



# MÁSTERES de la UAM

Facultad de Ciencias /12-13

Máster en Química  
Agrícola y Nuevos  
Alimentos



**Caracterización  
molecular del mecanis-  
mo de acción de un  
extracto de raíz pulve-  
rizada de Taraxacum  
officinale (diente  
de león) durante la  
diferenciación en  
adipocitos 3T3-L1**  
*Raquel Fernández  
Dacosta*



## AGRADECIMIENTOS

El presente Proyecto Final del Máster de Química Agrícola y Nuevos Alimentos se ha desarrollado en el Instituto Madrileño de Estudios Avanzados en Alimentación (IMDEA Alimentación) bajo la supervisión de la Dra. Arantxa Rodriguez Casado.

En primer lugar quería darle encarecidamente las gracias a ella, la Dra. Rodriguez Casado, no sólo por darme la oportunidad de trabajar a su lado; sino también por demostrar constantemente un notable interés por mi aprendizaje y mi bienestar tanto durante mi periodo en el laboratorio como después de él. Le doy las gracias también por sus innumerables consejos, sobre todo por su esfuerzo en intentar trasmitirme calma y serenidad ante cualquier resultado, por inesperado que fuera. Creo que su perspectiva de las cosas en el mundo de la ciencia, me ayudará repetidas veces en el futuro a sobrellevar situaciones difíciles.

También quiero darle las gracias al Dr. Alberto Dávalos, porque a pesar de que su agenda no suele contar con un minuto libre en todo el día, siempre ha tenido tiempo para responder cualquiera de mis incesantes dudas y siempre sin borrar la sonrisa de su cara. Sinceramente, creo que no es consciente de toda la ayuda que me ha prestado en los últimos meses, la mitad de las cosas que he aprendido durante este proyecto no hubieran sido posibles sin su consejo. Asimismo, me gustaría agradecerle a su compañero de equipo, el Dr. Eduardo Iglesias, su contagioso buen humor, gracias al cual las largas horas de laboratorio se me han hecho mucho más amenas.

Gracias a D<sup>a</sup>. Belén García y en general a todo el equipo de IMDEA alimentación, por haber estado siempre dispuestos a resolver mis dudas sobre el laboratorio, incluso sabiendo que mi estancia en el mismo sería pasajera.

Especialmente me gustaría darle las gracias a mis padres, pues a pesar de como dicen ellos “no entender de estas cosas”, siempre han confiado en mi criterio y me han dejado tomar las riendas de mi vida. La ilusión de recompensarles algún día es la principal fuerza que me anima a seguir adelante.

A Jose Antonio, gracias por ser día a día hombro en el que llorar, ejemplo a seguir y compañero con el que crecer. Los pequeños logros tienen más sentido gracias a él.

*La realización de este trabajo ha sido posible gracias a la Consejería de Educación, Juventud y Deporte de la Comunidad de Madrid (CAM) y al Fondo Social Europeo (FSE).*

# ÍNDICE

	Página
<b>1.INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
1.1. Concepto de obesidad .....	1
1.2. Tipos de obesidad en función del IMC.....	1
1.3. Prevalencia de la obesidad.....	2
1.4. Causas de la obesidad.....	3
1.5. Desarrollo de la obesidad.....	4
1.5.A. El tejido adiposo.....	4
1.5.B. Adipogénesis.....	4
1.6. Modelo de adipogénesis <i>in vitro</i> . Células 3T3-L1.....	5
1.7. Consecuencias de la obesidad.....	6
1.8. Estrategias contra la obesidad.....	7
1.9. <i>Taraxacum Officinale</i> .....	8
<b>2.OBJETIVOS.....</b>	<b>10</b>
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>12</b>
3.1. Materiales.....	12
3.2. Obtención y preparación del extracto de raíz pulverizada (E3) de <i>Taraxacum officinale</i> .....	13
3.3. Evaluación de la actividad antioxidante del extracto de raíz pulverizada (E3) de <i>Taraxacum officinale</i> mediante el método DPPH.....	13
3.4. Adipogénesis <i>in vitro</i> de células 3T3-L1.....	14
3.4.A. Cultivo y propagación de las células 3T3-L1.....	14
3.4.B. Diferenciación <i>in vitro</i> de las células 3t3-L1.....	14
3.5. Cuantificación del contenido total de triglicéridos (TG) intracelulares.....	15
3.6. Extracción y análisis de ARN total.....	16

<b>3.7. Preparación de cADN mediante retrotranscripción.....</b>	<b>16</b>
<b>3.8. Análisis de microarrays previos y selección de genes a validar por PCR cuantitativa a tiempo real (RT-qPCR).....</b>	<b>17</b>
<b>3.9. Diseño de oligonucleótidos cebadores.....</b>	<b>18</b>
<b>3.10. Análisis de la expresión génica mediante RT- qPCR.....</b>	<b>19</b>
<b>3.11. Inmunodetección de proteínas mediante Western blot.....</b>	<b>21</b>
<u>3.11.A. Obtención de extractos proteicos totales de cultivos celulares.....</u>	<u>21</u>
<u>3.11.B. Cuantificación de los extractos proteicos.....</u>	<u>22</u>
<u>3.11.C. Western blot.....</u>	<u>22</u>
<b>3.12 Análisis de datos.....</b>	<b>23</b>
<b>4. RESULTADOS y DISCUSIÓN.....</b>	<b>24</b>
<b>4.1. Actividad antioxidante del extracto de raíz pulverizada (E3) de <i>Taraxacum officinale</i>.....</b>	<b>24</b>
<b>4.2. Efecto de extracto de raíz pulverizada (E3) de <i>Taraxacum officinale</i> en un modelo de diferenciación de preadipocitos 3T3-L1.....</b>	<b>25</b>
<u>4.2.A. Análisis cualitativo del efecto del extracto sobre la diferenciación.....</u>	<u>26</u>
<u>4.2.B Análisis cuantitativo del efecto del extracto sobre la diferenciación.....</u>	<u>28</u>
<b>4.3. Estudio de la influencia del extracto de <i>Taraxacum officinale</i> en la síntesis de proteínas durante la adipogénesis de células3T3-L1.....</b>	<b>29</b>
<u>4.3.A. Selección de genes a analizar por RT-qPCR.....</u>	<u>30</u>
<u>4.3.B. Medida de la expresión génica relativa mediante RT-qPCR.....</u>	<u>31</u>
<b>4.4. Estudio de la influencia del extracto de <i>Taraxacum officinale</i> en la síntesis de proteínas durante la adipogénesis de células 3T3-L1.....</b>	<b>37</b>
<b>5. CONCLUSIONES y OBJETIVOS FUTUROS.....</b>	<b>43</b>
<b>6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>45</b>



## 1. INTRODUCCIÓN

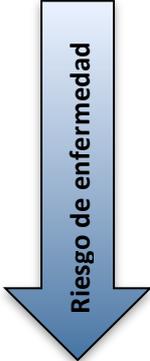
### 1.1. Concepto de obesidad

La Organización Mundial de la Salud (OMS/WHO) ha definido la obesidad como una acumulación anormal o excesiva de grasa que puede ser perjudicial para la salud (81). La prevalencia de la obesidad lleva años aumentando a un ritmo alarmante y se está convirtiendo en una de las principales preocupaciones para la salud pública con incalculables costes económicos y sociales a escala global (63). De hecho, tras el consumo de tabaco, la obesidad, consecuencia de la combinación de una dieta pobre y un estilo de vida sedentario; es considerada en la actualidad la segunda causa prevenible de mortandad en el mundo (52). Asimismo, la preocupación por esta enfermedad es aún mayor debido a que el estado de obesidad se asocia frecuentemente a otras patologías como diabetes, hipertensión, cáncer, desordenes metabólicos y/o enfermedades cardiovasculares (72). Se prevé incluso, que debido al incremento en la tasa de obesidad, la esperanza de vida media futura podría disminuir (58).

### 1.2. Tipos de obesidad en función del IMC

El índice de masa corporal (IMC), también denominado Índice de Quelet, es un indicador del estado nutricional del individuo recomendado por la OMS para clasificar de una forma sencilla los distintos grados de obesidad en adultos (82). Este índice se calcula dividiendo el peso de una persona en kilogramos entre el cuadrado de su talla en metros. Una persona con un IMC igual o superior a 30 es considerada obesa y con un IMC entre 25 y 30 es considerada como preobesa (Tabla 1).

Clasificación	IMC (kg/m <sup>2</sup> )
Intervalo Normal	18,5-24,9
Sobrepeso	≥ 25
Preobesidad	25,0-29,9
Obesidad tipo I	30,0-34,9
Obesidad tipo II	35,0-39,9
Obesidad tipo III	≥ 40,0

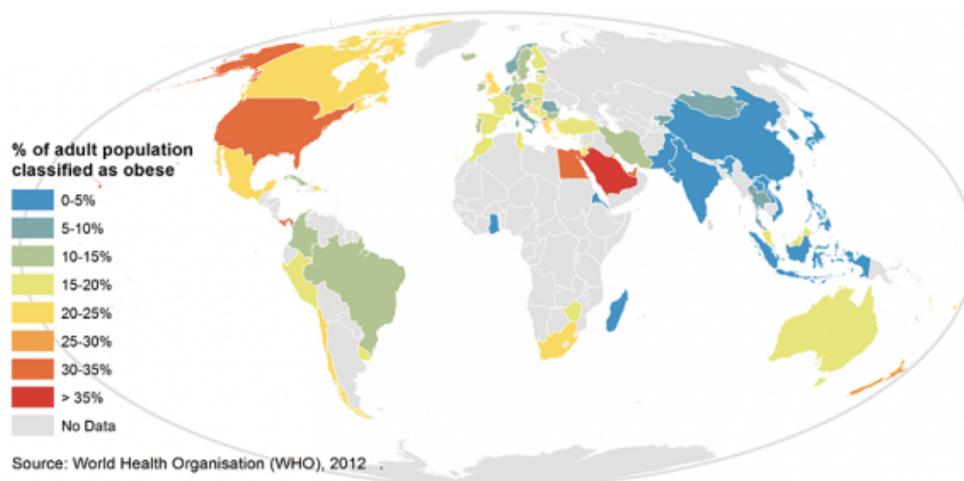


**Tabla 1.** Clasificación del exceso de peso en adultos según el IMC (82)

Además de como un indicador del grado de obesidad, el IMC fue diseñado como un indicador de riesgo de enfermedad y mortandad. A medida que el IMC aumenta, incrementa la adiposidad del organismo y por tanto el riesgo de padecer ciertas enfermedades asociadas a la obesidad como la diabetes e hipertensión, o la muerte prematura (80). Sin embargo, el IMC no diferencia los grados de adiposidad en función del sexo, edad, actividad física o distribución de la grasa corporal. Por este motivo, lo idóneo sería combinar el IMC con otros indicadores como el Índice de Cintura Cadera (ICC), que mide la distribución de grasa corporal. Esto es importante debido a que la adiposidad central u abdominal se ha vinculado a un mayor riesgo de sufrir enfermedades cardiovasculares y trastornos metabólicos que la adiposidad subcutánea (37).

### 1.3. Prevalencia de la obesidad

En el pasado asociada únicamente a los países más ricos, la obesidad es actualmente una enfermedad prevalente también en países con ingresos medios y bajos, siendo la distribución global de esta enfermedad muy desigual (Figura 1). Según el último informe de la OECD (Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos), desde 1980 se ha triplicado el número de personas que padecen sobrepeso u obesidad (69). Además, la OMS afirma que al menos 2.8 millones de personas mueren anualmente como resultado de un estado de sobrepeso u obesidad. Todo esto lleva a considerar la obesidad como una pandemia global con incalculables costes sociales y económicos (63).



**Figura 1.** Distribución global de personas con obesidad en 2012 (IMC  $\geq$  30) (81)).

Según el SOFA 2013 (El estado mundial de la agricultura y la alimentación, la principal publicación anual de la FAO), 1400 millones de adultos tienen sobrepeso en todo el mundo, de

los cuales 500 millones son obesos (17). Lo más alarmante además, es que actualmente hay más de 42 millones de menores de cinco años con sobrepeso en todo el mundo, los cuales tienen una alta probabilidad de convertirse en adultos obesos (81).

Concretamente en España, la tasa de obesidad en adultos es mayor que la media de la OECD. Dos de cada tres adultos padecen sobrepeso en España y uno de cada seis padece obesidad. En el caso de los niños españoles, uno de cada tres tienen sobrepeso, una de las tasas más elevadas a nivel mundial (57).

