4 hours later (at 20 hours), and the final change 2 hours later (at 22 hours).

**Note:** A SDS concentration of at least 0.1% is required to resolubilize the proteins from the pellet. If desired, the SDS can be diluted after solubilization.

3. Centrifuge the dialysate for 10 minutes at 10,000 × g at 4°C.
4. Transfer the supernatant containing the proteins to a new tube.
5. (Optional) Solubilize the pellet by adding 100 µL of 1% SDS and 100 µL of 8 M urea.

Proceed directly to downstream applications, or store the sample at –20°C.

### Troubleshooting

| Observation                               | Possible cause   | Recommended action  |
|---|--|---|
| A lower yield than expected is observed   | The samples were incompletely homogenized or lysed.                              | Decrease the amount of starting material.<br>Cut tissue samples into smaller pieces and ensure the tissue is completely immersed in TRIzol™ Reagent to achieve total lysis. |
|   | The pellet was incompletely solubilized  | Increase the solubilization rate by pipetting the sample repeatedly, and heat the sample to 50–60°C.  |
| The sample is degraded                    | Samples were not immediately processed or frozen after collection.               | Sample must be processed or frozen immediately after collection.  |
|   | Sample preparations were stored at the incorrect temperature.                    | Store RNA samples at –60 to –70°C. Store DNA and protein samples at –20°C.  |
| The RNA or DNA is contaminated            | The interphase/organic phase is pipetted up with the aqueous phase.              | Do not attempt to draw off the entire aqueous layer after phase separation.   |
|   | The aqueous phase is incompletely removed.                                       | Remove remnants of the aqueous phase prior to DNA precipitation.  |
|   | The DNA pellet is insufficiently washed with 0.1 M sodium citrate in 10% ethanol | Make sure pellet is washed with 0.1 M sodium citrate in 10% ethanol.  |
| The RNA A <sub>260/280</sub> ratio is low | Sample was homogenized in an insufficient volume of TRIzol™ Reagent.             | Add the appropriate amount of TRIzol™ Reagent for your sample type.   |
|   | The organic phase is incompletely removed.                                       | Do not attempt to draw off the entire aqueous layer after phase separation.   |
| The DNA A <sub>260/280</sub> ratio is low | Phenol was not sufficiently removed from the DNA preparation.                    | Wash the DNA pellet one additional time in 0.1 M sodium citrate in 10% ethanol.   |

### Limited product warranty

Life Technologies Corporation and/or its affiliate(s) warrant their products as set forth in the Life Technologies' General Terms and Conditions of Sale found on Life Technologies' website at [www.thermofisher.com/us/en/home/global/terms-and-conditions.html](http://www.thermofisher.com/us/en/home/global/terms-and-conditions.html). If you have any questions, please contact Life Technologies at [www.thermofisher.com/support](http://www.thermofisher.com/support).

Chomczynski, P., and Sacchi, N. 1987 *Single Step Method of RNA Isolation by Acid Guanidinium Thiocyanate-Phenol-Chloroform Extraction*. *Anal. Biochem.* 162, 156-159

Hummon, A. B., Lim S. R., Difilippantonio, M. J., and Ried, T. 2007 *Isolation and solubilization of proteins after TRIzol® extraction of RNA and DNA from patient material following prolonged storage*. *BioTechniques* 42, 467-472

### References

Chomczynski, P. 1993. *A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples*. *BioTechniques* 15, 532-537

---

The information in this guide is subject to change without notice.

**DISCLAIMER:** TO THE EXTENT ALLOWED BY LAW, LIFE TECHNOLOGIES AND/OR ITS AFFILIATE(S) WILL NOT BE LIABLE FOR SPECIAL, INCIDENTAL, INDIRECT, PUNITIVE, MULTIPLE, OR CONSEQUENTIAL DAMAGES IN CONNECTION WITH OR ARISING FROM THIS DOCUMENT, INCLUDING YOUR USE OF IT.

**Revision history:** Pub. No. MAN00001271

| Revision | Date             | Description                             |
|----------|------------------|---|
| A.0      | 09 November 2016 | Added references to Phasemaker™ Tubes . |
| —        | 13 December 2012 | Baseline for revision.                  |

**Important Licensing Information:** These products may be covered by one or more Limited Use Label Licenses. By use of these products, you accept the terms and conditions of all applicable Limited Use Label Licenses.

**Corporate entity:** Life Technologies Corporation | Carlsbad, CA 92008 USA | Toll Free in USA 1 800 955 6288

©2016 Thermo Fisher Scientific Inc. All rights reserved. All trademarks are the property of Thermo Fisher Scientific and its subsidiaries unless otherwise specified.

## Anexo 3: Guía de uso TURBO DNA-free™ DNasa

USER GUIDE

**ambion®**  
by *life* technologies™

# TURBO DNA-free™ Kit TURBO™ DNase Treatment and Removal Reagents

Catalog Number AM1907

Publication Number 1907M Revision G

## Product description

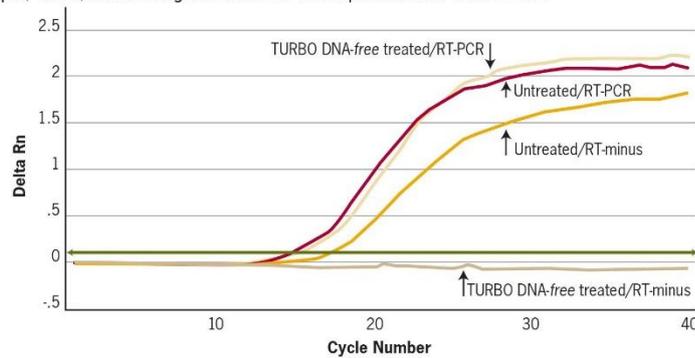
Ambion® TURBO DNA-free™ DNase Treatment and Removal Reagents are designed to remove contaminating DNA from RNA preparations, and to subsequently remove the DNase and divalent cations from the sample. The included TURBO™ DNase (patent pending) is an engineered version of wild type DNase I with 350% greater catalytic efficiency. TURBO™ DNase has a markedly higher affinity for DNA than conventional DNase I, and is thus more effective in removing trace quantities of DNA contamination. In addition, TURBO™ DNase maintains up to 50× greater activity than DNase I in solutions containing physiological salt concentrations. The TURBO™ DNase provided in the kit is overexpressed in an animal-free system, and is then extensively purified in a bovine-free process and tested. It is guaranteed to lack any contaminating RNase activity. The kit also includes an optimized DNase reaction buffer that contains a small molecule enhancer that extends the activity of the TURBO™ DNase enzyme by 100-fold or more. Using TURBO DNA-free™, contaminating DNA is digested to levels below the limit of detection by routine PCR (Figure 1). The DNase is then removed rapidly and easily using a novel method which does not require phenol/chloroform extraction, alcohol precipitation, heating, or the addition of EDTA (see Table 1 on page 2). TURBO DNA-free™ treated RNA is suitable for endpoint or real-time RT-PCR, microarray analysis, RPAs, Northern, and all other RNA analysis methods.

