



**INSTITUTO POTOSINO DE INVESTIGACIÓN
CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA, A.C.**

POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

**Diterpenos de *Salvia polystachya* bloquean la
diferenciación de preadipocitos múridos 3T3-F442A
disminuyendo la expresión de *PPAR γ* y *CEBP α***

Tesis que presenta

Francisco Daniel López Villegas

Para obtener el grado de

Maestro en Ciencias en Biología Molecular

Director de la Tesis:

Dr. Luis Antonio Salazar Olivo

San Luis Potosí, S.L.P., Enero de 2021.



Constancia de aprobación de la tesis

La tesis “**Diterpenos de *Salvia polystachya* bloquean la diferenciación de preadipocitos múridos 3T3-F442A disminuyendo la expresión de *PPAR* y *CEBP*α**”

presentada para obtener el Grado de Maestro en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por **Francisco Daniel López Villegas** y aprobada el **veintinueve de enero de dos mil veintiuno** por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Dr. Luis Antonio Salazar Olivo
Director de la tesis

Dr. Francisco Elihú Bautista Redonda
Miembro del Comité Tutorial

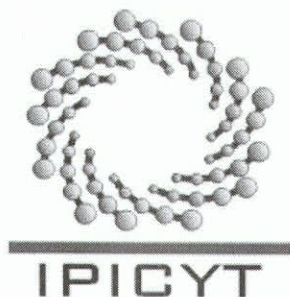
Dr. Ana Paulina Barba de la Rosa
Miembro del Comité Tutorial



Créditos Institucionales

Esta tesis fue elaborada en el Laboratorio de Biotecnología Médica y Pecuaria de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., bajo la dirección del Dr. Luis Antonio Salazar Olivo.

Durante la realización del trabajo el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (636066) y del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C.



Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Acta de Examen de Grado

El Secretario Académico del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., certifica que en el Acta 214 del Libro Primero de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Maestría en Ciencias en Biología Molecular está asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 4 días del mes de febrero del año 2021, se reunió a las 12:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

Dra. Ana Paulina Barba de la Rosa	Presidenta	IPICYT
Dr. Luis Antonio Salazar Olivo	Secretario	IPICYT
Dr. Francisco Elihú Bautista Redonda	Sinodal	IPICYT

a fin de efectuar el examen, que para obtener el Grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

sustentó el C.

Francisco Daniel López Villegas

sobre la Tesis intitulada:

Diterpenos de Salvia polystachya bloquean la diferenciación de preadipocitos muridos 3T3-F442A disminuyendo la expresión de PPAR γ Y CEBPa

que se desarrolló bajo la dirección de

Dr. Luis Antonio Salazar Olivo

El Jurado, después de deliberar, determinó

APROBARLO

Dándose por terminado el acto a las 13:28 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fe el Secretario Académico del Instituto.

A petición del interesado y para los fines que al mismo convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 4 días del mes de febrero de 2021.

Mtra. Ivonne Lizette Cuevas Vélez
Jefa del Departamento del Posgrado


Dr. Marcial Bonilla Marin
Secretaria Académica



IPICYT
SECRETARÍA ACADÉMICA
INSTITUTO POTOSINO DE
INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA
Y TECNOLÓGICA, A.C.

Dedicatorias

A Dios, por estar siempre en mi camino.

A mi madre, por su ejemplo de esfuerzo, de nunca rendirte, por apoyarme en todo y tu cariño siempre incondicional.

A mi madrina Lourdes Quezada por sus palabras, guía, consejos y por su apoyo también siempre incondicional. Sé que seguirás pidiendo por nosotros y cuidándonos desde donde ahora estás.

A mi familia Quezada Cervantes, por estar siempre conmigo y por todo el cariño que siempre me han brindado, por quienes se nos han adelantado, abuelita Martha, a mi abuelito Heliodoro por su ejemplo, a mi tía Concha, primo Israel, tía Vis, trataré de mantener presentes tus consejos, ingenio y creatividad. Siempre estarán con nosotros y conmigo, por lo que he vivido con ustedes y por sus enseñanzas. Gracias.

A mi familia en Durango, aunque nos vemos poco, siento muy cerca su cariño y su apoyo lo tengo siempre presente.

Agradecimientos

Agradezco al CONACYT por la beca otorgada.

Al IPICYT por la beca otorgada durante el curso propedéutico y porque al darme la oportunidad de entrar en su programa de maestría en biología molecular pude continuar con mi interés por la investigación.

Al Dr. Luis Antonio Salazar Olivo por permitirme ser parte de su grupo de trabajo, por su paciencia, consejos y asesoría.

Al Consorcio de Investigación, Innovación y Desarrollo para las Zonas Áridas (CIIDZA) a través del Dr. Francisco Elihú Bautista Redonda quien nos proporcionó los compuestos purificados y caracterizados que se evaluaron en este trabajo de tesis, por su asesoría, amistad y siempre buena disposición para ayudar.

A la Dra. Angélica Montoya Contreras por enseñarme a trabajar en el cultivo celular y biología molecular con toda la paciencia y disposición que tiene para con todos los estudiantes que vamos formando parte del grupo de investigación.

A mis compañeros del laboratorio del grupo de investigación, Claudia primera en ofrecermme consejos y amistad al igual que Viri y Olmo. A Eva y Nataly, quienes se incorporaron después y también compartí buenos momentos. A todos: gracias por ayudarme, compartirme de su tiempo y experiencia.

A mis compañeros del laboratorio del Dr. Rubén, con quienes juntos conformamos el laboratorio 3; Clara, Billy, Mariana, Víctor, Lalo, Argenis, Kevin que fueron con quienes más me tocó convivir y siempre fueron muy buenos compañeros y con quienes siempre fue fácil tener un agradable ambiente de trabajo y convivencias. A Gloria, gracias por tu hospitalidad y amistad para con todos en el laboratorio y tener siempre una gran sonrisa y todo listo para poder realizar los experimentos

A Mireya Sánchez, una gran persona y siempre con la ayuda adecuada en acciones o palabras.

Igualmente al Dr. Rubén López Revilla quien siempre en su plática permeaba su experiencia y enseñanzas.

Al Dr. Sergio Casas, por su paciencia y humanidad para desempeñar su labor como Secretario. Académico.

A mis compañeros de generación. Les deseo siempre lo mejor.

A mis primeros roomies en San Luis, Daniel y Ricardo por su apoyo, comprensión y amistad.

A Leo, muchas gracias por tu amistad y por todo, hermano.

A todos los solo por hoy, Norma, gracias por todo. Pancho, gracias por tu amistad y por ser bien ley siempre, muchas gracias. A la bandita chilanga y no tan chilanga que me fue presentada y prestada. A Daniel, gracias por tu apoyo.

Agradecido siempre con el de arriba, pero el de más arriba.