#### **1.4. Causas de la obesidad**

En términos simples, la obesidad es el resultado de un equilibrio energético positivo, lo que significa que la ingesta de energía en la dieta supera el gasto de la misma (8). El exceso de energía se almacena en las células grasas denominadas adipocitos, lo que produce su aumento en tamaño (hipertrofia) y/o en número (hiperplasia) (66). En realidad, la obesidad es una enfermedad crónica con una etiología multifactorial; pues este equilibrio energético positivo no depende únicamente de la cantidad de energía ingerida con la dieta, sino que es consecuencia de una compleja interacción entre factores genéticos, ambientales, psicológicos, sociales y culturales (59). La predisposición genética es un factor importante en el desarrollo de la obesidad según han demostrado estudios de segregación familiar, gemelos e individuos adoptados (6; 76). Además, la predisposición individual determinada genéticamente, puede estar más o menos favorecida por un entorno obesogénico en el que distintos factores socio-culturales contribuyen a su aparición (78).

Salvo el 5% de los casos en los que la obesidad surge por alteraciones de un único gen, en la mayoría de los individuos esta enfermedad tiene una base poligénica (67). No obstante, la herencia genética puede actuar de manera más o menos directa en el desarrollo de la obesidad. Por ejemplo, la genética podría determinar ciertos patrones epigenéticos (metilación o acetilación del ADN, la expresión de microARNs) más propensos a la obesidad (47) o incluso influir en la modulación del gasto energético y la actividad termogénica (61). Asimismo, de modo más indirecto, la herencia genética puede influir en la modulación de los gustos culinarios o el grado de interés por las actividades físicas. Sin embargo, a pesar de la tendencia genética a la obesidad, será la incidencia de muchos otros determinantes ambientales, sociales o culturales lo que determinará el grado de obesidad del individuo (59).

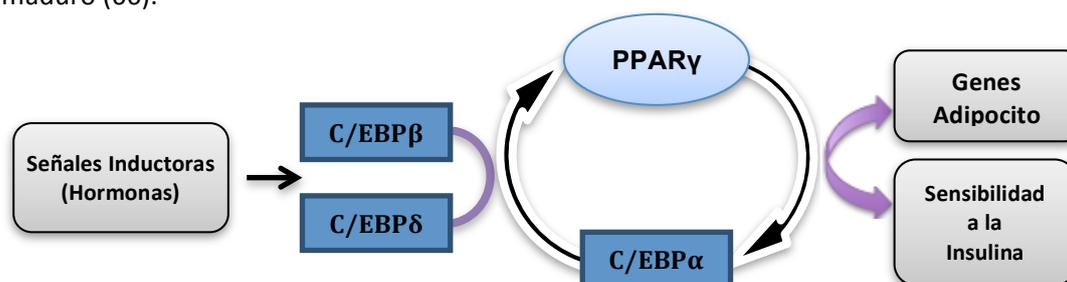
## 1.5. Desarrollo de la obesidad

### 1.5.A. El tejido adiposo

Como se ha indicado con anterioridad, la obesidad se ha definido como una acumulación excesiva del tejido adiposo como consecuencia de un balance energético positivo (81). En los mamíferos, el tejido adiposo está compuesto por 2 tipos muy distintos de grasas, como son el tejido adiposo blanco (TAB) y el tejido adiposo marrón (TAM); que presentan diferencias en cuanto a su morfología, distribución, genes y función (23). En el TAB, los adipocitos o células grasas tienen como principal función mantener la homeostasis de los lípidos y el balance energético mediante la acumulación de triglicéridos o la liberación de ácidos grasos en respuesta a las necesidades energéticas (84). Además, también actúa como un órgano endocrino que libera un gran número de hormonas y citoquinas que modulan el metabolismo del organismo y la resistencia a la insulina (65). Por el contrario, el TAM, abundante en recién nacidos y apenas existente en adultos, tiene un papel antagonista al TAB, ya que en lugar de almacenar la energía restante, la disipa mediante un proceso de termogénesis liberando calor (68).

### 1.5.B. Adipogénesis

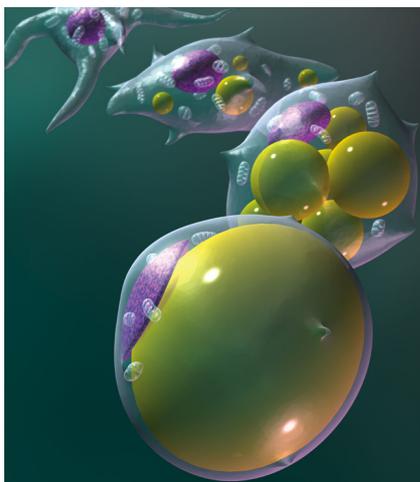
La adipogénesis es el proceso de diferenciación mediante el cual las células mesenquimales precursoras multipotenciales dan lugar a adipocitos maduros (11) (Figura 3). Este proceso, estrechamente relacionado con el desarrollo de la obesidad, consta de dos fases. Una fase temprana denominada determinación, en la que las células se transforman en preadipocitos comprometidos a diferenciarse en adipocitos; seguida de la verdadera etapa de diferenciación en la que el preadipocito adquiere la morfología y funciones del adipocito maduro (66).



**Figura 2.** Cascada reguladora de la adipogénesis. C/EBP $\beta$  y  $\delta$  activan la expresión de PPAR $\gamma$  en una etapa temprana de la diferenciación. Mediante unión por ligando, PPAR $\gamma$  induce la expresión de C/EBP $\alpha$  y de otros genes propios del adipocito. A través de una retroalimentación positiva, C/EBP $\alpha$  mantiene la expresión de PPAR $\gamma$ . C/EBP $\alpha$  y PPAR $\gamma$  promueven en conjunto la diferenciación del adipocito.

El proceso de adipogénesis se desarrolla a través de un programa coordinado de expresión génica mediado por factores de transcripción que dan lugar tanto a cambios en la actividad y cantidad de las proteínas propias del adipocito como a la inducción de la sensibilidad a la insulina manifestada frecuentemente en los casos de obesidad (11; 74). Entre los principales factores de transcripción involucrados en la cascada de señalización se encuentran el receptor gamma activado por el factor proliferador de peroxisomas (PPAR $\gamma$ ), con un papel principal en la activación del proceso de adipogénesis (74) y varios miembros de la familia de proteínas C/EBP ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$  y CHOP-10), los cuales poseen diferentes funciones al expresarse en momentos distintos durante la adipogénesis (10). La cascada de expresión génica (Figura 2) se inicia con la expresión temporal de C/EBP $\alpha$  y C/EBP $\beta$ , los cuales posteriormente se unen al promotor de PPAR $\gamma$  induciendo la expresión del mismo (16; 83). En una etapa más tardía de la adipogénesis, PPAR $\gamma$  induce la expresión de C/EBP $\alpha$ , siendo este último responsable de la expresión de muchos genes específicos del fenotipo maduro del adipocito y de su sensibilidad a la insulina (85). Además, C/EBP $\alpha$  es a su vez capaz de retroactivar la expresión de PPAR $\gamma$ , estableciendo un ciclo que asegura la presencia tanto de PPAR $\gamma$  como de C/EBP $\alpha$ ; los cuales promueven en conjunto la diferenciación (84).

### 1.6. Modelo de adipogénesis *in vitro*. Células 3T3-L1



**Figura 3.** Ilustración secuencial de la adipogénesis (33). Los preadipocitos acumulan triglicéridos (en verde) según van madurando.

Se han desarrollado diversos modelos celulares que permiten estudiar el proceso de diferenciación de preadipocitos a adipocitos *in vitro* (56) (Figura 3). El modelo celular de adipogénesis mejor caracterizado ha sido propuesto para la línea celular 3T3-L1, que presenta características muy similares a las de los adipocitos de tejidos animales (28). Estas células se cultivan hasta alcanzar la confluencia, momento en el que su crecimiento se inhibe por contacto (64). Es entonces cuando se induce la diferenciación añadiendo un coctel adipogénico de insulina, dexametasona e IBMX (isobutil-metil-xantina) en su medio de crecimiento. Esto lleva a las células a una etapa de expansión clonal que compromete a las células a la diferenciación y las induce a volver a entrar en el ciclo celular (56).

En concreto, la insulina permite la expansión clonal por la liberación del factor de transcripción E2F, factor fundamental en la regulación del ciclo celular (64). Además, las células modifican su morfología y se inicia la activación transcripcional de genes específicos del adipocito (24). Asimismo, la dexametasona es capaz de inducir la adipogénesis mediante la activación indirecta de los de C/EBP $\delta$  y PPAR $\gamma$  (83). Por otro lado, la IBMX permite también la inducción de la expresión de C/EBP $\beta$  y C/EBP $\delta$  y prostaglandina 12. Esta última además conduce a la activación de PPAR $\gamma$  (2). Los niveles de C/EBP $\beta$  y C/EBP $\delta$  se ven incrementados entonces en respuesta a la IBMX y la dexametasona, y ambos conducen a la activación de C/EBP $\alpha$  (86).

Conforme se produce el cese de la expansión clonal se activa la expresión de distintas enzimas implicadas en la lipogénesis de novo (24). Además, se produce un aumento de la sensibilidad a la insulina, un incremento de los receptores  $\beta$  adrenérgicos, la expresión de genes específicos de los adipocitos como la perilipina y la secreción de sustancias endocrinas y paracrinas (29).

### **1.7. Consecuencias de la obesidad**

La profunda preocupación internacional causada por la epidemia de obesidad se fundamenta en que esta patología esta a su vez estrechamente relacionada con el desarrollo de una larga lista de enfermedades de diversa índole (25). Uno de los riesgos más evidentes para las personas que padecen obesidad es el de sufrir lesiones osteoarticulares por la gran cantidad de peso que sostiene el cuerpo (38). Además, hasta hace pocos años se ha entendido el tejido adiposo como un simple almacén de energía, pero hoy en día se está destacando su papel como órgano endocrino capaz de regular importantes procesos metabólicos (72). Esto significa que un aumento del tamaño del tejido adiposo, supone una mayor liberación de algunas hormonas y un desequilibrio metabólico. Esto puede conducir a un estado de resistencia a la insulina y como consecuencia, a una diabetes de tipo 2 y otros trastornos asociados a la misma como arterioesclerosis o hipertensión (75).

Aparte, durante la obesidad los adipocitos pueden llegar sobrepasar su capacidad de almacenamiento sufriendo apoptosis y liberando ácidos grasos a la sangre, musculo, hígado y páncreas. Esta situación puede llegar a causar trastornos cardiovasculares debido a la situación de hiperlipidemia en la sangre (51). Asimismo, también se ha corroborado la relación entre la obesidad y el riesgo a padecer, accidente cerebrovascular (40), cirrosis, hepatitis (73) e incluso trastornos respiratorios crónicos como el asma (44). También se ha establecido una relación

de causalidad entre obesidad y cáncer de mama, endometrio, colon, riñón, próstata, vesícula biliar y esófago (9). Por último, cabe incidir en el daño psicológico de esta enfermedad. Estudios han demostrado que las personas con obesidad presentan una probabilidad mayor de sufrir ansiedad y depresión (14).

### **1.8. Estrategias contra la obesidad**

Los cambios en las hábitos alimenticios y la tendencia a estilos de vida más sedentarios han ido convirtiendo la obesidad en una epidemia de nivel mundial obligando a distintas instituciones, nacionales e internacionales, a desarrollar estrategias que frenen el crecimiento de esta pandemia. Así, en el año 2004 la OMS propuso una estrategia mundial de prevención de la obesidad; la cual se basaba fundamentalmente en la restricción calórica de la dieta y en la promoción de la frecuente actividad física (79). Asimismo, en el año 2005 el gobierno Español lanza un concepto muy similar denominado Estrategia para la Nutrición, Actividad Física y Prevención de la Obesidad (NAOS). No obstante, estas estrategias preventivas basadas en la modificación del estilo de vida, solo han conseguido reducir ligeramente la tasa de crecimiento de la obesidad en algunos países; pero no han logrado pararla ni revertirla (69; 57).