In addition to removing the DNase enzyme, DNase Inactivation Reagent also removes divalent cations, such as magnesium and calcium, which can catalyze RNA degradation when RNA is heated with the sample (Figure 2 on page 3).

*life*  
technologies™

**Figure 1 TURBO DNA-free™ reduces genomic DNA contamination by greater than 5 million fold.** Equal amounts of mouse spleen total RNA (purified using the RNAqueous® Kit) were either treated with 7.8 U of TURBO DNA-free™ in a 130 µL reaction for 20 min at 37°C, or were left untreated. The digestions were stopped by adding 22 µL DNase Inactivation Reagent. 5 µL (1 µg RNA) was amplified in a one step 25-µL RT-PCR using a TaqMan® primer probe set for mouse GAPDH. Treated and untreated samples were reverse transcribed with Life Technologies MessageSensor™ RT Kit. RT-minus samples were subjected to PCR to control for DNA contamination. Results are shown using a linear scale so that the amplification plot for the TURBO™ DNase-treated, RT-minus sample is visible.

The fold-removal ( $5.4 \times 10^6$  fold) of genomic DNA was calculated as follows: The  $C_T$  value from the untreated RNA in the RT-minus reaction is the level of gDNA contamination. The fold-removal was determined by subtracting the RT-minus reaction  $C_T$  value for the treated RNA sample, 39.5 (the other duplicate's signal was undetectable) from the  $C_T$  value of the untreated sample, 17.13, and raising the 17.13 as the exponent with a base of 2.



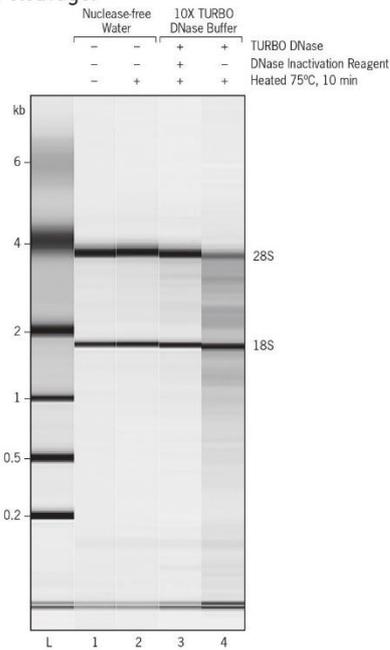
**Table 1 Treatment of RNA with TURBO DNA-free™ maintains target sensitivity in real-time RT-PCR.** Total RNA from HeLa S3 cells was treated with the TURBO DNA-free™ Kit following the standard protocol. 5 µL of the treated RNA was then reverse transcribed using the MessageSensor™ RT Kit, and the resulting cDNA was amplified by real-time RT-PCR using primer and probe sets for either human β-actin or CDC-2 with TaqMan® detection.

| RNA-treatment           | $C_T$ for β-actin (duplicates) |               |
|-------------------------|--------------------------------|---------------|
|                         | 100 pg RNA                     | 1 pg RNA      |
| none                    | 24.78 / 24.67                  | 31.83 / 31.53 |
| TURBO DNA-free™ treated | 24.50 / 24.62                  | 30.89 / 30.88 |

| RNA-treatment           | $C_T$ for CDC-2 (duplicates) |               |
|-------------------------|------------------------------|---------------|
|                         | 100 pg RNA                   | 1 pg RNA      |
| none                    | 28.88 / 28.24                | 34.41 / 35.50 |
| TURBO DNA-free™ treated | 27.71 / 28.10                | 34.04 / 33.99 |

**Figure 2 Removal of divalent cations by DNase inactivation reagents.** HeLa-S3 total RNA (100 ng), in 50  $\mu$ L 1X TURBO DNase Buffer or in nuclease-free water, was treated with components from the TURBO DNA-free™ Kit as indicated. Samples were heated for 10 min at 75°C (Lanes 2, 3, & 5), or 3 min at 90°C (Lane 4), to determine if divalent cations from the TURBO DNase Buffer remained in solution, and degraded the RNA. 1  $\mu$ L of each sample was analyzed on an RNA LabChip® using the Agilent® 2100 Bioanalyzer™ Instrument. Note that RNA was degraded in the sample that contained TURBO DNase Buffer, but was not treated with the DNase Inactivation Reagent (Lane 5); this degradation is due to the presence of divalent ions that induce heat-mediated RNA cleavage.



## Procedure overview

How much RNA can be treated with TURBO DNA-free™ reagents?

## Procedure overview

For the detailed procedure, see “TURBO DNA-free™ procedure” on page 5.

### Add DNase Digestion Reagents

1. Add 0.1 volume 10X TURBO DNase Buffer and 1 µL TURBO DNase to the RNA, and mix gently (page 5)

### Incubate

2. Incubate at 37°C for 20–30 min (page 6)

### Add DNase Inactivation Reagent

3. Add resuspended DNase Inactivation Reagent (typically 0.1 volume) and mix well. (page 6)

### Incubate and mix

4. Incubate 5 min at room temperature, mixing occasionally. (page 6)

### Centrifuge and transfer RNA

5. Centrifuge at 10,000 × g for 1.5 min and transfer the RNA to a fresh tube (page 6)



## How much RNA can be treated with TURBO DNA-free™ reagents?

This protocol is designed to remove trace to moderate amounts of contaminating DNA (up to 50 µg DNA/mL RNA) from purified RNA to a level that is mathematically insignificant by RT-PCR. No RNA isolation method can extract RNA that is completely free from DNA contamination; in fact, RNA isolated from some tissues, such as spleen, kidney, or thymus, often contain relatively high levels of DNA. Other potential sources of DNA contamination include carryover of the interface during organic extractions, and overloaded glass-fiber filters during RNA purification.

## TURBO DNA-free™ components and storage

Reagents are provided for 50 TURBO DNA-free™ treatments (up to 100 µL each).

| Amount  | Component                  | Storage                      |
|---------|----------------------------|------------------------------|
| 120 µL  | TURBO DNase (2 Units/µL)   | -20°C                        |
| 600 µL  | 10X TURBO DNase Buffer     |                              |
| 600 µL  | DNase Inactivation Reagent |                              |
| 1.75 mL | Nuclease-free Water        | any temperature <sup>†</sup> |

<sup>†</sup> Store Nuclease-free Water at -20°C, 4°C, or room temperature.

Store the TURBO DNA-free™ Kit at -20°C in a non-frost-free freezer for long-term storage. For convenience, the 10X TURBO DNase Buffer and the DNase Inactivation Reagent can be stored at 4°C for up to 1 week.

## TURBO DNA-free™ procedure

### Procedure notes

- We recommend conducting reactions in 0.5 mL tubes to facilitate removal of the supernatant after treatment with the DNase Inactivation Reagent.
- TURBO DNA-free™ reactions can be conducted in 96-well plates. We recommend using V-bottom plates because their shape makes it easier to remove the RNA from the pelleted DNase Inactivation Reagent at the end of the procedure.
- The recommended reaction size is 10–100 µL. A typical reaction is 50 µL.