Contenido

Constancia de aprobación de la tesis	ii
Créditos Institucionales	iii
Acta del Examen.....	iv
Agradecimientos	vi
Lista de figuras	ix
Resumen	x
Abstract	xii
Introducción	1
Materiales y métodos	6
Resultados	10
Discusión	13
Conclusiones	18
Referencias	19
Pies de figura	22
Figuras.....	24

Lista de figuras

1. Efecto de los diterpenos SPO2, SPOB y SPOL sobre la viabilidad de preadipocitos 3T3-F442A.	35
2. Efecto de los compuestos SPO2, SPOB y SPOL sobre la adipogénesis de preadipocitos 3T3-F442A.	36
3. Efecto de los compuestos SPO2, SPOB y SPOL sobre la adipogénesis de preadipocitos 3T3-F442A.	37
4. Efecto de los compuestos SPO2, SPOB y SPOL sobre la expresión de los genes PPAR γ y CEBP α de preadipocitos 3T3-F442A.	38

Resumen

El interés por estudiar el tejido adiposo deriva de su importante papel en el metabolismo energético, su función como regulador hormonal y su relación con enfermedades como la obesidad y diabetes. Es de utilidad saber qué compuestos pueden modificar los mecanismos que rigen las funciones del tejido adiposo como regulador hormonal, metabólico, de almacenamiento energético y ayudar a resolver los padecimientos debido a variantes en esos mecanismos. Algunos de esos compuestos pueden tener diferentes orígenes, desde compuestos sintéticos hasta productos naturales a los que el conocimiento popular atribuye propiedades terapéuticas pero cuyos mecanismos de acción se desconocen. Los diterpenos son metabolitos secundarios a los que estudiándolos se les han descrito diferentes actividades biológicas como el efecto insecticida y contra enfermedades que tiene lugar de forma natural en la planta que los sintetiza, además de otros efectos farmacológicos de interés como antiulcerígenos, antiinflamatorios, antibacteriales, entre otras, así como efectos sobre la diferenciación adiposa. En este trabajo evaluamos el efecto de los diterpenos *epi*-polistaquina G (SPO2), polistaquina B (SPOB) y linerolactona (SPOL) extraídos de *Salvia polystachya* sobre la diferenciación adiposa de preadipocitos murinos 3T3-F442A. Nuestros resultados muestran que concentraciones menores de 80 μ M de estos diterpenos no comprometen negativamente la proliferación celular y muestran un efecto en la disminución de la acumulación lipídica así como una disminución en la expresión de factores de transcripción clave en la síntesis lipídica como PPAR γ y C/EBP α .

Palabras clave: Diterpenos, Adipogénesis, Tejido Adiposo, Actividad Biológica.

Abstract

The interest in studying adipose tissue derives from its important role in energy metabolism, its function as a hormonal regulator and its relationship with diseases such as obesity and diabetes. It is useful to know which compounds can modify these mechanisms and help resolve the ailments due changes in these mechanisms. Some of these compounds may have different origins, from synthetic compounds to natural products to which popular knowledge attributes therapeutic properties but whose action mechanism are unknown. Diterpenes are secondary metabolites in which different biological activities have been described such as the insecticidal effect and against diseases that occur naturally in the plant that synthesizes them, in addition to other pharmacological effects of interest such as antiulcerogenic, anti-inflammatory, antibacterial, among others, as well as effects on adipose differentiation. In this work we evaluate the effect of three diterpenes extracted from *Salvia polystachya* on the adipose differentiation of murine preadipocytes 3T3-F442A. Our results show that concentrations less than 80 μM of these diterpenes do not negatively compromise cell proliferation and show an effect on the decrease in lipid accumulation as well as a decrease in the expression of key transcription factors in lipid synthesis such as PPAR γ and C/EBP α .

Key words: Diterpenes, Adipogénesis, Adipose Tissue, Biological Activity.

Introducción

La adipogénesis es el proceso en el cual células fibroblásticas se diferencian en adipocitos que conforman el tejido adiposo y que llevan a cabo principalmente la función de almacén de energía y realizan otras como secreción hormonal, homeostasis energética y termorregulación. El tejido adiposo es dinámico y responde tanto a señales homeostáticas como a señales externas y es capaz de expandirse hasta 15 veces su tamaño original [1]. El crecimiento del tejido adiposo involucra el aumento de tamaño de las células adiposas y la formación de nuevos adipocitos a partir de células precursoras no diferenciadas, los preadipocitos. Éstos son células fibroblásticas que al someterse a determinados factores presentes en la sangre se inducen su compromiso hacia la conversión adiposa [2]. El tejido adiposo de mamíferos se puede clasificar, de manera general, en dos tipos: tejido adiposo café y tejido adiposo blanco, los cuales realizan diferentes funciones [3]. La función principal del tejido adiposo café es producir calor y mantener la temperatura corporal, a partir de la oxidación de la grasa almacenada. En tanto, el tejido adiposo blanco almacena el exceso de energía en forma de triglicéridos con la finalidad de utilizarlos en periodos de privación calórica [4].

El almacenamiento y consumo de la energía requiere de la lipogénesis y del uso de triglicéridos a través del proceso de lipólisis. Además, el tejido adiposo blanco también tiene funciones endócrinas que contribuyen a la regulación de la homeostasis energética a través de la secreción de varias hormonas derivadas de tejido adiposo o adipocinas. El adipocito realiza la mayoría de las funciones del

tejido adiposo blanco como el transporte de lípidos y glucosa, movilización y síntesis de ácidos grasos, regulación de la sensibilidad a la insulina y funciones endócrinas. Estas células provienen de preadipocitos no diferenciados que llevan a cabo el proceso de diferenciación terminal principalmente a través de un proceso complejo llevado a cabo por una cascada transcripcional que involucra al receptor nuclear gamma activado por inductores de la proliferación de peroxisomas (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor gamma; PPAR- γ) y por miembros de la familia de proteínas de unión a enhancer CCAAT (CCAAT/Enhancer Binding Protein; C/EBP) [5]. La diferenciación adiposa es inducida por diversos estímulos hormonales como los glucocorticoides, adenosín monofosfato cíclico (cAMP) y la insulina. En esta inducción está involucrada una cascada secuencial transcripcional que comienza con una elevada expresión transitoria de C/EBP β y C/EBP δ , que a su vez promueven la expresión de los factores de transcripción C/EBP α y PPAR- γ involucrados en la diferenciación adiposa terminal. Estos dos últimos factores cooperan para inducir la diferenciación terminal aumentando la expresión de genes relacionados con el desarrollo de funciones adiposas como lo son el transportador de glucosa (GLUT 4), transportadores de ácidos grasos aP2, receptores de insulina y enzimas involucradas en la síntesis de triglicéridos (e.g., ácidos grasos sintasa [FAS]) y con la lipólisis (e.g., hormona sensible a lipasa [HSL]) [6]. Mediante la evaluación de ganancia y pérdida de función tanto en estudios *in vivo* como *in vitro* se ha establecido que los factores de transcripción PPAR- γ y C/EBP son los reguladores maestros de la diferenciación adiposa. PPAR- γ desempeña un papel principal en el control de la adipogénesis y se ha mostrado que es necesario y suficiente en el desarrollo de la diferenciación

adiposa. Se ha visto que forzando la expresión de PPAR- γ en células fibroblásticas no adipogénicas se induce la diferenciación adiposa [7]. Así como el hecho inverso, la pérdida de función de PPAR- γ reduce o elimina la adipogénesis *in vivo* e *in vitro* [8] y también influye en mantener el estado diferenciado de las células adiposas ya que una disminución en la expresión de PPAR- γ induce una desdiferenciación que se refleja en la disminución de la expresión de marcadores moleculares de adipogénesis [9].