Ante la ineficacia de estas estrategias, se han lanzado al mercado fármacos con un efecto antiobesidad más directo como el Orlistat o la Sibutramina (32; 40). Estos fármacos se basan en la inhibición de la absorción de grasas o en la reducción del apetito. No obstante, la imagen negativa de los fármacos y sus efectos secundarios, han llevado en los últimos años a una tendencia creciente en el consumo de productos naturales para el tratamiento de la obesidad (25; 22). Así, la capacidad de diversos fitoquímicos procedentes de especies muy distintas de plantas para ejercer efectos positivos sobre el metabolismo y la bioquímica animal, está siendo investigada por numerosos equipos científicos en todo el mundo (25). Su finalidad es establecer una base científica para el empleo de estos fitoquímicos como ingredientes bioactivos de alimentos funcionales o para comercializarlos como nutracéuticos capaces de prevenir o curar distintos tipos de enfermedades (13). En el caso de la lucha contra la obesidad, los fitoquímicos que destacan son las saponinas, los flavonoides y los alcaloides presentes a elevadas concentraciones en distintos tipos de plantas; pues han demostrado efectos tales como el aumento del gasto energético, la disminución del apetito y de la absorción intestinal de grasa o incluso la inhibición de la adipogénesis (87).

### 1.9. *Taraxacum Officinale*

*Taraxacum officinale* Weber, también conocida popularmente como diente de león, es una planta comestible perteneciente a la familia de las asteráceas (26). Tradicionalmente se la conoce como una planta medicinal asociada a propiedades coleréticas, antiinflamatorias, antirreumáticas y diuréticas (5). Se suele localizar al borde de los caminos, baldíos o pastos secos. Aunque su hábitat se extiende por todo el hemisferio norte, es de origen europeo, posiblemente de Grecia (24).



**Figura 3.** Litografía de *Taraxacum officinale*.  
Autor anonimo, dominio público .

Es una planta perenne de hasta unos 40 cm de altura y posee una larga raíz primaria. Las hojas verdes, distribuidas de forma alterna, son dentadas.

Las flores amarillas nacen de entre las hojas, formando cabezuelas, las que al terminar la floración, se convierten en unas esferas blancas y plumosas, las cuales se desprenden con mucha facilidad al soplarlas (20).

Debido fundamentalmente a la ausencia de alcaloides y toxinas, esta planta presenta una toxicidad muy baja (70). Se trata por tanto de una planta comestible en su totalidad con un sabor ligeramente amargo. Es altamente nutritiva, con mayor contenido en fibra, proteínas y variedad en vitaminas y minerales que otras especies con los mismos usos culinarios como la lechuga o las espinacas (26). Diversos estudios han demostrado que el diente de león es una rica fuente de vitaminas A, C, D, E y B (43), y de minerales entre los que destaca la abundancia de potasio (39).

El diente de león contiene una gran variedad de fitoquímicos con potenciales propiedades saludables. Los compuestos bioactivos más abundantes en esta planta son las lactonas sesquiterpénicas, las cuales aportan el característico sabor amargo y se han asociado con efectos anticancerígenos y antiinflamatorios (70). Además, el diente de león contiene fenilpropanoides, terpenoides e inulina responsables de su capacidad inmunomoduladora (70; 71). Asimismo, los polisacáridos presentes en la planta se han asociado con actividades

hematoprotectivas, antitumorales y preventiva de agregación plaquetaria (70). Cabe destacar que la composición de fitoquímicos varía en función de la parte de la planta (hojas, raíces, flores), su variedad y la estación de recolección (26).

En los últimos años, se han demostrado científicamente muchas de las propiedades farmacológicas que la sabiduría popular atribuía ya en el pasado al diente de león (24); lo cual abre el camino para el empleo de extractos procedente de esta especie como tratamiento frente a un gran abanico de enfermedades (Tabla 2).

<b>Diente de león</b>	<b>Actividad farmacológica</b>	<b>Enfermedades Relacionas</b>
	Hipoglucémica	Diabetes
	Antioxidante	Enfermedades cardiovasculares
	Antiinflamatoria	
	Hipolipidémica	Arterioesclerosis
	Diurética	Obesidad
	Anticancerígena	Cáncer

**Tabla 2:** Principales actividades farmacológicas de *Taraxacum officinale* y enfermedades asociadas (24)

## 2. OBJETIVOS

El diente de león (*Taraxacum officinale* Weber) es una planta comestible que ha demostrado contener distintos fitoquímicos con actividades farmacológicas útiles en el tratamiento y la prevención de varias patologías (26). En concreto, se ha demostrado que extractos del diente de león podrían contribuir a prevenir la obesidad y los desórdenes metabólicos (88).

Bajo esta perspectiva se planteó el proyecto general FITOGEN en los laboratorios de IMDEA Alimentación por el grupo de la Dra. Rodríguez Casado, en el cual se engloba esta tesis de fin de máster (TFM). El proyecto FITOGEN tiene como finalidad última el desarrollo, apoyándose en estudios moleculares contrastados, de un ingrediente funcional derivado del diente de león que sea eficaz en la lucha contra la obesidad. Este ingrediente funcional se empleará como agente preventivo y/o como agente para un tratamiento complementario de apoyo a los métodos farmacológicos y los estilos de vida saludables que permita combatir la obesidad.

En estudios preliminares *in vitro* del proyecto FITOGEN se demostró un efecto inhibitorio ejercido por diferentes extractos procedentes de *Taraxacum officinale* (de hojas y de raíz), sobre la adipogénesis y la acumulación de lípidos en un modelo celular de la línea 3T3-L1 (24). Asimismo, los resultados de los análisis de expresión génica diferencial tras el tratamiento con extractos de diente de león realizados mediante microarrays de genoma completo de ratón indicaron que el tratamiento de las células con los extractos modifica la expresión de numerosos genes implicados en el metabolismo de lipídico, algunos de ellos claves en procesos de diferenciación y maduración de adipocitos (24). Además, algunos de los genes más relevantes para este estudio fueron seleccionados y validados por qRT-PCR, lo que permitió comprobar que los extractos impactan sobre algunas rutas metabólicas asociadas con obesidad y enfermedades metabólicas (24). No obstante, las bases moleculares y el mecanismo a través del cual estos extractos impactan sobre la expresión de estos genes están aún por determinar.

Así, el objetivo principal de esta tesis es la justificación de los resultados obtenidos *in vitro* por el extracto de diente de león más eficaz estudiado con anterioridad, el extracto de raíz pulverizada (E3). De esta forma, se tratará de aportar evidencias de los efectos de este extracto natural *in vitro* en línea celular de ratón 3T3-L1 y de iniciar la caracterización de sus mecanismo de acción mediante una aproximación genómica.

Para ello el plan de trabajo llevado a cabo durante esta tesis ha constado de las siguientes etapas:

1. Preparación del extracto natural E3 a partir de raíz pulverizada de *Taraxacum officinale* para evaluar sus efectos biológicos.
2. Evaluación de la actividad antioxidante del extracto de raíz pulverizada de *Taraxacum officinale* (E3).
3. Desarrollo del proceso de diferenciación (adipogénesis) en la línea celular modelo 3T3-L1 (con y sin aplicación del tratamiento con el extracto E3 durante el proceso).
4. Análisis del contenido total de triglicéridos intracelulares tras diferenciación de preadipocitos 3T3-L1 en presencia de extracto de raíz pulverizada E3 de diente de león.
5. Preparación del material biológico para realizar las PCRs cuantitativas a tiempo real (RT-qPCRs): extracción de RNA, síntesis de cADN (reacción de retrotranscripción).
6. Re-análisis de los microarrays de genoma completo de ratón ya realizados y selección de los genes más significativos que se sobre/infra expresen en beneficio de los objetivos; es decir, en rutas de obesidad (diferenciación, metabolismo lipídico, adipocito, colesterol y triglicéridos).
7. Análisis mediante RT-PCR de la influencia del extracto de raíz pulverizada E3 en la expresión génica durante la diferenciación de preadipocitos 3T3-L1.
8. Inmunodetección de proteínas mediante Western blot para correlacionar la variación observada en la expresión de ciertos genes en presencia del extracto de raíz pulverizada E3 con cambios en los niveles de expresión de las proteínas correspondientes a esos genes.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. Materiales

Las cápsulas comerciales de raíz pulverizada de diente de león empleadas son de la marca Arkopharma® (Cedex, Francia). Los fibroblastos prediferenciados en adipocitos de la línea 3T3-L1 (Catalog No. CL-173TM) se obtuvieron de la American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA). El medio de cultivo DMEM (Dulbecco modified Eagle's medium), el buffer salino de fosfato (PBS), el suero bovino fetal (FBS), la glutamina, el mix de antibióticos-antimicóticos y los anticuerpos secundarios Alexa Fluor anti-ratón 680 y Alexa Fluor anti-conejo 680 fueron suministrados por Invitrogen™ (Carlsbad, CA, USA). Los anticuerpos primarios correspondientes a Sik2, Pparγ e Hist1h4c se obtuvieron de Cell Signaling Technology® (Danvers, MA, USA) y el anticuerpo primario de Mapkap1 se adquirió de Bethyl Laboratories, Inc. (Montgomery, TX, USA). La Insulina, la dexametasona (Dex), la 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX), la solución buffer de ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinethanosulfónico (HEPES), el radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil), los estándares de proteínas (Bovine Serum Albumin - BSA), el Triglyceride Determination Kit y la solución estándar de glicerol e isopropanol fueron adquiridas a la empresa Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Se utilizó el kit DC™ Protein Assay y la leche de bloqueo 5% Blotting-Grade Blocker milk de Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, USA), así como la solución al 4% de paraformaldehído en PBS de Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, CA, USA). Otros químicos como HCl, NaOH, hexano y etanol fueron suministrados por Scharlab (Barcelona, España). El kit RNA Rneasy Mini Kit y las columnas QIAshredder fueron adquiridos a Qiagen (Alemania). El kit de transcripción inversa PrimeScript™ RT Reagent Kit utilizado fue el de Takara Bio (Japón). El cocktail de inhibición de proteínas y el 4-(2-aminoetil)-benceno sulfonilo fluoruro clorhidrato (AEBSF) empleados para el buffer de lisis son de Roche (Basilea, Suiza). Las placas multipocillo de 6 pocillos y las placas tipo Petri-dish de 60 mm de diámetro son de la marca Falcon Biosciences (San José, CA, USA). El kit de PCR a tiempo real VeriQuest™ SYBR® Green qPCR Master Mix es de Affymetrix (Santa Clara, CA, USA) y los oligonucleótidos cebadores prediseñados de Isogen (España). Por último, las placas de 384 pocillos para PCR a tiempo real y el film protector de Applied Biosystems (Carlsbad, CA, USA.).

### 3.2. Obtención y preparación del extracto de raíz pulverizada (E3) de *Taraxacum officinale*

Para la preparación del extracto E3 se compraron cápsulas comerciales de raíz pulverizada de *Taraxacum officinale* de Arkopharma® (Cedex, Francia). El contenido de las cápsulas, polvo de raíz, se disolvió en agua Milli-Q a una concentración de 25 mg/mL. La disolución resultante se filtró a través de un filtro de 0.45 µm y se conservó a -20 °C hasta su utilización.

### 3.3. Evaluación de la actividad antioxidante del extracto de raíz pulverizada (E3) de *Taraxacum officinale* mediante el método DPPH

El método DPPH es un ensayo colorimétrico basado en la pérdida progresiva del color púrpura del radical libre DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) que se produce cuando este radical reacciona con donadores de hidrógeno que lo reducen formando un producto incoloro (7; 24).

El procedimiento comenzó con la elaboración de una recta de calibrado de DPPH mediante la preparación de una serie de diluciones seriadas de DPPH en etanol (40; 20; 10; 5; 2.5 µg/mL) a partir del stock de DPPH (15 mM). Posteriormente se preparó una solución de trabajo DPPH 200 µM y se mezclaron 200 µl de esta solución con 50 µl de disoluciones en etanol del extracto de diente de león a distintas concentraciones (25; 12.5; 6.25; 3.125; 0 mg/ml). Se colocaron las distintas muestras en una placa de 96 pocillos y tras 15 minutos de incubación en la oscuridad se midió la absorbancia a 517 nm en el espectrofotómetro UV/Vis para placas (UVM 340 Monochromator Based, Asys, Biochrom).

A partir de la recta de calibrado elaborada se calculó la concentración de DPPH de las muestras. Después, empleando como control la solución de DPPH en ausencia de extracto, se calculó el % de DPPH remanente para cada muestra mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ DPPH remanente} = \frac{[\text{DPPH}]_{\text{muestra}}}{[\text{DPPH}]_{\text{control}}} \times 100$$

Con el % de DPPH remanente para cada concentración del extracto se obtuvo la ecuación de la recta del gráfico % DPPH remanente vs. concentración de extracto, a partir de la cual se calculó la concentración efectiva media (EC<sub>50</sub>). La EC<sub>50</sub> se empleó para determinar la actividad

antioxidante de las muestras y se define como la concentración de extracto necesaria para reducir la absorbancia del radical DPPH en un 50%.