### Procedure

1. Add 0.1 volume 10X TURBO DNase Buffer and 1 µL TURBO DNase to the RNA, and mix gently

There are separate DNase digestion conditions depending on the amount of contaminating DNA and the nucleic acid concentration of the sample.

- **Routine DNase treatment:** ≤200 µg nucleic acid per mL
- **Rigorous DNase treatment:** >200 µg nucleic acid per mL or RNA that is severely contaminated with DNA (i.e. >2 µg DNA/50 µL)

**Routine DNase treatment:** Use 1 µL TURBO™ DNase (2 U) for up to 10 µg of RNA in a 50 µL reaction. These reaction conditions will remove up to 2 µg of genomic DNA from total RNA in a 50 µL reaction volume.

**Rigorous DNase treatment:** If the RNA contains more than 200 µg of nucleic acid per mL, dilute the sample to 10 µg nucleic acid/50 µL before adding the TURBO DNase Buffer and TURBO™ DNase. It is also helpful to add only half of the TURBO™ DNase to the reaction initially, incubate for 30 min, then add the remainder of the enzyme and incubate for another 30 min.

If the sample cannot be diluted, simply increase the amount of TURBO DNase to 2–3 µL (4–6 U). It may be possible to successfully remove contaminating DNA from samples containing up to 500 µg/mL nucleic acid in a 10–100 µL TURBO DNA-free™ reaction. However, the efficacy of treating highly concentrated nucleic acid samples depends on the absolute level of DNA contamination, and residual DNA may or may not be detectable by PCR after 35–40 cycles.

2. Incubate at 37°C for 20–30 min

If only half of the TURBO DNase was added in the previous step, incubate for 30 min, then add the rest of the TURBO DNase and incubate for 30 min more.

3. Add resuspended DNase Inactivation Reagent (typically 0.1 volume) and mix well.

Always resuspend the DNase Inactivation Reagent by flicking or vortexing the tube before dispensing it.

- **For routine DNase treatment:** use 2 µL or 0.1 volume DNase Inactivation Reagent, whichever is greater. For example, if the RNA volume is 50 µL, and 1 µL of TURBO DNase was used in the previous step, add 5 µL of DNase Inactivation Reagent.
- **For rigorous DNase treatments:** where 2–3 µL of TURBO DNase was used, add 0.2 volumes of DNase Inactivation Reagent.

---

**IMPORTANT!** Always use at least 2 µL of DNase Inactivation Reagent, even if it is more than 0.1 volume.

---

**Note:** The DNase Inactivation Reagent may become difficult to pipette after multiple uses due to depletion of fluid from the interstitial spaces. If this happens, add a volume of Nuclease-free Water (supplied with the kit) equal to approximately 20–25% of the bed volume of the remaining DNase Inactivation Reagent, and vortex thoroughly to recreate a pipettable slurry.

4. Incubate 5 min at room temperature, mixing occasionally.

Flick the tube 2–3 times during the incubation period to redisperse the DNase Inactivation Reagent.

**Note:** If room temperature cools below 22–26°C, move the tubes to a heat block or oven to control the temperature. Cold environments can reduce the inactivation of the TURBO DNase, leaving residual DNase in the RNA sample.

5. Centrifuge at 10,000 × g for 1.5 min and transfer the RNA to a fresh tube

Flick the tube 2–3 times during the incubation period to redisperse the DNase Inactivation Reagent.

- For 96-well plates, centrifuge at 2000 × g for 5 min.

This centrifugation step pellets the DNase Inactivation Reagent. After centrifuging, carefully transfer the supernatant, which contains the RNA, into a fresh tube. Avoid introducing the DNase Inactivation Reagent into solutions that may be used for downstream enzymatic reactions, because it can sequester divalent cations and change the buffer conditions.

## Troubleshooting

| Observation  | Possible cause   | Recommended action  |
|--|--|---|
| No RT-PCR product is detectable from RNA treated with TURBO DNA-free™                    | DNase Inactivation Reagent could inhibit RT-PCR  | In step 5, remove the RNA solution from the pelleted DNase Inactivation Reagent carefully to avoid transferring it to the tube of RNA. You may have to leave a small amount of RNA behind to accomplish this. If you accidentally touch the pellet while removing the RNA, recentrifuge to pack the DNase Inactivation Reagent.   |
|  | TURBO DNA-free™ treated RNA should comprise only ~20% of an RT-PCR reaction volume.  | For RT-PCR, we recommend that TURBO DNA-free™ treated RNA makes up ~20%, and no more than 40%, of the final RT-PCR volume. Otherwise, components from the TURBO DNase Buffer and the DNase Inactivation Reagent could interfere with the reaction. If necessary, RT-PCR volumes can be increased to 50 µL or more to accommodate your RNA without exceeding the 20–40% limit. |
|  | RNA used in RT-PCR should be treated only once with TURBO DNA-free™  | The salt in TURBO DNA-free™ reactions is carefully balanced for optimal TURBO DNase activity. Subjecting RNA to a second TURBO DNA-free™ treatment will introduce additional salts that could interfere with downstream enzymatic reactions.  |
| RNA is degraded upon heating to >60°C  | RNA samples that contain divalent cations, such as magnesium or calcium, will degrade when heated to temperatures above 60°C.  | To ensure that divalent cations are removed in step 4, redisperse the DNase Inactivation Reagent by mixing the reaction 2–3 times during the incubation period.   |
| The RNA absorbance spectrum has an unusual profile after treatment with TURBO DNA-free™. | If the concentration of RNA in the sample is less than about 50 ng/µL, you may notice significant absorbance at ~230 nm. $A_{260}/A_{280}$ ratios may also be slightly lower than normal when the RNA concentration is ≤25 ng/µL. These differences in the absorbance profile are caused by the enhancer in the TURBO DNase Buffer. Exhaustive comparisons with both treated and untreated RNA samples indicate that the enhancer has no effect on accurate RNA quantification unless the RNA concentration is below 10 ng/µL. |   |

## Quality control

### Functional testing

The activity of the TURBO™ DNase is tested functionally in a unit activity assay. One unit is defined as the amount of enzyme required to completely degrade 1 µg DNA in 10 min at 37°C. Results are analyzed by agarose gel electrophoresis. The DNase Inactivation Reagent is tested for its ability to remove both TURBO™ DNase and TURBO™ DNase Buffer components. Results are analyzed by agarose gel electrophoresis and the Agilent 2100 bioanalyzer, respectively.

**Nuclease testing** Relevant kit components are tested in the following nuclease assays:

**RNase activity**

A sample is incubated with labeled RNA and analyzed by PAGE.

**Nonspecific endonuclease activity**

A sample is incubated with supercoiled plasmid DNA and analyzed by agarose gel electrophoresis.

**Exonuclease activity**

A sample is incubated with labeled double-stranded DNA, followed by PAGE analysis.