Aparentemente C/EBP controla la expresión PPAR- γ . La expresión transitoria de C/EBP- β y C/EBP- δ durante etapas iniciales de la conversión adiposa muestra que promueven la expresión de C/EBP- α y PPAR- γ [5]. Forzar la expresión de C/EBP- β promueve la diferenciación adiposa incluso en ausencia de inductores hormonales que normalmente son requeridos para la diferenciación. Aunque se sabe que la expresión de C/EBP β y C/EBP δ aparece más temprano que la expresión de PPAR- γ durante el proceso de diferenciación, parece que estos dos factores no son absolutamente necesarios para el desarrollo del tejido adiposo blanco ya que se ha visto que ratones deficientes del gen *Cebpb*, aunque tienen una reducción apreciable de tejido adiposo blanco, células embrionarias mesenquimales derivadas de estos ratones todavía son capaces de diferenciarse *in vitro* en adipocitos aunque de manera no muy eficiente [10]. Las alteraciones en el tejido adiposo y los procesos que realiza están relacionadas con el origen de padecimientos como la obesidad, la diabetes mellitus y otras enfermedades metabólicas. Es por ello que alcanzar un mayor entendimiento del proceso de diferenciación celular es necesario para desarrollar estrategias que ayuden a

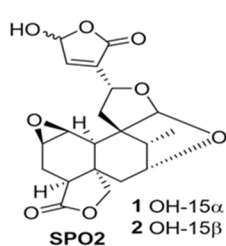
plantear soluciones tanto de tratamiento como de prevención contra esos padecimientos.

El uso de productos de origen natural para el tratamiento de diversos padecimientos es una actividad milenaria realizada por el hombre. Sin embargo, es necesario entender cuáles son los mecanismos por los que actúan los compuestos presentes en dichas fuentes de productos naturales y no permanecer en la especulación empírica sobre el efecto de dichos compuestos. El aislamiento, purificación, caracterización y evaluación biológica de compuestos naturales presentes en diferentes organismos, que forman parte de una antigua tradición popular del uso de dichos productos, puede ayudar a precisar los mecanismos de la adipogénesis.

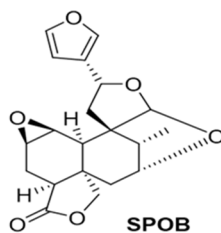
Se ha reportado que los componentes de la matriz extracelular y la modificación en su expresión tienen un efecto sobre la adipogénesis en diversas líneas celulares, lo que sugiere diferencias específicas entre diferentes depósitos grasos y entre especies [11].

Los diterpenos son metabolitos secundarios encontrados en organismos terrestres y marinos formados por unidades de terpenos los cuales son compuestos orgánicos derivados de isopreno (2-metilbuta-1,3-dieno), estructura que contiene 5 átomos de carbono. Éstos se clasifican con base en el número de unidades de isopreno presentes, de tal manera que los denominados hemiterpenos están constituidos por una sola unidad de isopreno, esto es 5 átomos de carbono en su estructura, los monoterpenos por 10 átomos carbono, los sesquiterpenos por 15 átomos de carbono y los diterpenos están formados por cuatro unidades de isopreno y tienen un esqueleto de 20 átomos de carbono [12].

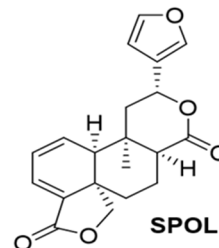
Los diterpenos *epi*-polistaquina G, polistaquina B y linerolactona extraídos de *Salvia polystachya* han mostrado tener un efecto moderado y alto sobre la expresión de componentes de la matriz extracelular como colágena tipo I, tipo III, tipo V y elastina en fibroblastos dérmicos humanos [13].



***epi*-polistaquina G**
PM: 390.38 g/mol



polistaquina B
PM: 358.38 g/mol



linerolactona
PM: 340.37 g/mol

Por lo anterior resulta interesante evaluar si esta relación se presenta con diterpenos de otras fuentes así como en diferentes líneas celulares como 3T3-F442A, su efecto sobre el crecimiento celular, acumulación lipídica y sobre la expresión de mRNA de genes involucrados en la diferenciación adiposa como C/EBPα y PPARγ.

Materiales y métodos

Cultivo celular

Los cultivos de preadipocitos 3T3-F442A requeridos para los experimentos realizados se mantuvieron en condiciones de proliferación permanente, evitando que las células devinieran confluentes, en medio L15 (Gibco) suplementado con 10% de suero de ternera (ST) (HyClone) (MB, medio basal). Los cultivos se realimentaron cada 48 h con MB fresco y se mantuvieron a 37 °C, en una atmósfera humidificada de libre intercambio de gases.

Determinación de concentraciones no tóxicas de los diterpenos *epi-polistaquina G (SPO2)*, *polistaquina B (SPOB)* y *linerolactona (SPOL)* para ensayos biológicos

Se inocularon preadipocitos 3T3-F442A a una densidad de 1×10^4 células/pozo en placas de cultivo de 24 pozos (Corning) en medio L15 (Gibco) suplementado con 10% de suero de ternera (ST) (Hyclone) (MB, medio basal). Después de 48 h los cultivos fueron alimentados con MB adicionados con 1, 10 y 30 $\mu\text{g/ml}$ de los diterpenos *epi-polistaquina G (SPO2)*, *polistaquina B (SPOB)* y *linerolactona (SPOL)* extraídos de las partes aéreas de *Salvia polystachya* proporcionados por el Dr. F. Elihú Bautista Redonda del Consorcio de Investigación, Innovación y Desarrollo para las Zonas Áridas (CIIDZA) [13]. Después de 48 h de tratamiento se añadieron al medio de cultivo 15 μl de MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio) a 5 mg/ml disuelto en PBS (amortiguador de sales de fosfato) a cada pozo y se incubaron 3 h a 37 °C.