### **3.4. Adipogénesis *in vitro* de células 3T3-L1**

El protocolo descrito de diferenciación de la línea celular 3T3-L1 se basa en la acción conjunta de distintas hormonas adipogénicas como insulina, dexametasona e 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX) (11).

#### 3.4.1. Cultivo y propagación de las células 3T3-L1

La evaluación de la actividad biológica *in vitro* del extracto de raíz pulverizada de *Taraxacum officinale*, se llevó a cabo mediante el modelo experimental de células 3T3-L1, una línea celular de preadipocitos de ratón comprometida a diferenciarse en adipocitos (28).

Previamente a la inducción de la diferenciación, los preadipocitos 3T3-L1 se cultivaron a 37 °C en placas Petri de 60 mm de diámetro en un medio de proliferación (MP) constituido por una mezcla de DMEM suplementado con 10% (v/v) FBS, HEPES 25 mM, 1% glutamina (v/v) y 1% (v/v) de mix de antibióticos. Cuando el cultivo alcanzó una confluencia del 60-80%, entre tres y cuatro días después de la siembra inicial, las células se desprendieron con una solución de Tripsina-EDTA al 0.25%. Se hizo un recuento celular en la cámara Neubauer y se sembraron placas multipocillos (6 pocillos) con 23000 células en cada pocillo en el medio de proliferación MP. Estos preadipocitos 3T3-L1 proliferaron en la cámara incubadora (Incubador Heracell, Control Técnica) a 37 °C y 5% de CO<sub>2</sub>.

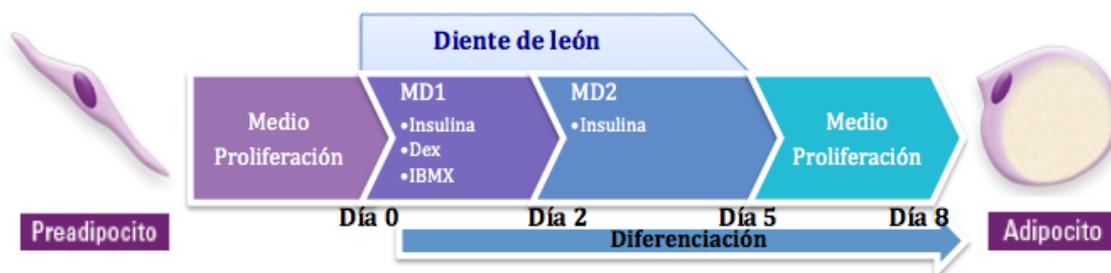
#### 3.4.2. Diferenciación *in vitro* de las células 3T3-L1

Cuando los preadipocitos 3T3-L1 alcanzaron una confluencia del 60-70% (día 0), se procedió a cambiar el MP por un medio de cultivo adecuado para cada caso:

- Control negativo (células no diferenciadas): Las células de tres pocillos se trataron con MP al que se le añadió 1 µl/ml de HCl 10 mM (presente en la disolución de insulina) y 2.5 µl/ml de NaOH 200x (presente en la disolución de IBMX).

- Control positivo (células diferenciadas): Las células de otros tres pocillos se trataron con medio de diferenciación 1 (MD1), compuesto por MP suplementado con insulina 5 mg/ml, dexometasona 0.25  $\mu$ M y 5  $\mu$ l de IBMX 0.5 mM.
- Células tratadas con extracto: las células de seis pocillos se trataron con MD1 al que se le añadió el extracto E3 a la concentración correspondiente (400  $\mu$ g/ml y 600  $\mu$ g/ml o 200  $\mu$ g/ml).

El día 2 se siguieron los mismos pasos que el día 0 pero añadiendo medio de diferenciación 2 (MD2) a las células correspondientes al control positivo y a las tratadas con el extracto. El MD2 se preparó suplementando el MP solo con insulina 5 mg/ml. A las células correspondientes al control negativo solo se le añade el MP con 1  $\mu$ l/ml de HCl 10 mM. Las células se mantienen en el MD2 durante tres días y el día 5 el MD2 se sustituyó en todos los pocillos por MP. A partir del día siguiente (día 6) las diferencias morfológicas entre los controles positivo y negativo, ya evidentes, se comprobaban mediante la observación al microscopio óptico (Microscopio óptico invertido JMF-CKX41, Olympus) considerando a las células diferenciadas adipocitos maduros. Normalmente el material celular para realizar los distintos ensayos se recogía el día 8 tras el inicio de la diferenciación.



**Figura 4.** Secuencia del tratamiento con el extracto E3 de diente de león durante la diferenciación de preadipocitos 3T3-L1 en adipocitos maduros.

### 3.5. Cuantificación del contenido total de triglicéridos (TG) intracelulares

Los preadipocitos 3T3-L1 se recolectaron ocho días después del inicio de la diferenciación. Se lavaron las células dos veces con PBS y la extracción del contenido lipídico se realizó con 1 ml de hexano en cada pocillo durante 24 horas a 4 °C. Al día siguiente, la mezcla se traspasó a viales de vidrio y se empleó un evaporador de nitrógeno (12 position N-EVAP, SStI wáter bath, 0-10 LPM gas flow meter, 1 doz Stainless Steel needle, Symta) a 37 °C para eliminar el hexano. Los lípidos extraídos se resuspendieron en 50  $\mu$ l de isopropanol y se llevó a cabo la cuantificación del contenido celular total de triglicéridos (TG) mediante el uso de un kit

comercial (Triglyceride Determination Kit) de acuerdo con las instrucciones del proveedor. Este kit se basa en un método de hidrólisis enzimática de los TG extraídos con lipoproteína lipasa (LPL), de modo que el glicerol liberado se determina por colorimetría a una longitud de onda de 540 nm empleando un espectrómetro UV/Vis para placas (*UVM 340 Monochromator Based*, Asys, Biochrom). El contenido celular total de TG se normaliza con el contenido celular de proteínas por lo que se determinó el contenido total de proteínas mediante un procedimiento colorimétrico basado en el método de cuantificación de Lowry (kit DC TM Protein Assay de Biorad) y una recta de calibrado empleando diluciones seriadas de BSA. El contenido de TG intracelulares totales, se expresa como mg TG/mg proteínas.

### **3.6. Extracción y análisis de ARN total**

Una vez finalizado el proceso de diferenciación, unos ocho días después de su inicio, se llevó a cabo la extracción del ARN total; tanto de las células correspondientes a los controles (negativo y positivo), como de las células tratadas con el extracto E3. Previamente a la extracción de ARN, se lavaron las células dos veces con PBS. Después, para lograr la rotura celular y liberar el contenido intracelular se añadió un volumen de 350  $\mu$ L del tampón de lisis (RLT) y se levantaron las células mediante raspado. La mezcla resultante se pasó por columnas tipo filtro QIAshredder, que actúan como disruptor celular mejorando la liberación del ARN. Tras este paso se continuó con la extracción de ARN utilizando el kit comercial RNeasy Mini, siguiendo para cada muestra el protocolo establecido por el fabricante.

Una vez realizada la extracción, se evaluó la calidad y cantidad del ARN obtenido. Para ello, la absorbancia de las muestras fue medida en un espectrofotómetro (NanoDrop 2000, Thermo Scientific) a las longitudes de onda de 260 y 280 nm. Se comprobó la ausencia de proteínas contaminantes en las muestras cuando el ratio de absorbancia 260/280 se hallaba comprendido entre 1.8 y 2.1.

### **3.7. Preparación de cADN mediante retrotranscripción (RT)**

Con el fin de realizar el análisis diferencial de la expresión génica entre las células tratadas y las células control mediante PCR a tiempo real (RT-PCR) fue necesario sintetizar cADN de cada una de estas muestras. Para ello, las muestras de ARN extraídas previamente, se sometieron a una reacción de retrotranscripción (RT) empleando el Kit de transcripción inversa PrimeScript<sup>TM</sup> RT Reagent. Esta reacción permite la amplificación del cADN utilizando como cebadores una

mezcla de random primers, que amplifican todos los ARNs de la muestra; y oligo(dT) primers, los cuales se unen a la cola poliA del ARN y permiten su conversión en cADN. En primer lugar se preparó el master mix de los componentes que intervienen en la reacción siguiendo el protocolo facilitado por la casa comercial del kit (Tabla 3). Después, se mezcló por separado el ARN de las distintas muestras con el master mix y se introdujeron las muestras en el Termociclador (PCR 2720 Thermal cycler, Applied Biosystems). La reacción de retrotranscripción se lleva a cabo siguiendo el programa de temperaturas establecido en el protocolo (Tabla 4) obteniéndose a su fin el cADN.

Componente	Volumen (μL)
5X PrimeScript Buffer	4
PrimeScript RT Enzyme Mix	1
Random primers (100 μM)	1
Oligo dT primers (50 μM)	1
ARN (1 μg)	13

**Tabla 3.** Componentes y volúmenes empleados en la reacción de retrotranscripción (PrimeScript™ RT Reagent Kit de Takara) (24)

Tiempo (min)	Tª (°C)
15	37
5	85
∞	4

**Tabla 4.** Programa de tiempos y temperaturas empleado en la reacción de retrotranscripción (PrimeScript™ RT Reagent Kit de Takara) (24)

### 3.8. Análisis de microarrays previos y selección de genes a validar por PCR cuantitativa a tiempo real (RT-qPCR)

Los resultados de los análisis de expresión génica realizados mediante microarrays de genoma completo de ratón indicaron que el tratamiento de las células con el extracto E3 de diente de león modifica la expresión de numerosos genes implicados en el metabolismo de lipídico, siendo algunos de ellos claves en procesos de diferenciación y maduración de adipocitos (24). Solamente algunos de los genes más relevantes para este estudio fueron previamente seleccionados y validados por qRT-PCR en el laboratorio (24). Otros genes, cuya expresión se ve modificada por el extracto E3 según los microarrays, no habían sido validados y son objeto de estudio en este trabajo. Con el objetivo de comprender las bases moleculares y el mecanismo a través del cual el extracto E3 impacta sobre la expresión de estos genes, se analizaron de nuevo los resultados de los mencionados microarrays para una nueva selección de genes a validar por RT-qPCR, dentro de la cual se incluyeron genes ya validados y otros no. La vinculación de los genes, cuya expresión se ve alterada, a las rutas biológicas en las que

están implicados y a sus principales funciones biológicas, se llevó a cabo utilizando la base de datos GeneCoDis3 (12; 24). El resultado de este análisis indicó que todos los genes seleccionados, o bien presentan funciones relacionadas con el metabolismo lipídico y la adipogénesis, y/o según los resultados de los microarrays (24), modifican su expresión genética -hacia arriba o hacia abajo- al menos dos veces ( $p$ -valor  $\leq 0.05$ ) en presencia del extracto E3.

### 3.9. Diseño de oligonucleótidos cebadores

La validación por qPCR de los genes seleccionados requiere el empleo de primers específicos para cada uno de estos genes. A diferencia de los cebadores correspondientes a los genes ya analizados, los primers de los genes que no habían sido analizados previamente no estaban disponibles en el laboratorio y tuvieron que ser diseñados.