**Protease testing** A sample is incubated with protease substrate and analyzed by fluorescence.

## Appendix A Safety

### Chemical safety



---

**WARNING! GENERAL CHEMICAL HANDLING.** To minimize hazards, ensure laboratory personnel read and practice the general safety guidelines for chemical usage, storage, and waste provided below, and consult the relevant SDS for specific precautions and instructions:

- Read and understand the Safety Data Sheets (SDSs) provided by the chemical manufacturer before you store, handle, or work with any chemicals or hazardous materials. To obtain SDSs, see the “Documentation and Support” section in this document.
  - Minimize contact with chemicals. Wear appropriate personal protective equipment when handling chemicals (for example, safety glasses, gloves, or protective clothing).
  - Minimize the inhalation of chemicals. Do not leave chemical containers open. Use only with adequate ventilation (for example, fume hood).
  - Check regularly for chemical leaks or spills. If a leak or spill occurs, follow the manufacturer’s cleanup procedures as recommended in the SDS.
  - Handle chemical wastes in a fume hood.
  - Ensure use of primary and secondary waste containers. (A primary waste container holds the immediate waste. A secondary container contains spills or leaks from the primary container. Both containers must be compatible with the waste material and meet federal, state, and local requirements for container storage.)
  - After emptying a waste container, seal it with the cap provided.
  - Characterize (by analysis if necessary) the waste generated by the particular applications, reagents, and substrates used in your laboratory.
  - Ensure that the waste is stored, transferred, transported, and disposed of according to all local, state/provincial, and/or national regulations.
  - **IMPORTANT!** Radioactive or biohazardous materials may require special handling, and disposal limitations may apply.
-

## Documentation and support

**Obtaining SDSs** Safety Data Sheets (SDSs) are available from [www.lifetechnologies.com/support](http://www.lifetechnologies.com/support).

**Note:** For the SDSs of chemicals not distributed by Life Technologies, contact the chemical manufacturer.

**Obtaining support** For the latest services and support information for all locations, go to:

[www.lifetechnologies.com/support](http://www.lifetechnologies.com/support)

At the website, you can:

- Access worldwide telephone and fax numbers to contact Technical Support and Sales facilities
- Search through frequently asked questions (FAQs)
- Submit a question directly to Technical Support ([techsupport@lifetech.com](mailto:techsupport@lifetech.com))
- Search for user documents, SDSs, vector maps and sequences, application notes, formulations, handbooks, certificates of analysis, citations, and other product support documents
- Obtain information about customer training
- Download software updates and patches

### Limited product warranty

Life Technologies Corporation and/or its affiliate(s) warrant their products as set forth in the Life Technologies' General Terms and Conditions of Sale found on Life Technologies' website at [www.lifetechnologies.com/termsandconditions](http://www.lifetechnologies.com/termsandconditions). If you have any questions, please contact Life Technologies at [www.lifetechnologies.com/support](http://www.lifetechnologies.com/support).

appliedbiosystems

# High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit

## USER GUIDE

For 200 and 1000 reaction kits

Catalog Numbers 4368813, 4368814, 4374966, 4374967

Publication Number MAN0017977

Revision A.0

For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures.

**ThermoFisher**  
SCIENTIFIC



**Manufacturer:** Thermo Fisher Scientific Baltics UAB | V.A. Graiciuno 8, LT-02241 | Vilnius, Lithuania

The information in this guide is subject to change without notice.

**DISCLAIMER:** TO THE EXTENT ALLOWED BY LAW, THERMO FISHER SCIENTIFIC INC. AND/OR ITS AFFILIATE(S) WILL NOT BE LIABLE FOR SPECIAL, INCIDENTAL, INDIRECT, PUNITIVE, MULTIPLE, OR CONSEQUENTIAL DAMAGES IN CONNECTION WITH OR ARISING FROM THIS DOCUMENT, INCLUDING YOUR USE OF IT.

**Revision history:** Revision history of Pub. no. MAN0017977

| Revision | Date         | Description                         |
|----------|--------------|-------------------------------------|
| A.0      | 16 July 2018 | Baseline for this revision history. |

**Important Licensing Information:** These products may be covered by one or more Limited Use Label Licenses. By use of these products, you accept the terms and conditions of all applicable Limited Use Label Licenses.

**Trademarks:** All trademarks are the property of Thermo Fisher Scientific and its subsidiaries unless otherwise specified. TaqMan is a registered trademark of Roche Molecular Systems, Inc., used under permission and license.

©2018 Thermo Fisher Scientific Inc. All rights reserved.

# Contents

|   |  |    |
|---|--|----|
| ■ | <b>Product information</b> .....                           | 5  |
|   | Product description .....                                  | 5  |
|   | Available kits .....                                       | 5  |
|   | Contents and storage .....                                 | 6  |
|   | Required materials not supplied .....                      | 6  |
|   | Workflow .....   | 7  |
| ■ | <b>Methods</b> .....                                       | 8  |
|   | Guidelines for template RNA .....                          | 8  |
|   | Reverse transcription reaction guidelines .....            | 8  |
|   | Prepare the 2X RT master mix (20- $\mu$ L reaction) .....  | 9  |
|   | Prepare the reverse transcription reactions .....          | 9  |
|   | Perform reverse transcription .....                        | 10 |
| ■ | <b>APPENDIX A PCR good laboratory practices</b> .....      | 11 |
|   | Good laboratory practices for PCR and RT-PCR .....         | 11 |
| ■ | <b>APPENDIX B Results from reverse transcription</b> ..... | 12 |
|   | Quantitative PCR .....                                     | 12 |
|   | Yields for different targets .....                         | 13 |
|   | Yields for different targets .....                         | 14 |
| ■ | <b>APPENDIX C Accessory products</b> .....                 | 16 |
|   | Accessory products .....                                   | 16 |
| ■ | <b>APPENDIX D Safety</b> .....                             | 17 |
|   | Chemical safety .....                                      | 18 |
|   | Biological hazard safety .....                             | 19 |

- **APPENDIX E Documentation and support ..... 20**
  - Customer and technical support ..... 20
  - Limited product warranty ..... 20



# Product information

---

**IMPORTANT!** Before using this product, read and understand the information in the "Safety" appendix in this document.

---

## Product description

The Applied Biosystems™ High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit contains all the reagents needed for reverse transcription (RT) of up to 2 µg of total RNA to single-stranded cDNA in a 20 µL reaction. The cDNA prepared using the kit is suitable for quantitative PCR, archival storage, or conversion to cRNA.

The random primer method is used for initiating cDNA synthesis, and ensure that first strand synthesis occurs efficiently with all species of RNA molecules present, including mRNA and rRNA. The kit has been tested extensively against various RNA templates, including G/C-rich and A/U-rich RNA species. The effect of relative mRNA abundance was also examined to see if the reverse transcriptase reaction generates products in a manner directly dependent to the amount of input RNA template. In all cases, quantitative conversion of mRNA and 18S ribosomal RNA species was observed.