Posteriormente se recuperó el medio de cultivo y se midió su densidad óptica (D.O.) a 590 nm usando muestras de pozos sin células como blancos. La viabilidad de las células tratadas se estimó a partir del crecimiento relativo con la siguiente fórmula:

$$viabilidad\ relativa = \frac{D.O.\ control - D.O.\ muestra}{D.O.\ control} \times 100$$

Efecto de los diterpenos SPO2, SPOB y SPOL sobre la diferenciación de preadipocitos 3T3-F442A

Los preadipocitos 3T3-F442A preconfluentes fueron diferenciados en condiciones adipogénicas como control positivo con medio adipogénico (MA; medio L15 adicionado con 10% ST, 5 µg/ml de insulina, 0.5 g/l glucosa y 1 µM de D-biotina) y como control negativo, condiciones no adipogénicas con MB y condiciones antiadipogénicas; MA adicionado con ácido retinóico (AR) 1 µM. El efecto sobre la diferenciación de los preadipocitos 3T3-F442A se evaluó añadiendo los diterpenos en concentraciones no tóxicas al MA. Después de ocho días en cultivo con cambio de medio cada 48 h se evaluó el grado de diferenciación adipogénica por conteo directo en hemocitómetro, cuantificación de la acumulación lipídica intracelular por tinción con rojo oleoso (Ramírez-Zacarías et al. 1992) [14] y cuantificando la expresión génica de marcadores moleculares para PPARγ y CEBPα mediante RT-PCR.

Acumulación lipídica

El efecto de los diterpenos sobre la adipogénesis se estimó cuantificando la acumulación lipídica intracelular mediante tinción con rojo Oleoso [14]. El 100% de acumulación lipídica fue determinando restando los valores obtenidos bajo condiciones no adipogénicas a los obtenidos en condiciones adipogénicas.

Análisis de RT-PCR

El ARN total de los preadipocitos 3T3-F442A tratados como se mencionó anteriormente se extrajo con TRIzol y se usó para una llevar a cabo una reacción de transcriptasa reversa y obtener ADNc sintetizado a partir de 1 µg de ARN total usando 200 U de transcriptasa reversa (M-MLV RT) y 0.5 µg de oligos dT. La PCR fue realizada en un volumen final del 15 µl, que contiene 500 ng de la siguiente mezcla de reacción de transcriptasa reversa: 1.5 mM de MgCl₂, 0.2 mM de dNTP, 0.2 µM de cada primer y 1.25 U de Taq DNA polimerasa. Se usaron 33 ciclos térmicos para GAPDH y 30 ciclos para PPARγ y C/EBPα los cuales consistieron en una temperatura de desnaturalización inicial de 95 °C por 4 min, luego 95 °C por 30 s, 62 °C por 1 min para GAPDH y PPARγ y de 60 °C por 1 min para C/EBPα, luego 72 °C por 1 min. Los ciclos terminaron con una extensión final a 72 °C por 5 min. El nivel de la expresión del ARNm del gen constitutivo GAPDH (Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa) fue usado para comparar la expresión de los genes PPARγ y C/EBPα. Los siguientes oligonucleótidos fueron usados como primers: GAPDH (fw: 5'-GAAGGTGGTGAAGCAGGCGT-3', rv: 5'-ATGTGGGCCCATGAGGTCCACCA-3'), PPARγ (fw: 5'-GCATCAGGCTTCCACTATGG-3', rv: 5'-ACCTGATGGCATTGTGAGAC-3'),

C/EBP α (fw: 5'-GGCAAAGCCAAGAAGTCGGTGG-3', rv: 5'-AGCGTGTCCAGTTCACGGCTCA-3'). El producto de esta PCR se corrió en geles de agarosa 1.5%, cada banda fue cuantificada con el software ImageLab (Bio-Rad).

Resultados

Determinación de las concentraciones no tóxicas de SPO2, SPOB y SPOL para ensayos in vitro

Para evaluar los efectos de los diterpenos SPO2, SPOB y SPOL sobre la diferenciación de preadipocitos 3T3-F442A se determinaron las concentraciones de estos compuestos que no afectan la viabilidad celular de los preadipocitos. Los diterpenos SPO2 a 76.8 μM , SPOB a 83.7 μM y SPOL a 88.1 μM redujeron al quinto día la viabilidad celular en un 35%, 34% y 56% respectivamente, comparada con las células no tratadas. SPO2 a 25.6 μM , SPOB a 27.9 μM y SPOL a 29.3 μM redujeron al quinto día la viabilidad celular en un 20%, 19% y 21% respectivamente, comparada con las células no tratadas (Fig. 1). A concentraciones menores, los diterpenos no afectaron de forma apreciable la viabilidad celular, por lo que los efectos de los diterpenos SPO2, SPOB y SPOL sobre la diferenciación adiposa fueron evaluados en un intervalo de concentraciones de 60 a 80 μM .

Los diterpenos SPO2, SPOB y SPOL ejercen un efecto antiadipogénico leve a moderado sobre preadipocitos 3T3-F442A

Para determinar si SPO2, SPOB y SPOL afectan el desarrollo del tejido adiposo, evaluamos sus efectos sobre la adipogénesis mûrida. Los diterpenos, SPO2, SPOB y SPOL agregados al medio adipogénico (MA), ejercieron efectos antiadipogénicos de leves a moderados.

La conversión adiposa de cultivos tratados con SPO2 a una concentración de 60 μ M fue de 39%, mientras que a 70 μ M fue de 42% y a 80 μ M la conversión adiposa observada fue de 41%, respecto al control con medio adipogénico. Al tratar los cultivos con SPOB a una concentración de 60 μ M se observó un 33% de conversión adiposa, a 70 μ M fue de 38% y a 80 μ M la conversión fue de 28%. Para los cultivos tratados con SPOL, a una concentración de 60 μ M la conversión adiposa fue de 33%, a 70 μ M fue de 39% mientras que a 80 μ M fue de 35% (Fig. 2). Observándose un efecto dosis-dependiente.

La acumulación lipídica se midió tiñendo con rojo oleoso los preadipocitos 3T3-F442A al día 8 de tratamiento. Las micrográficas muestran diferentes grados de disminución en la diferenciación adiposa ejercida por los diferentes diterpenos probados a las concentraciones mencionadas anteriormente (Fig. 3A). El porcentaje de acumulación lipídica observada para los cultivos tratados con el diterpeno SPO2 a una concentración de 60 μ M fue de 65%, a 70 μ M fue de 39% y 40% a 80 μ M. Para el tratamiento de los cultivos con SPOB el porcentaje de acumulación lipídica fue de 83% a 60 μ M, a 70 μ M fue de 63% y de 69 % a 80 μ M. 72% de acumulación lipídica fue observada al tratar los cultivos con SPOL a una concentración de 60 μ M, 61% a 70 μ M, y a 80 μ M fue de 54% (Fig.3B).