Gen	Primer sentido (fw)	Tm [°C]	Primer antisentido (rev)	Tm [°C]	$\Delta T_m$ fw-rev	Amplicón (pb)
Sez6	CTTCTATCACATCGTCCCTTCC	60.6	GGTCTTAGACATGACCTCTGGA	60.3	0.3	165
Myo1f	CTTCTACTGGCAGAGTCACAA	57.9	ATGAAGCGTTTGCGGAGGTT	57.3	0.6	108
Gpr31c	CCACCAGTCTGCATTCTTTG	59.8	ACTGTCTCAGGAAGGCTACT	59.8	0	133
Helz	GCAACGAGTAATGTCCTGTCTG	60.3	TACACTGGGCACCGTACCTAC	61.8	1.5	166
Tmem211	CATTCGCCATTGTTGGGGAC	59.4	GGATGCACTTCTGTCAAGCT	59.4	0.4	107
Crtam	CCTTTTCATCATCGTTTCACTCT	58.9	GGAGCCTGGCTGCTATTCTC	61.4	2.5	156
Cacna1d	AGAGGACCATGCGAACGAG	58.8	CCTTCACCAGAAATAGGGAGTCT	60.6	1.8	63
Olfr692	GTCCAATTCTACCTTCCAACACC	60.6	CATGAGCCCAAACACTAGGGA	59.8	0.8	100
Gm15104	GTTTCAGATGTAATGCCGCC	59.4	AGGATGACGGAGAGACTGCT	59.4	0	95
Mapkap1	GAGACGCAGGGCTACATATACG	62.1	GCGGAGTCGTTCTAATCTTTGA	58.4	3.7	105
Hist1h4c	TCTGGACGTGGTAAGGGTGGT	61.8	TCACGGAGAACCTTACGGTGG	61.8	0	71
Fbxw20	AAGACAGGTCGGTCATCTGTA	57.9	CCCAGGTCATAATGCCCTCAC	61.8	3.9	81
Olfr1510	AAGAGTCCCTTTGACGGAGC	59.4	CACTGGCTACTTCTCTCCACC	61.8	2.4	156
1700125G2 2Rik	ACTCCGTAACAGCCAGTTC	59.8	GGTTTTCGGTGCTTGGTACT	59.4	0.4	84
A930006D0 1Rik	GTAAAACCTGCACCACTTCG	59.8	AAAGCCTTACGGTTCGAGG	59.4	0.4	119
Cnksr2	TCTCCGAGTCAAGTAGTGGAC	59.8	CCTGATGTGTAATGCGTAGCAG	60.3	0.5	118
Psg-ps1	TGAGGTCTCCAACCCAGTCA	59.4	CAATGGTGGCTGTACCTGAGT	59.8	0.4	179
Trp53bp1	TGTTACCCAAAACCTCAGGCA	57.9	CTCTGCTGCGAAACAGGAGAA	59.8	1.9	105
Slurp1	GTGAGGCCCTCCGATGCTAT	59.5	ACTGTGGTTGAAGGGGAACG	59.4	0.1	140
4831440D2 2Rik	ATCTACGCTCCCTCTGACT	59.4	TGGCGACGTCTCGTTGAAAT	57.3	2.1	162
Slco1a1	GGGGATGACTCGTTACAGTT	59.8	GCCTTCTGTGTTGCAACCTT	57.9	1.9	148

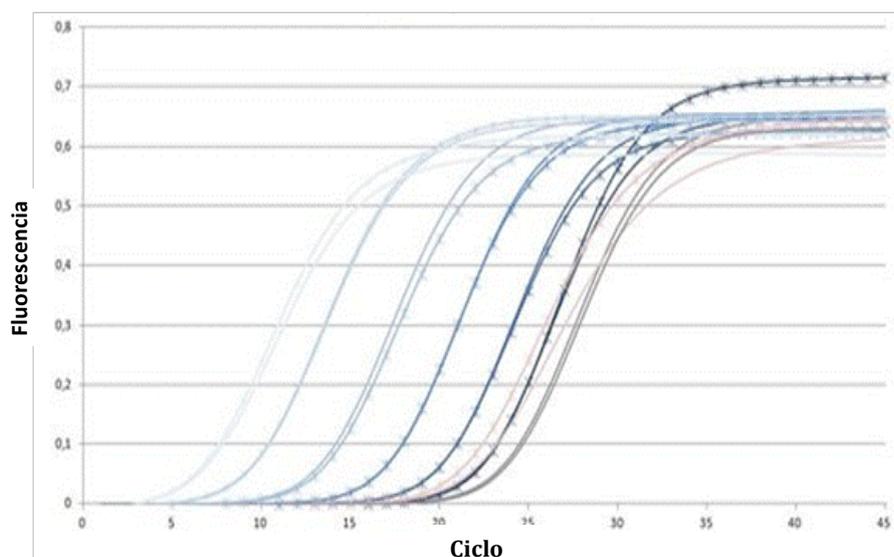
**Tabla 5.** Primers diseñados para el análisis por RT-qPCR de los genes no validados con anterioridad.

Para ello, primero se hizo un rastreo de las combinaciones de cebadores potencialmente apropiadas para cada gen, empleando dos bases de datos públicas diferentes: la base de datos de primers para PCR o RT-qPCR *PrimerBank-MGH-PGA* (30) y la base de datos de artículos científicos *Pubmed* (55). Posteriormente, se comprobó la idoneidad de los primers seleccionados y el diseño de los primers no localizados, empleando la herramienta de diseño de cebadores (*Primer designing tool*) del NCBI (54). De este modo, para cada gen (Tabla 5) se seleccionaron los pares de cebadores (sentido/Fw y antisentido/Rev) que cumplían los siguientes requisitos:

- El tamaño del amplicón se encontraba entre 60 y 200 pares de bases (bp).
- Presentaban una temperatura de anillamiento próxima a 60 °C.
- Diferencias de temperatura entre cebadores, sentido y antisentido, menor que 4 °C.

### 3.10. Análisis de la expresión génica mediante RT-qPCR

Una vez sintetizado el cADN de las muestras (ver punto 3.5) se procedió al análisis de la expresión génica mediante RT-qPCR. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real permite cuantificar el cADN a la vez que éste se amplifica. Esto es posible gracias los agentes intercalantes, fluorocromos cuya emisión de fluorescencia aumenta al unirse a una doble cadena de ADN hibridada, lo que permite la cuantificación del ADN sintetizado tras cada ciclo de PCR. De este modo, mediante la comparación de medidas de fluorescencia emitidas en la fase exponencial (Figura 5), se permite la cuantificación relativa de la expresión génica entre muestras.



**Figura 5.** Ejemplo de curva de amplificación de RT-qPCR. Se observa como la fluorescencia va aumentando en cada ciclo en función de la concentración inicial de cADN.

En este análisis se empleó SYBR® Green como agente intercalante, el cual viene incluido en el kit VeriQuest™ SYBR® Green qPCR Mater Mix (que también incluye VeriQuest Taq ADN polimerasa, MgCl<sub>2</sub>, nucleótidos, Uracil-ADN glicosilasa (UDG) y ROX™).

La cuantificación relativa de la expresión génica requiere de dos controles, uno endógeno y otro exógeno. Como control exógeno se emplearon las muestras correspondientes a las células diferenciadas (no tratadas con E3) 3T3-L1 (control negativo). Como controles endógenos se emplearon dos genes housekeeping diferentes (Rn18s, RNA ribosomal18S y Rplp0, ribosomal protein large P0), cuya expresión se mantiene relativamente constante en las condiciones de trabajo, lo cual permite la corrección de variaciones de expresión relacionadas con diferencias en la cantidad de cADN total de las muestras.

El master mix para la reacción de PCR se preparó siguiendo las instrucciones del fabricante (Tabla 6) con ligeras modificaciones.

Componente/pocillo	Volumen (µL)
<i>VeriQuest SYBR Green qPCR Master Mix (2x)</i>	5
<b>Primers (Fw+Rev)(10 µM)</b>	2
<b>cADN (10ng/ µL)</b>	3

**Tabla 6.** Componentes y volúmenes añadidos a cada pocillo de la placa de 384 pocillos para RT-qPCR (VeriQuest™ SYBR® Green qPCR de Affymetrix)

A continuación se cargaron las muestras (cADN de control negativo, positivo y muestras tratadas con 600 y 200 o 400 µg/ml de E3) en una placa de 384 pocillos para RT-qPCR y se cubrió la placa con film protector. Una vez centrifugada la placa, ésta se introdujo en el termociclador a tiempo real (9700 dual flat blk GeneAmp® PCR System, Applied Biosystems) y se inició el programa de amplificación (Tabla 7).

	Tratamiento UDG (Opcional)	Activación Taq pol	Amplificación PCR (40 ciclos)			Curva Alineamiento (prod. Inespecif)		
			Desnaturalización	Alineamiento	Elongación			
T <sup>a</sup>	50°C	95°C	95°C	60°C	72°C	95°C	60°C	95°C
T	2´	10´	15 s	30 s	45 s	15	15	15

**Tabla 7.** Programa de RT-qPCR empleado con el *Software SDS v2.4*, Applied Biosystems

Finalizada la reacción, se procedió al análisis de los datos y al cálculo de la expresión génica relativa (RQ) mediante la siguiente fórmula (48):

$$RQ = 2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{[(Ct_{gen} - Ct_{endógeno})_{tratamiento} - (Ct_{gen} - Ct_{endógeno})_{control}]}$$

Donde Ct (ciclo umbral), es el ciclo de la PCR en el cual la fluorescencia supera el umbral marcado en la región exponencial de la gráfica de amplificación, que determina un nivel de fluorescencia significativamente superior a la fluorescencia basal.

### 3.11. Inmunodetección de proteínas mediante Western blot

#### 3.11.A. Obtención de extractos proteicos totales de cultivos celulares

Finalmente, se comprobó si los cambios observados en la expresión de los genes analizados en los experimentos de RT-qPCR podrían ser correlacionados con cambios proporcionales en la síntesis de las proteínas codificadas por esos mismos genes. Para ello, se llevaron a cabo experimentos de inmunodetección Western blot, una técnica analítica que permite la detección de proteínas específicas dentro de una muestra compleja mediante el uso de anticuerpos específicos contra las proteínas de interés.

Los preadipocitos 3T3-L1 se recolectaron ocho días después del inicio de la diferenciación y se procedió a la preparación de las muestras para la inmunodetección. En primer lugar, las células se lavaron dos veces con PBS y después se añadió a cada pocillo 350  $\mu$ l de buffer de lisis frío (Tris·HCl pH 7.5, 50 mM, NaCl 125 mM, Nonidet P-40 1%, NaF 5.3 mM, NaP 1.5 mM, ortovanadato 1 mM, octil- $\beta$ -D- glucopiranosido 175 mg/mL, coctel inhibidor de proteínas 1 mg/mL y AEBSF 0.25 mg/mL). Las células se despegaron de cada pocillo raspando la superficie de los mismos con la ayuda de un raspador estéril de plástico. Una vez despegadas, las células se transfieren a tubos Eppendorf conservados en hielo donde se mantienen en agitación a 4 °C durante 1 hora. Transcurrido este tiempo los lisados celulares se centrifugaron a 12000  $\times$  g durante 10 min a 4 °C para eliminar restos celulares. Los sobrenadantes, los lisados celulares, se guardan a -80 °C hasta el momento de su uso.

### 3.11.B. Cuantificación de los extractos proteicos

La concentración de proteína en las muestras se determinó usando el kit RC-DC Protein Assay (Bio-Rad), un procedimiento colorimétrico basado en el método de cuantificación de Lowry. Este método colorimétrico es compatible con la presencia de detergentes y agentes reductores, y consiste en la determinación de cambios de absorbancia causados por la reacción de las proteínas con varios reactivos que forman un complejo coloreado con las mismas.

Tras la cuantificación de la proteína, es necesario normalizar las distintas muestras de proteínas, para lo cual, se separó el volumen de cada sobrenadante, lisado celular, conteniendo la cantidad de 40 µg de proteína por muestra para cargar en el gel. A este volumen, se añadió la cantidad de 30 µl de buffer de carga Laemmli (5% β-mercaptoetanol, glicerol 50%, SDS 10 %, azul de bromofenol 0.4%, Tris HCl, pH 6.8) (45). Previamente a la carga de las muestras en el gel, éstas se hierven durante 5 minutos a 90 °C para desnaturalizar totalmente las proteínas, y se centrifugan para cargar en el gel de poliacrilamida.

### 3.11.C. Western blot

La electroforesis se realizó en geles de poliacrilamida desnaturalizantes (SDS –PAGE). El gel de poliacrilamida se preparó siguiendo las instrucciones suministradas por el proveedor del equipo de electroforesis (Bio-Rad Tetra Blotting Module) (3).

El gel de poliacrilamida se cargó con las muestras y se llevó a cabo el fraccionamiento de las proteínas en función de su peso molecular siguiendo un protocolo estándar (19). Tras la electroforesis, las proteínas separadas de los geles fueron transferidas a membranas sólida de nitrocelulosa con un tamaño de poro de 0.45 µm siguiendo las instrucciones del proveedor del equipo de blotting (Bio-Rad Tetra Blotting Module) (4).