## Available kits

| Kit   | Cat. No. |
|---|----------|
| High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, 200 reactions                       | 4368814  |
| High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, 1000 reactions                      | 4368813  |
| High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit with RNase Inhibitor, 200 reactions  | 4374966  |
| High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit with RNase Inhibitor, 1000 reactions | 4374967  |



## Contents and storage

| Contents                                    | Cat. No.   |            |            |            | Storage        |
|---|------------|------------|------------|------------|----------------|
|   | 4368813    | 4374967    | 4368814    | 4374966    |                |
| 10X RT Buffer                               | 2 × 1.0 mL | 2 × 1.0 mL | 1 × 1.0 mL | 1 × 1.0 mL | -25°C to -15°C |
| 10X RT Random Primers                       | 2 × 1.0 mL | 2 × 1.0 mL | 1 × 1.0 mL | 1 × 1.0 mL |                |
| 25X dNTP Mix (100 mM)                       | 1 × 1.0 mL | 1 × 1.0 mL | 1 × 0.2 mL | 1 × 0.2 mL |                |
| MultiScribe™ Reverse Transcriptas (50 U/μL) | 1 × 1.0 mL | 1 × 1.0 mL | 2 × 0.1 mL | 2 × 0.1 mL |                |
| RNase Inhibitor                             | —          | 5 × 200 μL | —          | 1 × 200 μL |                |

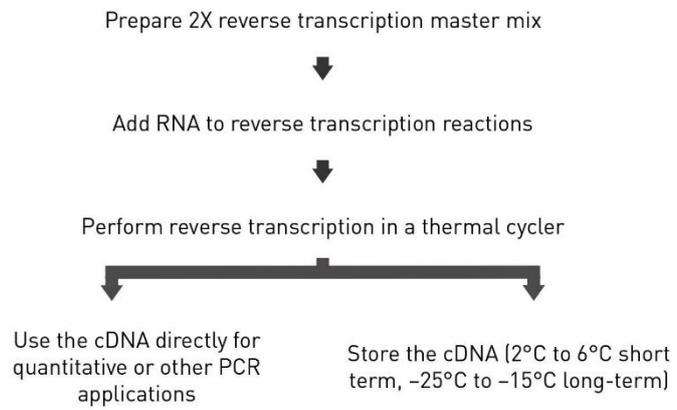
## Required materials not supplied

Unless otherwise indicated, all materials are available through [thermofisher.com](https://www.thermofisher.com).  
MLS: Fisher Scientific ([fisherscientific.com](https://www.fisherscientific.com)) or other major laboratory supplier.

| Item  | Source |
|---|--------|
| Nuclease-free water                                   | MLS    |
| Pipette tips, aerosol-resistant                       | MLS    |
| Pipettes, positive-displacement                       | MLS    |
| Vortexer  | MLS    |
| Microcentrifuge                                       | MLS    |
| Disposable gloves                                     | MLS    |
| Centrifuge (>3,000 × g (rcf), temperature controlled) | MLS    |
| Reagent Tubes with Caps, 10-mL                        | MLS    |



## Workflow





# Methods

## Guidelines for template RNA

Observe the following guidelines to ensure optimal performance when using the High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit.

- Use up to 2  $\mu\text{g}$  of total RNA per 20- $\mu\text{L}$  reaction.
- Dissolve RNA in PCR-compatible buffer or water.
- Ensure RNA is free of inhibitors of reverse transcription and PCR.
- Ensure RNA is free of RNase activity. If you suspect that the RNA contains RNase activity, add RNase Inhibitor to the reverse transcription reaction at a final concentration of 1 U/ $\mu\text{L}$ .

## Reverse transcription reaction guidelines

The kit contains reagents that, when combined, form a 2X reverse transcription (RT) master mix. An equal volume of RNA sample should be added. To avoid RNase contamination, RNase-free reagents and consumables must be used.



## Prepare the 2X RT master mix (20- $\mu$ L reaction)

1. Allow the kit components to thaw on ice.
2. Calculate the volume of components needed to prepare the required number of reactions.

**Note:** Prepare the RT master mix on ice.

| Component                          | Volume               |                         |
|------------------------------------|----------------------|-------------------------|
|                                    | with RNase Inhibitor | without RNase Inhibitor |
| 10X RT Buffer                      | 2.0 $\mu$ L          | 2.0 $\mu$ L             |
| 25X dNTP Mix (100 mM)              | 0.8 $\mu$ L          | 0.8 $\mu$ L             |
| 10X RT Random Primers              | 2.0 $\mu$ L          | 2.0 $\mu$ L             |
| MultiScribe™ Reverse Transcriptase | 1.0 $\mu$ L          | 1.0 $\mu$ L             |
| RNase Inhibitor                    | 1.0 $\mu$ L          | —                       |
| Nuclease-free H <sub>2</sub> O     | 3.2 $\mu$ L          | 4.2 $\mu$ L             |
| Total per reaction                 | 10.0 $\mu$ L         | 10.0 $\mu$ L            |

**IMPORTANT!** Include additional reactions in the calculations to provide excess volume for the loss that occurs during reagent transfers.

3. Place the 2X RT master mix on ice and mix gently.

## Prepare the reverse transcription reactions

1. Pipette 10  $\mu$ L of 2X RT master mix into each well of a 96-well reaction plate or individual tube.
2. Pipette 10  $\mu$ L of RNA sample into each well, pipetting up and down two times to mix.
3. Seal the plates or tubes.
4. Briefly centrifuge the plate or tubes to spin down the contents and to eliminate any air bubbles.
5. Place the plate or tubes on ice until you are ready to load the thermal cycler.



## Perform reverse transcription

1. Program the thermal cycler using the conditions below.

---

**IMPORTANT!** These conditions are optimized for use with the High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit.

---

| Settings | Step 1     | Step 2      | Step 3    | Step 4 |
|----------|------------|-------------|-----------|--------|
| Temp.    | 25°C       | 37°C        | 85°C      | 4°C    |
| Time     | 10 minutes | 120 minutes | 5 minutes | Hold   |

2. Set the reaction volume to 20  $\mu$ L.
3. Load the reaction plates or tubes into the thermal cycler.
4. Start the thermal cycler run.



# PCR good laboratory practices

## Good laboratory practices for PCR and RT-PCR

When preparing samples for PCR or RT-PCR amplification:

- Wear clean gloves and a clean lab coat.
  - Do not wear the same gloves and lab coat that you have previously used when handling amplified products or preparing samples.
- Change gloves if you suspect that they are contaminated.
- Maintain separate areas and dedicated equipment and supplies for:
  - Sample preparation and reaction setup.
  - Amplification and analysis of products.
- Do not bring amplified products into the reaction setup area.
- Open and close all sample tubes carefully. Avoid splashing or spraying samples.
- Keep reactions and components capped as much as possible.
- Use a positive-displacement pipettor or aerosol-resistant barrier pipette tips.
- Clean lab benches and equipment periodically with 10% bleach solution or DNA decontamination solution.



# Results from reverse transcription

## Quantitative PCR

To determine the yield of the cDNA from the reverse transcription of total RNA, use quantitative PCR to test various input amounts of RNA for the cDNA yield of different gene targets.