Para entender los mecanismos moleculares que fundamentan el efecto antiadipogénico examinamos los diterpenos SPO2, SPOB y SPOL sobre la expresión del mRNA de los genes PPAR γ y C/EBP α mediante el análisis de la reacción de la transcriptasa reversa. La expresión del ARNm de PPAR γ disminuyó de manera similar a 60, 70 y 80 μ M de SPO2. El diterpeno SPOB mostró la menor expresión de PPAR γ a 80 μ M mientras que SPOL lo hace a 60 μ M en

comparación con los preadipocitos 3T3-F442A mantenidos en medio adipogénico (MA) (Fig. 4A). La expresión de ARNm de C/EBP α disminuyó en mayor medida a 80 μ M con el diterpeno SPO2. Con el diterpeno SPOB la mayor disminución de la expresión fue a 70 μ M y con SPOL a 80 μ M comparándola con la expresión observada en el cultivo mantenido en MA y usando para la medición la expresión de mRNA del gen constitutivo GAPDH como comparación (Fig. 4B).

Discusión

En este trabajo se evaluó el efecto de los diterpenos SPO2, SPOB y SPOL extraídos de *Salvia polystachya* sobre la diferenciación adiposa de los preadipocitos 3T3-F442A. Los cultivos preconfluentes de preadipocitos 3T3-F442A se trataron con los diterpenos mencionados para luego evaluar la proporción de células que se diferencian a adipocitos maduros, el grado de acumulación lipídica por tinción con rojo oleoso y la expresión de marcadores moleculares para mRNA de los genes PPAR γ y C/EBP α , involucrados en la diferenciación adipogénica, mediante PCR de transcripción reversa.

Los diterpenos de diferentes fuentes naturales han mostrado tener distintos efectos [15] biológicos adicionales a los que ejercen en los organismos en los que son producidos [16]. Entre ellos también han mostrado efectos en la diferenciación adiposa [17].

Al evaluar el efecto citotóxico de los diterpenos usados en este estudio se encontró que el diterpeno SPOL a una concentración mayor de 80 μ M reduce la viabilidad un 56% al quinto día de tratamiento, mientras que los diterpenos SPO2 y SPOB la reducen un 35% y un 34% a una concentración de 76.8 μ M y 83.7 μ M, respectivamente. Un efecto similar se observa en el caso de otros diterpenos como el ácido carnósico que muestra una menor toxicidad a concentraciones molares menores que las aquí usadas aunque en preadipocitos 3T3-L1 y en la que a concentraciones menores a las que se aprecia el efecto antiadipogénico se observa un incremento en la viabilidad celular debido probablemente a un efecto antioxidante

propio del diterpeno ácido carnósico extraído de la planta *Rosamarinus officinalis* [18].

Además, cabe notar que la diferencia del efecto ejercido por los diterpenos sobre la viabilidad celular pudiera radicar en lo distinto que son las estructuras de SPO2 y SPOB respecto a SPOL puesto que este último tiene una lactona en su estructura además de dos dobles enlaces C-C donde SPO2 Y SPOB tienen un ciclohexano.

Utilizando los diterpenos a concentraciones no citotóxicas para los cultivos de preadipocitos 3T3-F442A, se evaluó su efecto sobre la diferenciación adiposa. Se encontró que los tres compuestos a diferentes concentraciones disminuyen la conversión adiposa en comparación con la acumulación lipídica alcanzada en el medio adipogénico. Sin embargo, ninguno de los compuestos alcanzó valores similares a la disminución ejercida por el ácido retinóico. Aunque todos los compuestos evaluados disminuyen el grado de conversión adiposa, es diferente entre los compuestos y entre concentraciones. El compuesto que mostró una mayor disminución de conversión adiposa fue el diterpeno SPOB, disminuyéndola un 72% a 80 μ M. La mayor disminución en la conversión adiposa con el diterpeno SPO2 fue de 61% a 60 μ M mientras que con el diterpeno SPOL fue de 67% a 60 μ M. Otro diterpeno usado para evaluar un efecto en la diferenciación adiposa es el kahweol que mostró que disminuye la diferenciación adiposa. Kim et al mostró que este diterpeno inhibió la diferenciación de células 3T3-L1 empleándolo a una concentración de 40 μ M, exhibiendo una morfología de huso parecida a los preadipocitos [19].

Al cuantificar la acumulación lipídica se encontró que el diterpeno SPO2 provocó la mayor disminución de la acumulación lipídica, reduciéndola a un 60% tanto a 70 como a 80 μ M. La mayor disminución obtenida por SPOB fue de 37% a 70 μ M y de 47% para SPOL a 80 μ M.

Otro diterpeno con efectos antiadipogénicos es la tanshinona IIA, una quinona diterpénica aislada de *Salvia miltiorrhiza*, y cuyo efecto fue evaluado en células 3T3-L1 mostró que reduce la acumulación lipídica y de triglicéridos a una concentración de 10 μ M durante la diferenciación de los preadipocitos, lo que sugiere el efecto antiadipogénico de ese diterpeno. A un nivel mecanístico, la tanshinona IIA redujo los niveles de expresión de *C/EBP- α* , *PPAR γ* y *FAS* (fatty acid synthase) además de reducir la expresión a nivel de mRNA de leptina y resistina [20].

La expresión de ARNm de dos de los genes reguladores de la conversión adiposa fue evaluada y se encontró que la mayor disminución en la expresión de *PPAR γ* , comparándola con la expresión del gen constitutivo *GAPDH*, es lograda por el diterpeno SPOL a 60 μ M a un valor de 0.2 mientras que la menor expresión con SPO2 fue de 0.45 a 60 μ M y de 0.37 para SPOB a 80 μ M. La diferencia en estos valores puede radicar en los diferentes grupos funcionales de la estructura de los tres diferentes diterpenos. En todos los casos la disminución en la expresión fue mayor que la observada para el tratamiento con medio adipogénico (MA) pero no similar a la lograda por el efecto del ácido retinóico (AR).

La expresión de *C/EBP α* en comparación con la expresión del ARNm del gen constitutivo *GAPDH* disminuyó en todos los compuestos, comparándola con la expresión observada para las células en tratamiento con medio adipogénico (MA)

y fue similar a la obtenida por las tratadas con ácido retinóico (AR). Aunque la disminución en la expresión fue similar en todos los diterpenos usados, la menor expresión observada fue de 0.7 con el diterpeno SPOL a 80 μ M, seguida de 0.86 con el diterpeno SPOB a 70 μ M y de 0.9 para SPO2 a 80 μ M.