Terminada la transferencia de las proteínas a la membrana, ésta se extrajo del equipo y se bloqueó mediante su incubación en suero de leche desnatada al 5% en TBST (Tris·HCl 10 mM, pH 8, NaCl 150 mM, Tween-20 AL 0.51%) durante una hora a 37 °C. Transcurrido este tiempo, se lavó de nuevo la membrana con TBST durante 10 minutos y se incubó durante toda la noche con el anticuerpo primario correspondiente a la proteína que se deseaba detectar en cada caso (Mapkap, Sik2, Hist1h4c o Pparγ) y con el anticuerpo primario

correspondiente a Hsp90 o a Actina (estándar), siendo estas últimas proteínas empleadas como controles de carga. Las diluciones empleadas fueron 1:1000 para los anticuerpos primarios correspondientes a Sik2, Ppar $\gamma$  e Hist1hc (Cell Signaling Technology); y 1:2000 para el anticuerpo primario correspondiente a Mapkap1 (Bethyl BLaboratories, Inc). Tras aproximadamente 12 horas, se lavó la membrana con TBST tres veces durante 10 minutos manteniéndola en agitación. La membrana, así tratada, se incubó, para la posterior detección de las bandas, esta vez con los anticuerpos secundarios marcados Alexa Fluor anti-ratón 680 o Alexa Fluor anti-conejo 680 (dil. 1:5000) (Invitrogen), durante 1 hora a temperatura ambiente. Finalmente, el blot se lavó tres veces más con TBST y las bandas de reacción se detectaron por fluorescencia con el sistema de imagen Odyssey Infrared Imaging System (LI-COR Biosciences) utilizando el software del proveedor para el análisis densitométrico.

### **3.12. Análisis de datos**

Los experimentos se realizaron por triplicado y se llevaron a cabo al menos tres experimentos independientes para cada determinación. Los valores se expresan como medias de los tres experimentos  $\pm$  la desviación estándar de la media (DEM). El análisis estadístico se llevó a cabo utilizando el programa informático GraphPad Prism 6.0 para Mac OS X. Se realizó la prueba Anova de dos factores para la determinación de las diferencias significativas entre grupos, considerándose significativos los valores de p-valor  $< 0.05$  (\*).

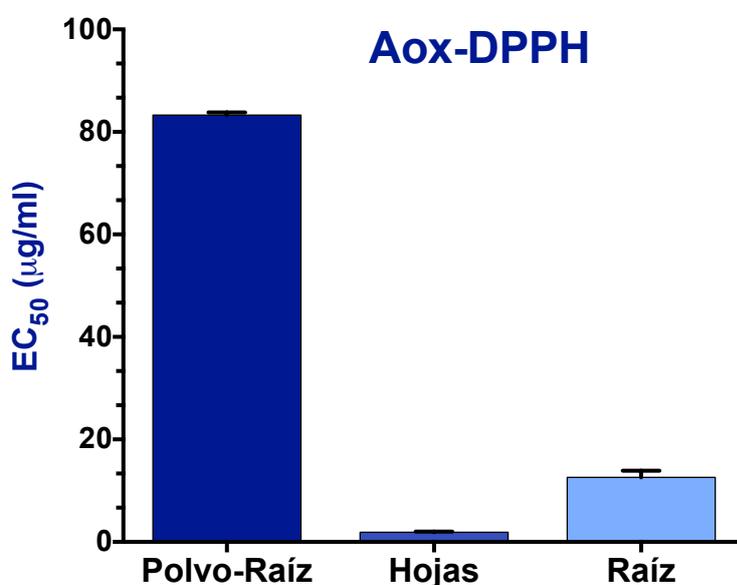
## 4. RESULTADOS y DISCUSIÓN

### 4.1. Actividad antioxidante del extracto de raíz pulverizada (E3) de *Taraxacum officinale*

La posible contribución de mecanismos antioxidantes al efecto inhibitor del extracto E3 sobre la adipogénesis en preadipocitos 3T3-L1, fue evaluada determinando la actividad antioxidante del extracto. El resultado de la medida de la actividad antioxidante obtenido mediante el método DPPH (7) fue el siguiente:

$$\text{Aox E3: EC}_{50} = 83,23 \pm 0,39 \mu\text{g/ml}$$

El resultado indica que el extracto E3 presenta valores de actividad antioxidante relativamente bajos si utilizamos como referencia compuestos altamente antioxidantes como la catequina o la quercetina ( $\text{EC}_{50}$ :  $1.94 \pm 3.2$  y  $1.0 \pm 0.9$   $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente) (60), lo cual confirma los experimentos previos realizados en el laboratorio (24). Asimismo, se confirma que la actividad antioxidante de E3 es menor que la obtenida para otros extractos de diente de león estudiados previamente (24), de 40 veces menor con respecto a un extracto de hojas y 8 veces menor con respecto a otro extracto de raíz (24) (Figura 6).



**Figura 6.** Comparativa entre el  $\text{EC}_{50}$  del extracto de raíz pulverizada (Polvo-Raíz) de *Taraxacum officinale* (E3) empleado en este estudio y el  $\text{EC}_{50}$  de extractos de raíz y de hojas de la misma planta empleados en estudios previos (24). Se observa como el extracto E3 presenta una actividad antioxidante menor a las de los otros dos extractos.

Una de las razones de esta menor actividad antioxidante del extracto E3 puede ser su composición. De hecho, este extracto presenta un contenido en compuestos fenólicos y flavonoides mucho menor que el extracto con mayor actividad antioxidante, el extracto de hojas (24); lo cual podría explicar, en parte, su baja capacidad antioxidante. Aparte de un menor contenido de compuestos fenólicos y flavonoides, el extracto E3 se diferencia de los otros dos extractos comparados por presentar una composición fitoquímica más compleja puesto que se trabaja con la raíz entera. Esto sugiere la presencia de componentes hidrosolubles no identificados en el análisis de su composición (24) que podrían disminuir su capacidad antioxidante.

El interés por los posibles efectos beneficiosos de los antioxidantes viene justificado por la existencia de algunos estudios que defienden la influencia del efecto antioxidante en la inhibición de la adipogénesis (34). Se ha relacionado la capacidad que tienen ciertos antioxidantes de dispersar del núcleo el factor de transcripción C/EBP $\beta$ , perteneciente a la cascada de activación de la adipogénesis, con la consecuente inhibición de la misma (41). Además, también se han realizado estudios que relacionan la acumulación de grasa en obesos con el estado antioxidante (35).

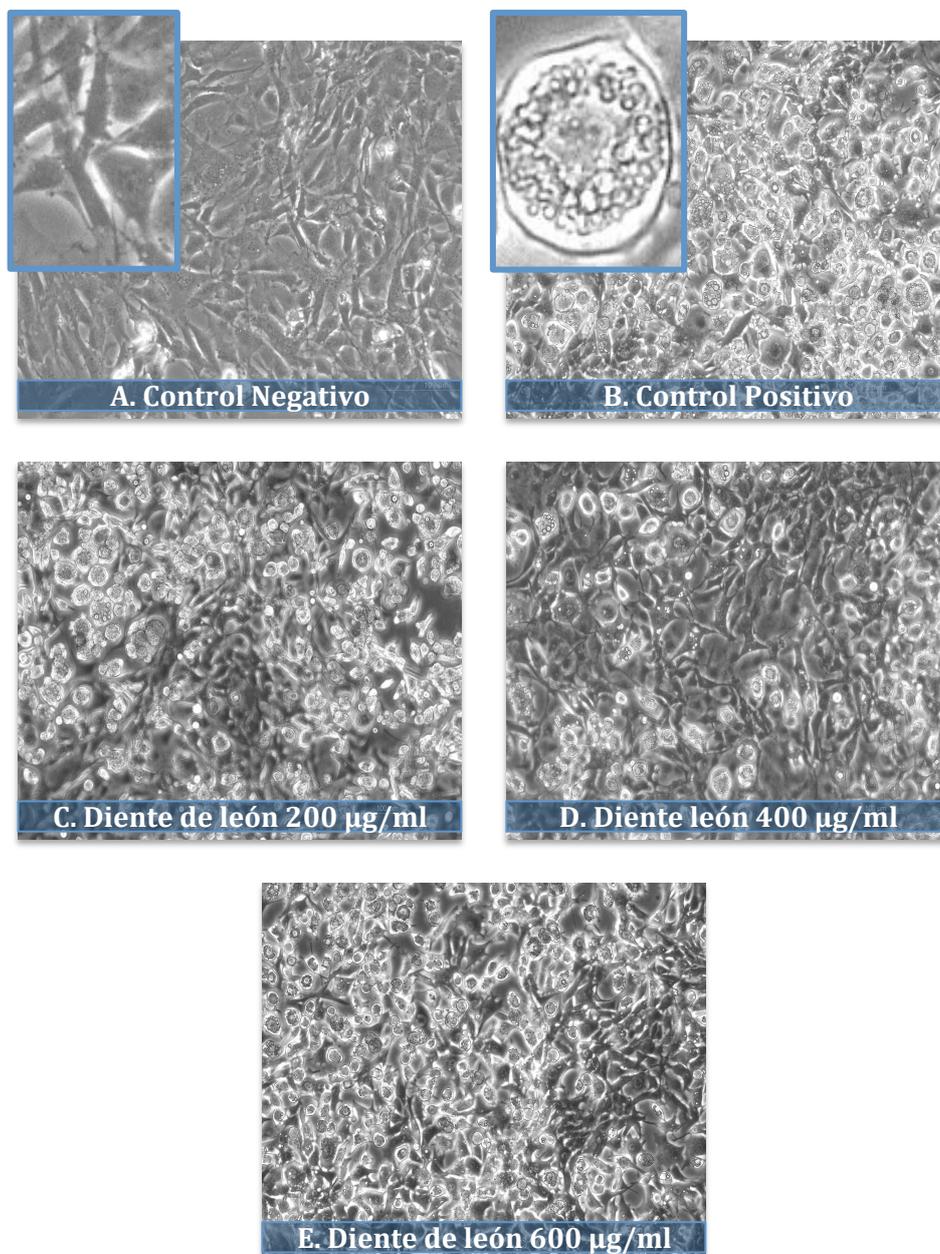
Sin embargo, a pesar de su baja actividad antioxidante, en este estudio se ha demostrado que este extracto tiene una significativa actividad inhibidora de la adipogénesis, tal y como se demuestra en el siguiente apartado. Por tanto, los mecanismos antioxidantes no parecen contribuir a la inhibición de la adipogénesis en preadipocitos 3T3-L1 tratados con el extracto E3.

#### **4.2. Efecto de extracto de raíz pulverizada (E3) de *Taraxacum officinale* en un modelo de diferenciación de preadipocitos 3T3-L1**

Con la finalidad de comprobar la posible actividad anti-obesidad del extracto E3, se analizó el efecto del mismo a distintas concentraciones durante el proceso de diferenciación de preadipocitos 3T3-L1. La eficiente diferenciación se indujo mediante un coctel adipogénico de insulina, dexametasona e IBMX. Ocho días tras el inicio de la diferenciación, el efecto del extracto E3 se determinó tanto cualitativamente (punto 4.2.A) como cuantitativamente (punto 4.2.B).

#### 4.2.A. Análisis cualitativo del efecto del extracto sobre la diferenciación

En una primera aproximación, el efecto producido por el extracto E3 sobre la diferenciación de los preadipocitos 3T3-L1, se evaluó observando las diferencias visuales al microscopio óptico entre los cultivos de preadipocitos no diferenciados (control negativo) y los cultivos diferenciados tanto en ausencia (control positivo) como en presencia del extracto a diferentes concentraciones (Figura 7).



**Figura 7.** Efecto visuales del extracto E3 de *Taraxacum officinale* (diente de león) sobre la diferenciación de preadipocitos 3T3-L1.

Mediante esta observación al microscopio (Figura 7), lo primero que se aprecia son grandes diferencias entre la morfología del control negativo y la del control positivo, lo cual indica el correcto desarrollo del proceso de diferenciación. Así, se confirma que en el control negativo los preadipocitos no se han diferenciado, pues estos siguen teniendo la forma alargada y fusiforme tan característica de los fibroblastos. Además, se ve claramente que las células del control positivo han experimentado un proceso de adipogénesis óptimo, evolucionando hacia una forma redondeada y voluminosa debida a la acumulación de lípidos en su interior. Mirando detalladamente se pueden incluso distinguir las abundantes vacuolas lipídicas presentes en el interior de estos adipocitos maduros (ver detalle aumentado Figura 7B).

Por otro lado, en las imágenes de los preadipocitos tratados con el extracto se ve una situación intermedia entre lo observado en el control positivo y el negativo. Efectivamente, ha tenido lugar en los cultivos tratados con extracto E3 el proceso de diferenciación, pues se observan agrupaciones de adipocitos maduros. Sin embargo, se siguen apreciando pequeñas zonas en las que las células mantienen aún la morfología alargada del fibroblasto. Además, tanto el número de adipocitos maduros como su tamaño, parece ser menor en estos cultivos tratados que en el caso del control positivo, lo cual sugiere una importante actividad inhibitoria de la adipogénesis en presencia del extracto de diente de león.