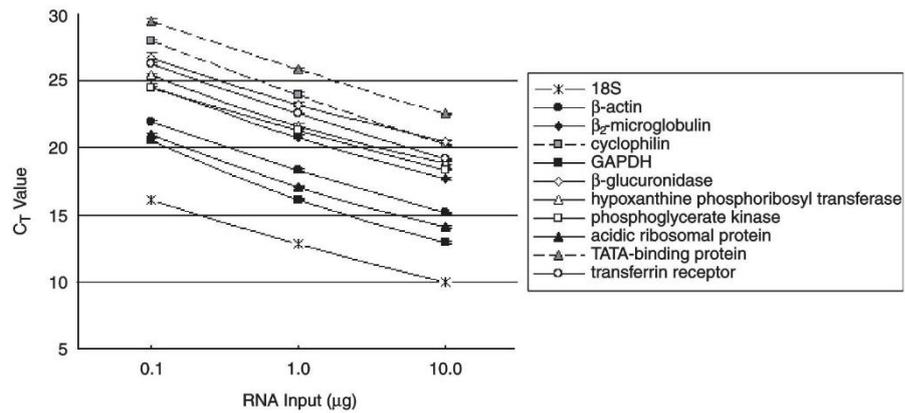
The following table lists some targets and available Applied Biosystems™ kits that can be used to evaluate the yield of cDNA conversion.

| Gene target | Kit name                               | Cat. No. |
|-------------|--|----------|
| 18S         | TaqMan® Ribosomal RNA Control Reagents | 4308329  |
| GAPDH       | TaqMan® GAPDH Control Reagents (Human) | 402869   |
| GAPDH       | TaqMan® Rodent GAPDH Control Reagents  | 4308313  |
| β-actin     | TaqMan® β-actin Detection Reagents     | 401846   |

Other TaqMan® Gene Expression Assays can be used to evaluate the yield of cDNA conversion. For a list of available assays, go to [thermofisher.com](http://thermofisher.com).

## Yields for different targets

For the example in this appendix, the input total RNA was obtained from human Raji cells, and the RNA was converted to cDNA using the High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit. Figure 1 shows an example of quantitative PCR results from the cDNA for 11 different gene targets, which vary in expression levels.



**Figure 1** The expected  $\Delta$ CT values of 3.3 for each tenfold increase in the RNA input quantity are obtained for 11 different RNA transcripts converted to cDNA from different input quantities of total RNA.

**Note:** The amplicon for  $\beta$ 2-microglobulin in this study was specifically designed to be A/U rich. The threshold cycle (CT) values are plotted against RNA input amounts of 0.1, 1.0, and 10.0  $\mu$ g in 100- $\mu$ L reactions.

## Yields for different targets

To achieve optimal conversion, allow reverse transcription to occur for 120 minutes at 37 °C. Figures 2, 3, and 4 show CT values plotted against reaction time in minutes for three different targets (18S, GAPDH, and  $\beta$ 2-microglobulin) and three input amounts of RNA (0.1, 1.0, and 10.0  $\mu$ g in 100- $\mu$ L reactions).

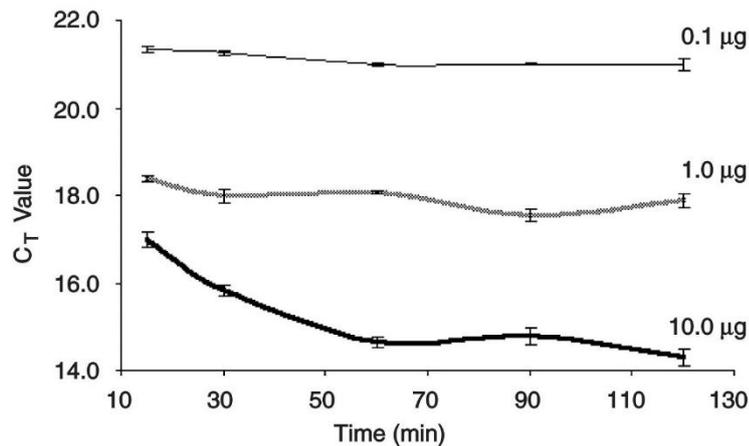


Figure 2 The rate of conversion of 18S RNA to cDNA reaches a maximum at 120 minutes with 10  $\mu$ g of input RNA and at 30 minutes or less with 0.1 to 1.0  $\mu$ g of input RNA (based on 100- $\mu$ L reactions).

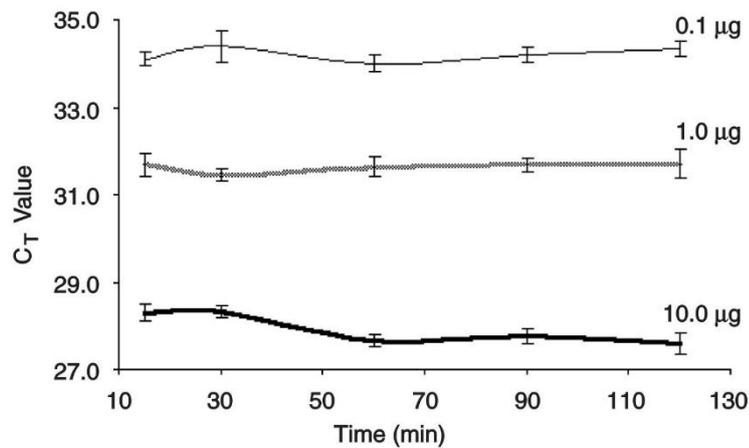
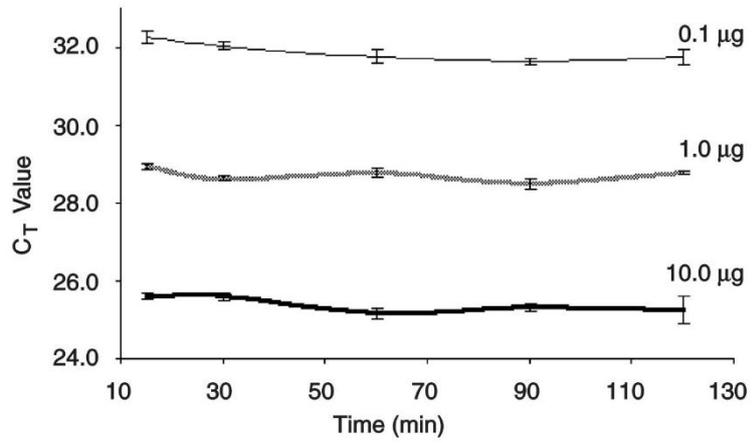


Figure 3 The rate of conversion of GAPDH RNA to cDNA reaches a maximum at 60 minutes or less at all RNA input levels (based on 100- $\mu$ L reactions).



**Figure 4** The rate of conversion of  $\beta 2$ -microglobulin RNA to cDNA reaches a maximum at 60 minutes or less at all RNA input levels (based on 100- $\mu$ L reactions).