El hecho de que la expresión de PPAR γ sea menor que el valor de la expresión de C/EBP α sugiere que en el momento en que se está deteniendo el experimento la expresión de PPAR γ es baja, es decir la expresión del gen PPAR γ ya tuvo lugar y permanece en niveles bajos y aun así los diterpenos logran disminuir más la expresión del mRNA de ese gen, comparándola con la expresión de mRNA de C/EBP α lo que indica, inicialmente que al momento de detener el experimento y realizar la cuantificación el mRNA de C/EBP α ese gen tiene una mayor expresión que PPAR γ y que la disminución en la expresión de C/EBP α ejercida por los diterpenos es similar a la efectuada por el ácido retinóico. Lo que sugiere que si bien no es el mismo mecanismo, al menos disminuye de forma similar la expresión del mRNA de C/EBP α .

Esto sugiere que la manera en que los diterpenos SPO2, SPOB y SPOL ejercen el efecto antiadipogénico observado sobre los preadipocitos 3T3-F442A es a través de una regulación sobre C/EBP α y minoritariamente sobre la expresión de PPAR γ . Como en el caso del diterpeno tanshinona IIA donde se observa una relación en la disminución de la acumulación lipídica y una reducción en los niveles de expresión de C/EBP- α , PPAR γ y FAS (fatty acid synthase) además de reducir la expresión a nivel de mRNA de leptina y resistina sobre 3T3-L1 [20].

Otro diterpeno mostró efectos antiadipogénicos similares a la atorvastatina, probado compuesto con actividad antiadipogénica, es el caso del diterpeno de tipo

clerodano 16 α -hidroxicleroda-3, 13 (14) Z-dien-15, 16-olida aislado de *Polyalthia longifolia* que a nivel molecular redujo la expresión de mRNA de PPAR γ , C/EBP α y FABP4 [21].

Conclusiones

Los productos naturales son una opción para entender los mecanismos que tienen lugar durante la diferenciación adiposa ya que muchos de ellos se han utilizado de manera empírica para tratar algunos padecimientos relacionados a disfunciones del tejido adiposo. Por ello la caracterización y estudio de la actividad biológica de diferentes compuestos provenientes de productos naturales representa una posibilidad de seguir estudiando el proceso de diferenciación y obtener conocimiento sobre cómo actúan dichos compuestos en el tratamiento de padecimientos relacionados a la diferenciación adiposa.

Los tres diterpenos probados no comprometen negativamente la proliferación celular a concentraciones menores de 80 μ M.

Añadiéndolos a concentraciones cercanas a 80 μ M en condiciones preconfluentes, los diterpenos SPO2, SPOB y SPOL estudiados en este trabajo, inhiben la adipogénesis disminuyendo la acumulación lipídica y disminuyendo la expresión de ARNm de *PPAR γ* y *C/EBP α* en preadipocitos murinos 3T3-F422A.

Referencias

- [1]. F. M. Gregoire, C. M. Smas, H. S. Sul, Understanding adipocyte differentiation, *Physiol. Rev.* 168 (1998).
- [2]. D. C. Berry, D. Stenesen, D. Zee, J. M. Graff, The developmental origins of adipose tissue, *Development.* 140 (2013) 3939-3949.
- [3]. S. Gesta, C. R. Kahn, *Adipose Tissue Biology*, Springer, New York, 2012.
- [4]. D. G. Nicholls, R. M. Locke, Thermogenic mechanisms in brown fat, *Physiol. Rev.* 64 (1984) 1-64.
- [5]. S.R. Farmer, Transcriptional control of adipocyte formation, *Cell Metab.* 4 (2006) 263-273.
- [6]. E. D. Rosen, B. M. Spiegelman, Molecular regulation of adipogenesis, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 16 (2000) 145-171.
- [7]. P. Tontonoz, E. Hu, R. A. Graves, A. I. Budavari, B. M. Spiegelman, mPPAR gamma 2: tissue-specific regulator of an adipocyte enhancer, *Genes Dev.* 8 (1994) 1224-34.
- [8]. Y. Barak, M. C. Nelson, E. S. Ong, Y. Z. Jones, P. Ruiz-Lozano, K. R. Chien R. M. Evans, PPARgamma is required for placental, cardiac, and adipose tissue development, *Mol. Cel.* 4 (1999) 585-596.
- [9]. Y. Tamori, J. Masugi, N. Nishino, M. Kasuga, Role of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma in maintenance of the characteristics of mature 3T3-L1 adipocytes, *Diabetes.* 51 (2002) 2045–2055.

- [10]. T. Tanaka, N. Yoshida, T. Kishimoto, S. Akira, Defective adipocyte differentiation in mice lacking the C/EBPbeta and/or C/EBPdelta gene, *EMBO J.* 16 (1997) 7432–7443.
- [11]. E.C. M. Mariman, P. Wang, Adipocyte extracellular matrix composition, dynamics and role in obesity. *Cell. Mol. Life Sci.* 67 (2010) 1277–1292.
- [12]. T.M. Devlin, *Bioquímica*, cuarta ed., Reverté, Barcelona, 2008.
- [13]. E. Bautista, N. Ortiz-Pastrana, G. Pastor-Palacios, A. Montoya-Contreras, R. A. Toscano, J. Morales-Jiménez, L. A. Salazar-Olivo, A. Ortega, *neo*-Clerodane diterpenoids from *Salvia polystachya* stimulate the expression of extracellular matrix components in human dermal fibroblasts, *J. Nat. Prod.* 80, (2017) 3003-3009.
- [14]. J. L. Ramírez-Zacarías, F. Castro-Muñozledo, W. Kuri-Harcuch, Quantitation of adipose conversion and triglycerides by staining intracytoplasmic lipids with Oil red O, *Histochemistry.* 97 (1992) 493-497.
- [15]. R. Li, S. Morris-Natschke, K. Lee, Clerodane diterpenes: sources, structures, and biological activities, *Nat. Prod. Rep.* 33 (2016) 1166-1226.
- [16]. E. A. K. Gebbinck, B. J. M. Jansen, A. de Groot, Insect antifeedant activity of clerodane diterpenes and related model compounds, *Phytochemistry.* 61 (2002) 737–770.
- [17]. Y. Takeuchi, M. Suzawa, S. Fukumoto, T. Fujita, Vitamin K2 inhibits adipogenesis, osteoclastogenesis, and ODF/RANK ligand expression in murine bone marrow cell cultures, *Bone.* 27 (2000) 769-776.
- [18]. M. Gaya, V. Repetto, J. Toneatto, C. Anesini, G. Piwien-Pilipuk, S. Moreno, Antiadipogenic effect of carnosic acid, a natural compound present in *Rosmarinus*

officinalis, is exerted through the C/EBPs and PPAR γ pathways at the onset of the differentiation program, Biochim. Biophys. Acta. 1830 (2013) 3796-3806.

[19]. J. S. Kim, S. G. Lee, Y. J. Kang, T. K. Kwon, J. Nam, Kahweol inhibits adipogenesis of 3T3-L1 adipocytes through downregulation of PPAR γ , Nat. Prod. Res. 32 (2018) 1216-1219.