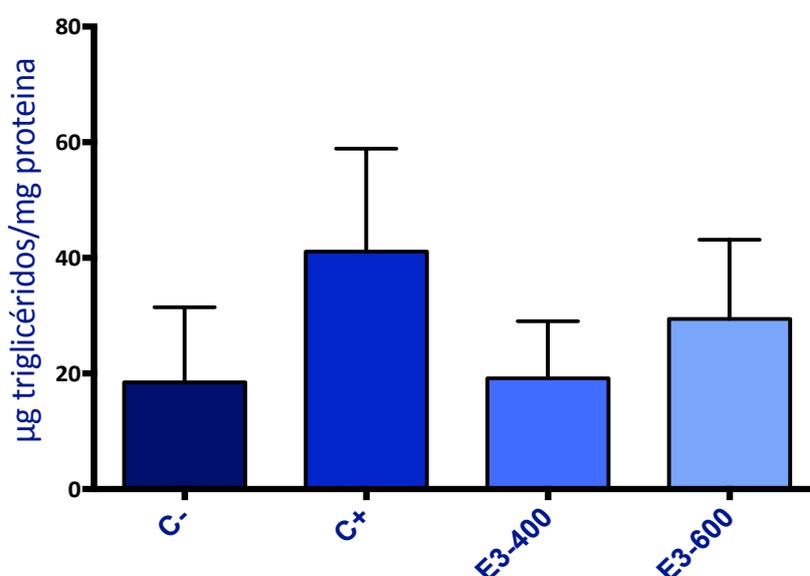
Comparando las imágenes de los cultivos tratados con diferentes concentraciones de extracto, se aprecia que el tratamiento a concentración intermedia (400  $\mu\text{g/ml}$ ) (Figura 7D) parece tener una actividad inhibitoria de la adipogénesis ligeramente mayor que el tratamiento de menor concentración (200  $\mu\text{g/ml}$ ) (Figura 7C). No obstante, el tratamiento de mayor concentración (600  $\mu\text{g/ml}$ ) (Figura 7E) parece tener un efecto igual o incluso menor en la inhibición de la adipogénesis que el tratamiento intermedio (400  $\mu\text{g/ml}$ ). Así, podemos decir que en los cultivos tratados no se observa de forma clara una mayor inhibición de la diferenciación a medida que aumenta la concentración del extracto. Es decir, según revelan los resultados a las concentraciones estudiadas, el efecto del extracto E3 de diente de león sobre el grado de inhibición de la adipogénesis no funciona de un modo dependiente de la dosis.

#### 4.2.B. Análisis cuantitativo del efecto del extracto sobre la diferenciación. Determinación del contenido intracelular de triglicéridos tras diferenciación de preadipocitos 3T3-L1 en presencia del extracto E3 de *Taraxacum officinale*

De un modo cuantitativo, el análisis efecto del extracto E3 sobre la adipogénesis de células 3T3-L1 se llevó a cabo mediante la medida del contenido de triglicéridos (TG) total dentro de las células.

Durante la adipogénesis, gran cantidad de TG se acumulan en gotas lipídicas que ocupan más del 90% del citoplasma del adipocito (18). De hecho, aparte del aumento en el número de adipocitos a través del proceso de adipogénesis, el incremento de tamaño de los adipocitos individuales debido a la acumulación lipídica dentro de ellos, es otro de los factores que condicionan el desarrollo de la obesidad (18). Por tanto, la medida del contenido de TG podría darnos una idea sobre el impacto del extracto E3 sobre el tamaño de los adipocitos, y por tanto como un potencial agente antiobesidad.

Los resultados obtenidos muestran que, como se esperaba, el contenido de TG intracelulares aumenta con la diferenciación (Figura 8). Es más, en estos experimentos el contenido de TG se duplica en las células diferenciadas (control positivo) con respecto a las no diferenciadas (control negativo).



**Figura 8.** Efecto del extracto E3 sobre el contenido intracelular de triglicéridos durante la diferenciación de preadipocitos 3T3-L1. El control negativo (C-) corresponde a células sin diferenciación y el control positivo (C+) a células diferenciadas pero no tratadas con E3. Durante la diferenciación, se trataron preadipocitos con dos concentraciones diferentes de E3, 400 µg/ml (E3-400) y 600 µg/ml (E3-600).

Los niveles de TG totales se midieron en las células 3T3-L1 diferenciadas tratadas con dos concentraciones distintas de extracto E3 (400 y 600 µg/ml). La concentración de extracto más baja (400 µg/ml) redujo considerablemente el contenido de TG en los adipocitos con respecto a las células diferenciadas sin extracto; llegando incluso a reducir los TG a niveles similares a los presentes en las células no diferenciadas. Sin embargo, en concordancia a lo observado en el estudio cualitativo, los resultados no indican una relación dosis-dependiente del extracto; pues, una mayor concentración de extracto (600 µg/ml) no supuso mayor disminución en los niveles de TG intracelulares medidos. Este menor efecto del extracto a altas concentraciones podría deberse a un intento de compensación por parte de las células. Es decir, cuando los efectos inhibitorios de la adipogénesis son muy acusados por elevadas concentraciones del extracto, se activan mecanismos alternativos que conducen al desarrollo de la adipogénesis y por tanto a la acumulación de TG intracelulares a través de rutas diferentes. Así, en respuesta al cóctel de inducción de la adipogénesis, conseguirían llevar adelante la adipogénesis en menor medida a pesar de un parcial bloqueo de este mecanismo por parte del extracto de diente de león.

En conjunto, tanto los resultados del análisis cualitativo como los del análisis cuantitativo indican un potencial efecto antiobesidad del extracto E3 de diente de león. No obstante, aparentemente el efecto inhibitorio de la adipogénesis de este extracto parece saturarse a altas concentraciones del mismo, indicando que la concentración óptima del tratamiento se encontraría próxima a los 400 µg/ml.

#### **4.3. Estudio de la influencia del extracto de *Taraxacum officinale* en la expresión génica durante la adipogénesis de células 3T3-L1**

Hasta este punto se han mostrado los resultados del análisis del efecto funcional del extracto de raíz pulverizada (E3) de diente de león sobre el fenotipo de las células 3T3-L1 durante su proceso de diferenciación. Estos resultados indican una disminución tanto del contenido lipídico como del grado de diferenciación en las células tratadas con el extracto E3. Ahora bien, con el objetivo de estudiar el mecanismo molecular responsable de estos efectos, se realizó un análisis de la influencia del extracto E3 en la expresión génica durante este proceso.

#### 4.3.A. Selección de genes a analizar por RT-qPCR

En primer lugar, para la realización de los estudios genéticos se llevó a cabo una selección de los genes cuya expresión fuera más vulnerable en presencia del extracto durante la diferenciación. En total se eligieron 30 genes, cada uno de los cuales cumplía al menos una de las siguientes condiciones:

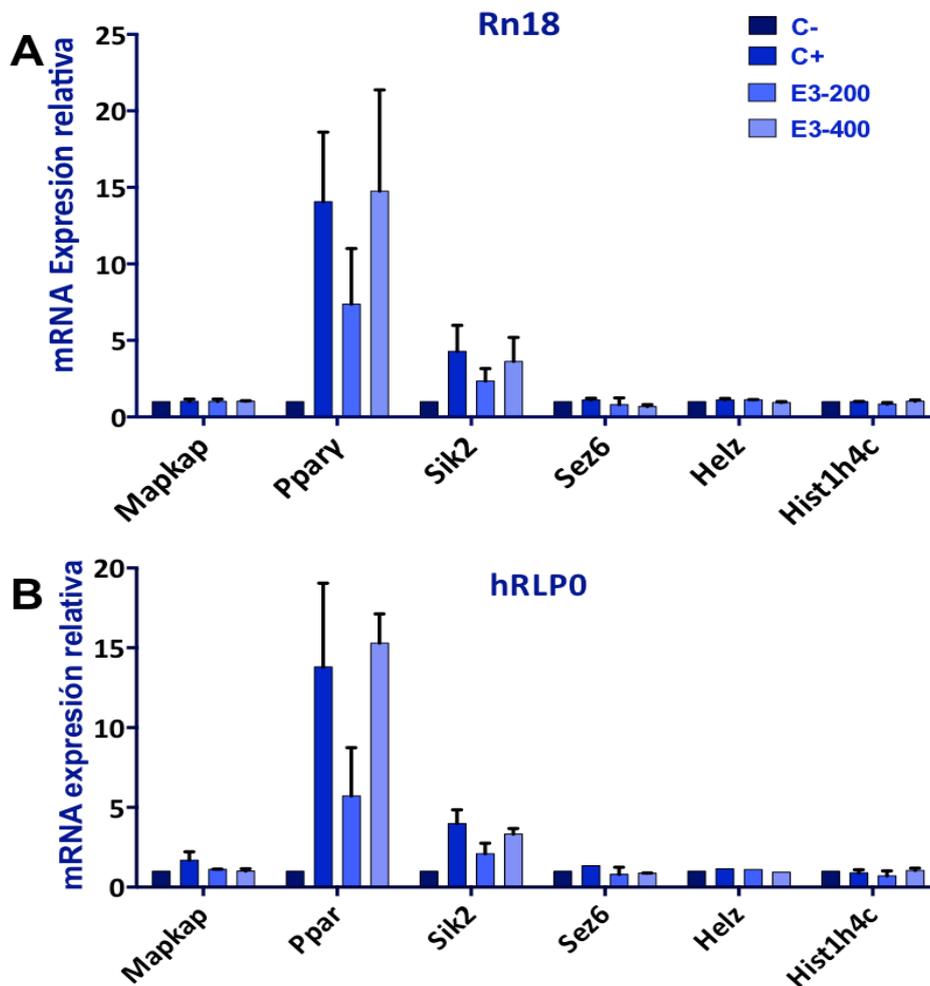
- Genes relevantes relacionados con el metabolismo lipídico y la adipogénesis. Genes que funcionan como marcadores del proceso de diferenciación y cuya posible variación con el extracto sería de gran interés (Tabla 8) (24).
- Genes cuya expresión génica se modificó significativamente (al menos dos veces hacia arriba o hacia abajo y con  $p$ -valor  $\leq 0.05$ ) en presencia del extracto E3 según los resultados de los microarrays previos (27) ya que son potenciales modificadores indirectos del proceso de adipogénesis: *Mapkap* (NM\_177345), *Cebpa* (NM\_007678), *Sez6* (NM\_021286), *Myo1f* (NM\_053214), *Gpr31c* (NM\_001013832), *Helz* (NM\_198298), *Tmem211* (NM\_001033428), *Crtam* (NM\_019465), *Cacna1d* (NM\_001083616), *Olfr692* (NM\_146355), *Gm15104* (NM\_001101501), *Hist1h4c* (NM\_178208), *Fbxw20* (NM\_001008428), *Olfr1510* (NM\_146431), *1700125G22Rik* (NR\_040548.1), *A930006D01Rik* (XR\_106168.2), *Cnksr2* (NM\_177751), *Psg-ps1* (NR\_002857), *Trp53bp1* (NM\_013735), *Slurp1* (NM\_020519), *4831440D22Rik* (XR\_106156) y *Slco1a1* (NM\_013797).

Gen ID	Nombre	Función relacionada con la adipogénesis	Ref
NM_009605	Ppar $\gamma$	Codifica el factor de transcripción PPAR $\gamma$	(66)
NM_007678	Cebpa	Codifica el factor de transcripción C/EBP $\alpha$	(66)
NM_001127330	Adipoq	Codifica hormona Adiponectina reguladora de PPAR $\gamma$	(1)
NM_008493	Lep	Codifica Leptina (Hormona reguladora de gasto energético)	(36)
NM_007420	Adrb2	Codifica el receptor adrenérgico beta 2 (ADBR2)	(62)
NM_178710	Sik2	Codifica SIK2 (quinasa sal-inducible 2) expresada en altos niveles en adipocitos durante la adipogénesis	(53)
NM_008509	Lpl	Codifica lipoproteína lipasa (hidrólisis de triglicéridos)	(77)
NM_008155	Gpi1	Codifica GPI1 (glucosa fosfato isomerasa 1), implicada en la captación de glucosa en el adipocito	(46)

**Tabla 8.** Genes marcadores seleccionados para su análisis por su relevancia en el metabolismo lipídico y el proceso de adipogénesis

## 4.3.B. Medida de la expresión génica relativa mediante RT-qPCR

Una vez seleccionados los genes de mayor interés para nuestros objetivos, se procedió a validar su expresión génica mediante RT-qPCR. El ADNc empleado en estos experimentos se había obtenido previamente mediante retrotranscripción del ARN extraído de preadipocitos 3T3-L1: (a) no diferenciados, (b) diferenciados en ausencia de extracto E3 y (c) diferenciados en presencia de dos concentraciones distintas de extracto E3 (200 y 400  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). La expresión diferencial de cada gen seleccionado se analizó por separado en tres experimentos de diferenciación independientes. Además, la expresión de cada gen en un mismo experimento de diferenciación se analizó a su vez por triplicados de muestras para cada concentración de trabajo.