## Accessory products

### Accessory products

Unless otherwise indicated, all materials are available through [thermofisher.com](https://www.thermofisher.com).  
MLS: Fisher Scientific ([fisherscientific.com](https://www.fisherscientific.com)) or other major laboratory supplier.

| Item   | Source   |
|--|----------|
| MicroAmp™ Fast Optical 96-Well Reaction Plate, 0.1 mL                | 4346907  |
| MicroAmp™ Fast Optical 96-Well Reaction Plate with Barcode, 0.1 mL   | 4346906  |
| MicroAmp™ Optical 96-Well Reaction Plate                             | N8010560 |
| MicroAmp™ 8-Tube Strip, 0.2 mL                                       | N8010580 |
| MicroAmp™ Fast 8-Tube Strip, 0.1 mL                                  | 4358293  |
| MicroAmp™ 8-Cap Strip, clear   | N8010535 |
| MicroAmp™ Clear Adhesive Film  | 4306311  |
| MicroAmp™ Optical Adhesive Film                                      | 4360954  |
| MicroAmp™ Optical 96-Well Reaction Plate with Barcode & Optical Caps | 403012   |
| MicroAmp™ Optical 8-Cap Strips                                       | 4323032  |
| MicroAmp™ Cap Installing Tool  | 4330015  |
| MicroAmp™ Adhesive Film Applicator                                   | 4333183  |
| RNase Inhibitor <sup>[1]</sup>                                       | N8080119 |

<sup>[1]</sup> Included with Cat. Nos. 4374966 and 4374967



# Safety



**WARNING! GENERAL SAFETY.** Using this product in a manner not specified in the user documentation may result in personal injury or damage to the instrument or device. Ensure that anyone using this product has received instructions in general safety practices for laboratories and the safety information provided in this document.

- Before using an instrument or device, read and understand the safety information provided in the user documentation provided by the manufacturer of the instrument or device.
  - Before handling chemicals, read and understand all applicable Safety Data Sheets (SDSs) and use appropriate personal protective equipment (gloves, gowns, eye protection, etc). To obtain SDSs, see the “Documentation and Support” section in this document.
-

## Chemical safety



---

**WARNING! GENERAL CHEMICAL HANDLING.** To minimize hazards, ensure laboratory personnel read and practice the general safety guidelines for chemical usage, storage, and waste provided below. Consult the relevant SDS for specific precautions and instructions:

- Read and understand the Safety Data Sheets (SDSs) provided by the chemical manufacturer before you store, handle, or work with any chemicals or hazardous materials. To obtain SDSs, see the “Documentation and Support” section in this document.
  - Minimize contact with chemicals. Wear appropriate personal protective equipment when handling chemicals (for example, safety glasses, gloves, or protective clothing).
  - Minimize the inhalation of chemicals. Do not leave chemical containers open. Use only with adequate ventilation (for example, fume hood).
  - Check regularly for chemical leaks or spills. If a leak or spill occurs, follow the manufacturer’s cleanup procedures as recommended in the SDS.
  - Handle chemical wastes in a fume hood.
  - Ensure use of primary and secondary waste containers. (A primary waste container holds the immediate waste. A secondary container contains spills or leaks from the primary container. Both containers must be compatible with the waste material and meet federal, state, and local requirements for container storage.)
  - After emptying a waste container, seal it with the cap provided.
  - Characterize (by analysis if necessary) the waste generated by the particular applications, reagents, and substrates used in your laboratory.
  - Ensure that the waste is stored, transferred, transported, and disposed of according to all local, state/provincial, and/or national regulations.
  - **IMPORTANT!** Radioactive or biohazardous materials may require special handling, and disposal limitations may apply.
-

## Biological hazard safety



**WARNING! BIOHAZARD.** Biological samples such as tissues, body fluids, infectious agents, and blood of humans and other animals have the potential to transmit infectious diseases. Conduct all work in properly equipped facilities with the appropriate safety equipment (for example, physical containment devices). Safety equipment can also include items for personal protection, such as gloves, coats, gowns, shoe covers, boots, respirators, face shields, safety glasses, or goggles. Individuals should be trained according to applicable regulatory and company/ institution requirements before working with potentially biohazardous materials. Follow all applicable local, state/provincial, and/or national regulations. The following references provide general guidelines when handling biological samples in laboratory environment.

- U.S. Department of Health and Human Services, *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories (BMBL)*, 5th Edition, HHS Publication No. (CDC) 21-1112, Revised December 2009; found at:  
[www.cdc.gov/biosafety/publications/bmb15/BMBL.pdf](http://www.cdc.gov/biosafety/publications/bmb15/BMBL.pdf)
- World Health Organization, *Laboratory Biosafety Manual*, 3rd Edition, WHO/CDS/CSR/LYO/2004.11; found at:  
[www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/Biosafety7.pdf](http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/Biosafety7.pdf)



# Documentation and support

## Customer and technical support

Visit [thermofisher.com/support](http://thermofisher.com/support) for the latest in services and support, including:

- Worldwide contact telephone numbers
- Product support, including:
  - Product FAQs
  - Software, patches, and updates
  - Training for many applications and instruments
- Order and web support
- Product documentation, including:
  - User guides, manuals, and protocols
  - Certificates of Analysis
  - Safety Data Sheets (SDSs; also known as MSDSs)

**Note:** For SDSs for reagents and chemicals from other manufacturers, contact the manufacturer.

## Limited product warranty

Life Technologies Corporation and/or its affiliate(s) warrant their products as set forth in the Life Technologies' General Terms and Conditions of Sale found on Life Technologies' website at [www.thermofisher.com/us/en/home/global/terms-and-conditions.html](http://www.thermofisher.com/us/en/home/global/terms-and-conditions.html). If you have any questions, please contact Life Technologies at [www.thermofisher.com/support](http://www.thermofisher.com/support).

## Anexo 5: Protocolo de uso POWER UP™ SYBR® Green Master Mix

appliedbiosystems

PROTOCOL

PowerUp SYBR Green Master Mix

# Guidelines for comparing SYBR Green master mixes

Take the master mix challenge—compare your current master mix to Applied Biosystems™ PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix using this simple protocol. In our own experiments, we found that PowerUp SYBR Green Master Mix outperformed other master mixes when comparing specificity, PCR efficiency, dynamic range, and precision over multiple targets.

This protocol is for the comparison of PowerUp SYBR Green Master Mix to one other master mix using 20 µL reactions in triplicate. Adjust volumes as needed.

### Reaction preparation

1. Prepare 10-fold dilution series of template.

| Dilution         | Template                 | Nuclease-free water |
|------------------|--------------------------|---------------------|
| Undiluted        | 40 µL of 20 ng/µL DNA    | —                   |
| 10 <sup>-1</sup> | 4 µL of undiluted DNA    | 36 µL               |
| 10 <sup>-2</sup> | 4 µL of 10 <sup>-1</sup> | 36 µL               |
| 10 <sup>-3</sup> | 4 µL of 10 <sup>-2</sup> | 36 µL               |
| 10 <sup>-4</sup> | 4 µL of 10 <sup>-3</sup> | 36 µL               |
| 10 <sup>-5</sup> | 4 µL of 10 <sup>-4</sup> | 36 µL               |
| 10 <sup>-6</sup> | 4 µL of 10 <sup>-5</sup> | 36 µL               |

### General guidelines

- Use the manufacturer's recommended primer and template DNA concentrations
- Use the manufacturer's recommended thermal cycling parameters
- Run a standard curve to compare PCR efficiency, sensitivity, dynamic range, and precision
- Run reactions in triplicate to measure reproducibility
- Perform a melt curve to analyze specificity

2. Prepare enough master mix for 26 x 20 µL reactions for each qPCR master mix to be tested, according to the volumes in the table below. Mix thoroughly.

| Component             | PowerUp SYBR Green Master Mix | Master mix for comparison     |
|-----------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| qPCR master mix, 2X   | 260 µL                        | 260 µL                        |
| Forward primer, 10 µM | 26 µL*                        | Manufacturer's recommendation |
| Reverse primer, 10 µM | 26 µL*                        | Manufacturer's recommendation |
| Nuclease-free water   | 78 µL (final volume 390 µL)   | Adjust to 390 µL              |

\* Volumes shown are for 500 nM primer. The recommended primer concentration for PowerUp SYBR Green Master Mix is 300–800 nM.