[20]. Y-K. Park, B. W. Obiang-Obounou, J. Lee, T-Y. Lee, M-A. Bae, K-S. Hwang, K-B. Lee, J-S. Choi, B-C. Jang, Anti-adipogenic effects on 3T3-L1 cells and zebrafish by tanshinone IIA, Int. J. Mol. Sci. 18 (2017) 2065.

[21]. M. Beg, K. Shankar, S. Varshney, S. Rajan, S. P. Singh, P. Jagdale, A. Puri, B. P. Chaudhari, K. V. Sashidhara, A. N. Gaikwad, A clerodane diterpene inhibit adipogenesis by cell cycle arrest and ameliorate obesity in C57BL/6 mice, Mol. Cell Endocrinol. 399 (2015) 373-385.

Pies de figura

Fig. 1. Efecto de los diterpenos SPO2, SPOB y SPOL sobre la viabilidad de preadipocitos 3T3-F442A. Preadipocitos 3T3-F442A fueron inoculados en placas de 96 pozos (0.5×10^4 células/pozo) en medio L15 suplementado con 10% de suero de ternera (medio basal, MB). Luego de 2 días, se les cambió el medio a MB adicionado con diferentes concentraciones de los compuestos SPO2, SPOB y SPOL. En los días indicados la viabilidad celular fue determinada por MTT.

Fig. 2. Efecto de los compuestos SPO2, SPOB y SPOL sobre la adipogénesis de preadipocitos 3T3-F442A. La diferenciación adiposa de preadipocitos 3T3-F442A fue inducida con medio adipogénico (MA) adicionado con concentraciones no tóxicas de los compuestos. Los cultivos control fueron mantenidos en medio basal (MB) o en medio adipogénico adicionado con $1 \mu\text{M}$ de ácido retinóico (AR) como condiciones de cultivo no adipogénicas. Siete días después se determinó por conteo directo en hematocitómetro el número total de células y de células diferenciadas y se calculó el porcentaje de conversión adiposa.

Fig. 3. Efecto de los compuestos SPO2, SPOB y SPOL sobre la adipogénesis de preadipocitos 3T3-F442A. Preadipocitos 3T3-F442A tratados con los compuestos SPO2, SPOB y SPOL a las concentraciones indicadas con cambios de medio cada tercer día. Los cultivos control fueron mantenidos en medio basal (MB) o en medio adipogénico adicionado con $1 \mu\text{M}$ de ácido retinóico (AR) como condiciones de cultivo no adipogénicas. Después de siete días los cultivos fueron fijados y teñidos con rojo oleoso (A) y la conversión adiposa fue estimada cuantificando la acumulación lipídica intracitoplásmica (B).

Fig. 4. Efecto de los compuestos SPO2, SPOB y SPOL sobre la expresión de los genes PPAR γ y CEBP α de preadipocitos 3T3-F442A. La expresión de los genes se analizó mediante RT-PCR de mRNA total obtenido de preadipocitos 3T3-F442A sometidos durante siete días a los tratamientos descritos. Se usó la expresión de GADPH como gen constitutivo.

Figuras

Figura 1.

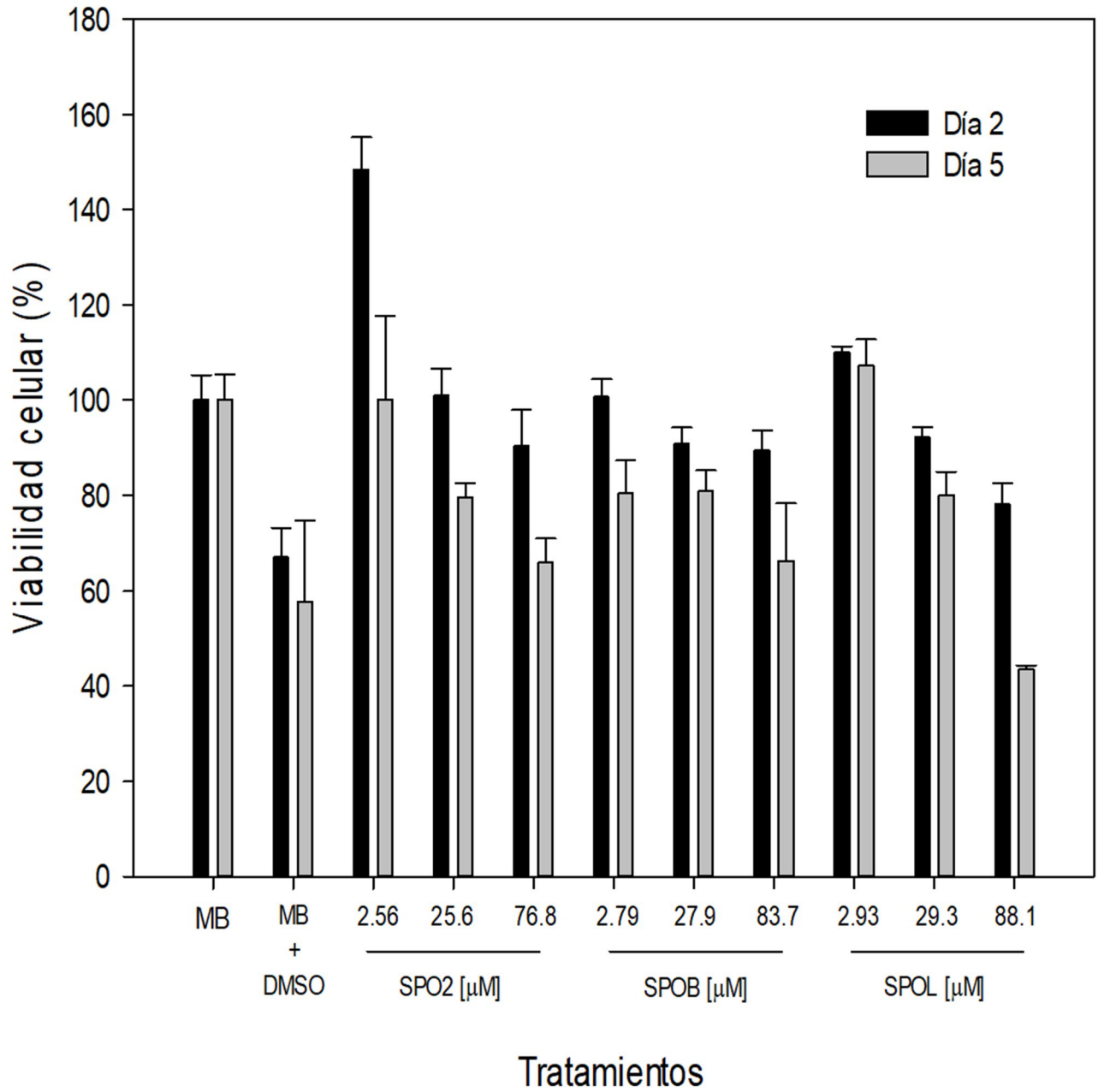


Figura 2.