**ThermoFisher**  
SCIENTIFIC

- Pipet 15  $\mu\text{L}$  of the PowerUp SYBR Green mix prepared in step 2 to each well of a 96-well optical plate according to the plate map below.
- Pipet 5  $\mu\text{L}$  of the indicated dilution from step 1 into each well of the plate according to the plate map below. For no-template control (NTC) reactions, use 5  $\mu\text{L}$  of nuclease-free water.

|   | 1 | 2 | 3 | 4 | 5         | 6         | 7         | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|---|---|---|---|---|-----------|-----------|-----------|---|---|----|----|----|
| A |   |   |   |   | Undiluted | Undiluted | Undiluted |   |   |    |    |    |
| B |   |   |   |   | $10^{-1}$ | $10^{-1}$ | $10^{-1}$ |   |   |    |    |    |
| C |   |   |   |   | $10^{-2}$ | $10^{-2}$ | $10^{-2}$ |   |   |    |    |    |
| D |   |   |   |   | $10^{-3}$ | $10^{-3}$ | $10^{-3}$ |   |   |    |    |    |
| E |   |   |   |   | $10^{-4}$ | $10^{-4}$ | $10^{-4}$ |   |   |    |    |    |
| F |   |   |   |   | $10^{-5}$ | $10^{-5}$ | $10^{-5}$ |   |   |    |    |    |
| G |   |   |   |   | $10^{-6}$ | $10^{-6}$ | $10^{-6}$ |   |   |    |    |    |
| H |   |   |   |   | NTC       | NTC       | NTC       |   |   |    |    |    |

- Repeat steps 3–4 for the other master mix to be compared, using a new plate. Reactions can be loaded on the same plate if the thermal protocols are identical.
- Mix the components thoroughly. Seal the plates, and briefly centrifuge to remove any bubbles.

### Real-time PCR

- Place the plate in the instrument.
- Set the thermal cycling conditions.
  - For PowerUp SYBR Green Master Mix, use one of the following conditions:

– Standard cycling (for most instruments and primer  $T_m \geq 60^\circ\text{C}$ )

| Step                  | Temperature          | Time   | Cycles |
|-----------------------|----------------------|--------|--------|
| UDG activation        | $50^\circ\text{C}$   | 2 min  | Hold   |
| Polymerase activation | $95^\circ\text{C}$   | 2 min  | Hold   |
| Denaturation          | $95^\circ\text{C}$   | 15 sec | 40     |
| Annealing/extension   | $60^\circ\text{C}^*$ | 1 min  |        |

\* For primers with  $T_m < 60^\circ\text{C}$ , please refer to the PowerUp SYBR Green Master Mix instruction manual.

– Fast cycling (for Applied Biosystems™ ViiA™ 7, QuantStudio™, 7500 Fast, StepOne™, and StepOnePlus™ instruments and primer  $T_m \geq 60^\circ\text{C}$ )

| Step                  | Temperature                 | Time                     | Cycles |
|-----------------------|-----------------------------|--------------------------|--------|
| UDG activation        | $50^\circ\text{C}$          | 2 min                    | Hold   |
| Polymerase activation | $95^\circ\text{C}$          | 2 min                    | Hold   |
| Denaturation          | $95^\circ\text{C}$          | 1* or 3 <sup>†</sup> sec | 40     |
| Annealing/extension   | $60^\circ\text{C}^\ddagger$ | 30 sec                   |        |

\* For ViiA 7 or QuantStudio instruments.

<sup>†</sup> For 7500 Fast, StepOne, or StepOnePlus instruments.

<sup>‡</sup> For primers with  $T_m < 60^\circ\text{C}$ , please refer to the PowerUp SYBR Green Master Mix instruction manual.

- Include conditions for melt curve analysis after the PCR stage. On Applied Biosystems™ instruments, use the default continuous melt curve setting, which on most newer instruments are:

| Stage            | Step                     | Ramp rate  | Temperature | Time   |
|------------------|--------------------------|------------|-------------|--------|
| Melt curve stage | Step 1                   | 1.6°C/sec  | 95°C        | 15 sec |
|                  | Step 2                   | 1.6°C/sec  | 60°C        | 1 min  |
|                  | Step 3<br>(dissociation) | 0.15°C/sec | 95°C        | 15 sec |

- For Applied Biosystems instruments, use the following settings:

Experiment type: Standard curve  
 Reagent: SYBR Green reagents  
 Reporter: SYBR  
 Quencher: None  
 Passive reference dye: ROX™  
 Ramp speed: Standard or Fast (choose the corresponding thermal cycler profiles in step 2 above)  
 Melt curve ramp increment: Continuous

See the instrument instruction manual for more information or if using a different instrument.

3. Run the plate. Repeat the run setup for the other master mix being tested using the manufacturer's recommended thermal cycling profile.

### Data analysis

In most qPCR systems, the data can be analyzed by the qPCR system software.

**Slope and amplification efficiency:** The amplification efficiency is calculated using the slope of the regression line of the standard curve. A slope of  $-3.323$  indicates optimal 100% PCR amplification efficiency. Reactions with efficiencies of  $100\% \pm 10\%$  over a broad dynamic range are needed to reliably use the  $\Delta\Delta C_t$  method for gene expression analysis.

**Caution:** Don't be fooled by lower  $C_t$  values when comparing master mixes. The only way to compare the sensitivity and performance of two master mixes is by performing a dilution series and examining the amplification efficiency, linearity, and precision across the dilution range.

**R<sup>2</sup> value (correlation coefficient):** The R<sup>2</sup> value is a measure of the closeness of fit between the regression line and the individual  $C_t$  data of the standard curve reactions. A value of 1.00 indicates a perfect fit between the regression line and the data. An R<sup>2</sup> value  $>0.99$  is desirable.

**Standard deviation (precision):** Calculate the standard deviation of the  $C_t$  values for each dilution. To be able to quantify a 2-fold dilution with  $\geq 95\%$  confidence, the standard deviation of a dilution should be  $\leq 0.250$ .

**Melt curve (specificity):** View the melt curve using a derivative reporter plot (a plot of derivative reporter ( $-R_n$ ) vs. temperature). A single peak indicates specific amplification, whereas multiple peaks or shoulders indicate nonspecific amplification or primer-dimer formation.