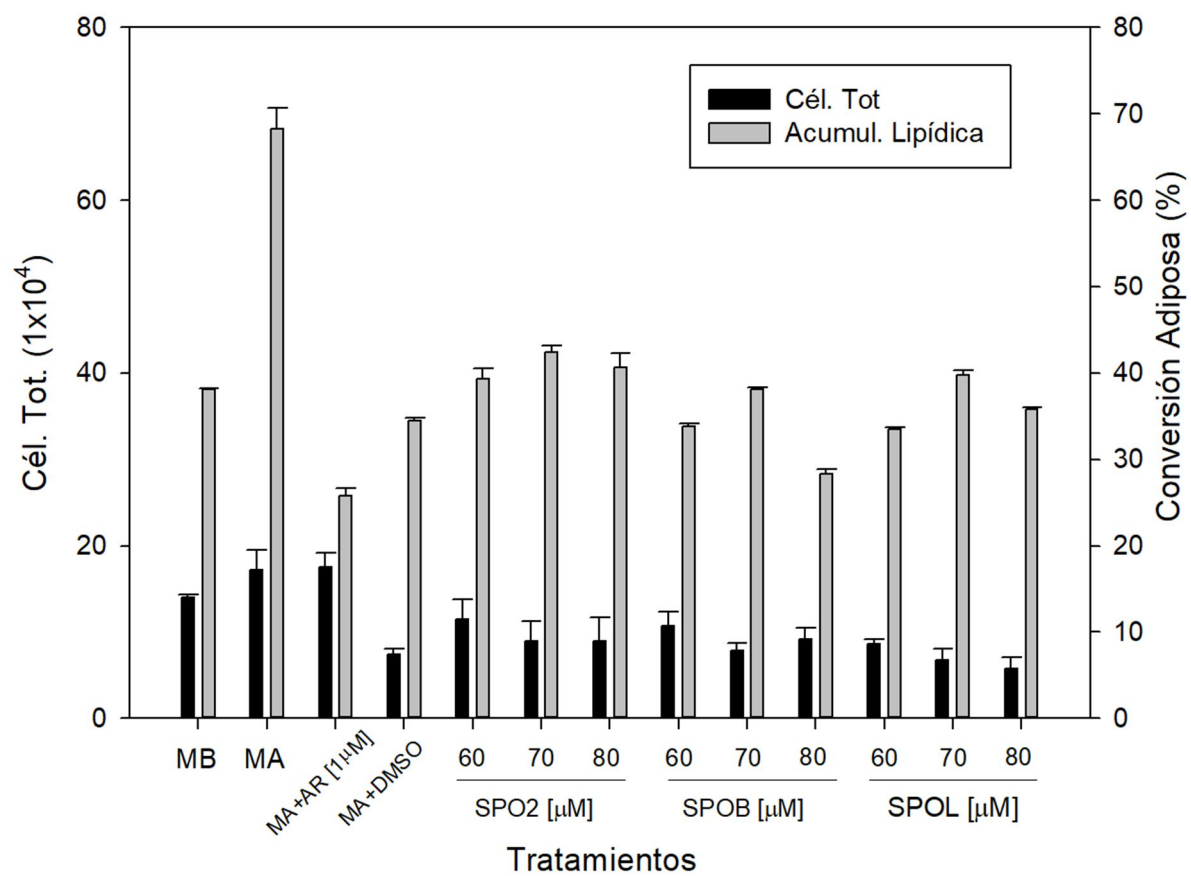


Figura 3.

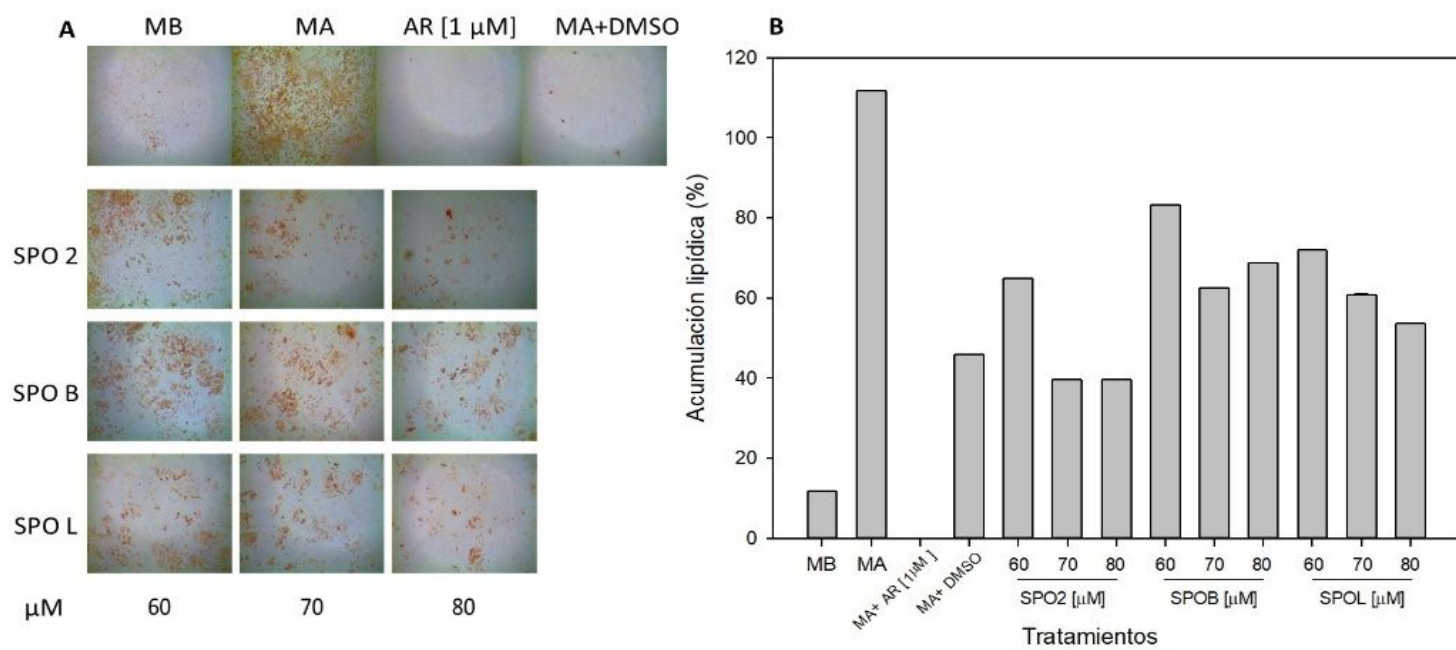


Figura 4.