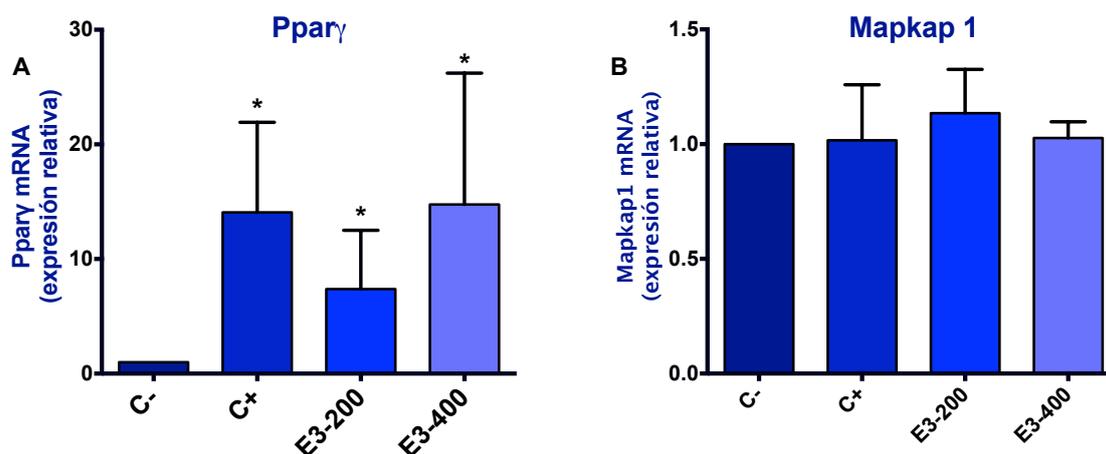
**Figura 9.** Expresión diferencial de distintos genes en preadipocitos 3T3-L1 no diferenciados (C-), diferenciados (C+) y diferenciados en presencia del extracto E3 a concentraciones de 200 y 400  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (E3-200 y E3-400, respectivamente). (A) Expresión génica relativa tomando como referencia exógena las células no diferenciadas (C-) y la expresión del gen Rn18s como referencia endógena. (B) Expresión génica relativa tomando como referencia exógena las células no diferenciadas (C-) y la expresión del gen Rplp0 como gen de referencia.

El cálculo de la expresión génica relativa se llevó a cabo empleando como control exógeno la expresión de cada uno de los genes seleccionados en los preadipocitos 3T3-L1 sin diferenciar. Además, se emplearon dos genes de referencia distintos (Rn18s y Rplp0) con el objetivo de comprobar que los resultados del análisis de las RT-qPCR no se veían influenciados por posibles contaminaciones en el gen de referencia (Figura 9).

Tras el análisis de los datos obtenidos en las RT-qPCRs, se observó una tendencia de expresión regular en seis de los treinta genes validados: Mapkap1, Ppar $\gamma$ , Sik2, Sez6, Helz e Hist1h4c. Es decir, estos seis genes (Figura 9) mostraron un patrón similar de expresión relativa entre las repetidas RT-qPCRs para cada experimento de diferenciación y también entre las RT-qPCRs realizadas a partir de experimentos de diferenciación independientes. Por el contrario, la expresión del resto de los genes seleccionados, a pesar de ser vulnerable a la presencia del extracto E3 en los distintos experimentos de diferenciación analizados por RT-qPCR, el grado de esta influencia variaba sin poder extrapolar un valor patrón de la tendencia. Estos genes no presentaron una tendencia similar de expresión génica entre experimentos ni en función del grado de diferenciación, ni en función de la concentración de extracto E3. Debido a esto, estos genes no parecían ser dianas de estudio adecuadas para la evaluación a nivel genético, del efecto del extracto E3 en el proceso de adipogénesis; pues su expresión parecía estar influenciada por otros factores alternativos a la concentración del extracto E3, los cuales harían difícil determinar qué parte de los resultados serían debidos exclusivamente al extracto E3. Por tanto, solo se seleccionaron como posibles candidatos para llevar a cabo estudios posteriores los seis genes en los cuales se comprobó una tendencia constante de expresión génica en presencia del extracto E3. Además, se verificó que la tendencia en la expresión diferencial de estos seis genes era muy similar independientemente del empleo de Rn18s (Figura 9A) o de Rplp0 (Figura 9B) como gen de referencia endógeno. Esto se consideró como una señal indicadora de la ausencia de contaminaciones en los genes housekeeping, lo cual aporta una mayor consistencia a los resultados obtenidos.

Se pudo observar como cada uno de los seis genes seleccionados parecía aumentar su expresión en las células diferenciadas con respecto a las no diferenciadas (Figura 9). No obstante, se comprobó un aumento mucho más acusado de la expresión génica tras la diferenciación para los genes Mapkap1, Ppar $\gamma$  y Sik2 que para los genes Sez6, Helz e Hist1h4c, para los cuales el incremento de la expresión génica con la diferenciación fue mucho más discreto. Además, el efecto del extracto E3 y la concentración a la cual este ejercía un mayor

efecto variaban entre los genes seleccionados. Por tanto, un análisis de cada gen por separado resultaba necesario.



**Figura 10.** Efecto del extracto E3 sobre la expresión de los genes Ppar $\gamma$  (A) y Mapkap1 (B). El control negativo (C-) se corresponde con los preadipocitos 3T3-L1 no diferenciados, el control positivo (C+) con los diferenciados en ausencia de extracto, y las muestras tratadas se diferenciaron en presencia del extracto E3 a concentraciones de 400 y 600  $\mu\text{g/ml}$  (E3-400 y E-600), respectivamente. En estos experimentos se ha empleado el gen Rn18s como control de expresión.

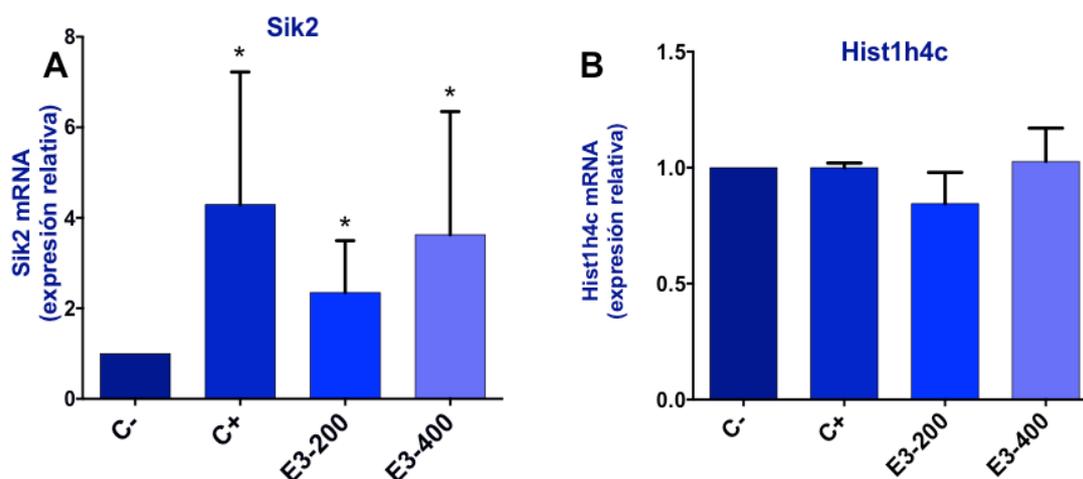
El incremento más drástico de la expresión génica (unas 14 veces más) en las células diferenciadas (control positivo) con respecto a las no diferenciadas (control negativo), se observó en el caso del gen Ppar $\gamma$  (Figura 10A), el cual codifica para el factor de transcripción del mismo nombre. Además según el análisis estadístico el aumento de expresión de Ppar $\gamma$  entre las muestras diferenciadas y las no diferenciadas es estadísticamente significativa (\* $p < 0.05$ ). Estos resultados indican un correcto desarrollo del modelo de adipogénesis en realizado en preadipocitos 3T3-L1, pues el factor de transcripción Ppar $\gamma$  es esencial para el desarrollo de la cascada de señalización que regula los cambios morfológicos y génicos producidos durante la diferenciación de adipocitos (66). Cuando el extracto se añadió a una concentración de 200  $\mu\text{g/ml}$  durante la diferenciación, la expresión del gen Ppar $\gamma$  se inhibió un 48% con respecto a la expresión del mismo gen en las muestras diferenciadas en ausencia del extracto (control positivo). Sin embargo, una mayor concentración de extracto E3 (400  $\mu\text{g/ml}$ ), no consiguió inhibir la adipogénesis con respecto al control positivo, sino que aumentó un 4.7% con respecto a este. Así, en el caso de Ppar $\gamma$ , al igual que ocurrirá con otros genes como se describirá más adelante, no se observó un efecto dosis dependiente del extracto E3. Por el contrario, la dosis de extracto que parecía tener una mayor inhibición de la expresión de Ppar $\gamma$  se encontraba en una concentración inferior a los 400  $\mu\text{g/ml}$ . Esta relación no lineal de la dosis del extracto con su efecto, que ya se había observado previamente en los análisis del

contenido de triglicéridos intracelulares, puede deberse a mecanismos de compensación desarrollados por la célula para hacer frente a los efectos del extracto cuando este está presente en altas concentraciones; consiguiendo de este modo llevar a cabo la adipogénesis en presencia del extracto aunque a niveles algo inferiores.

El gen Mapkap1 codifica para una proteína kinasa activada por estrés, la cual tiene como función regular el crecimiento celular y la apoptosis en respuesta a diferentes hormonas (21). Por tanto, la importancia del análisis de esta proteína en presencia del extracto E3 reside en su potencial relación con la activación-inhibición de la adipogénesis. Según los resultados obtenidos, la expresión de Mapkap1 (Figura 10B) solo se incrementó un 1,7% en el control positivo con respecto al control negativo. Además, a pesar de lo esperado, la adición de concentraciones bajas del extracto E3 (200 µg/ml) a las células 3T3-L1 durante su diferenciación no consiguió una tasa de expresión de Mapkap1 inferior a la del control positivo, sino un 11% mayor a ésta y por tanto un 13% más de expresión de Mapkap1 con respecto al control negativo. No obstante, a concentraciones superiores sí se observó el efecto inhibitorio deseado del extracto E3 en la expresión de Mapkap1. Así, una concentración de 400 µg/ml de extracto E3 consiguió inhibir la diferenciación en un 10 % con respecto al control positivo. Parece ser por tanto, que la inhibición de Mapkap1 requiere concentraciones superiores de extracto E3 que las requeridas, por ejemplo, para inhibir Ppar $\gamma$  consiguiéndose la máxima inhibición de Mapkap1 con una concentración de extracto E3 superior a los 400 µg/ml.

La potencial modificación de la expresión del gen Sik2 en presencia del extracto E3 resulta de gran interés, pues este codifica para una proteína denominada SIK2 presente en altos niveles en las células grasas. Esta proteína está implicada en el metabolismo energético de los adipocitos, suponiendo su sobreexpresión en las células grasas una reducción del contenido de triglicéridos intracelulares y una inhibición de la expresión de genes lipogénicos como FAS Y ACC (15; 53). Según los resultados obtenidos (Figura 11A), el gen Sik2 aumentó su expresión en los preadipocitos 3T3-L1 diferenciados de modo estadísticamente significativo con respecto al control negativo de células no diferenciadas, lo cual es un indicador del buen desarrollo del proceso de diferenciación. En concreto, la expresión de Sik2 aumentó 4,3 veces en el control positivo con respecto al control negativo. Cuando las células se trataron con el extracto E3, la expresión de este gen se inhibió un 45% con respecto al control positivo cuando utilizamos una concentración de 200 µg/ml. Sin embargo, se observó de nuevo un efecto saturante y compensatorio del extracto E3 en este caso, pues una mayor concentración del mismo (400

$\mu\text{g/ml}$ ) solo consiguió la inhibición de la expresión de Sik2 en un 15 % con respecto al control positivo.



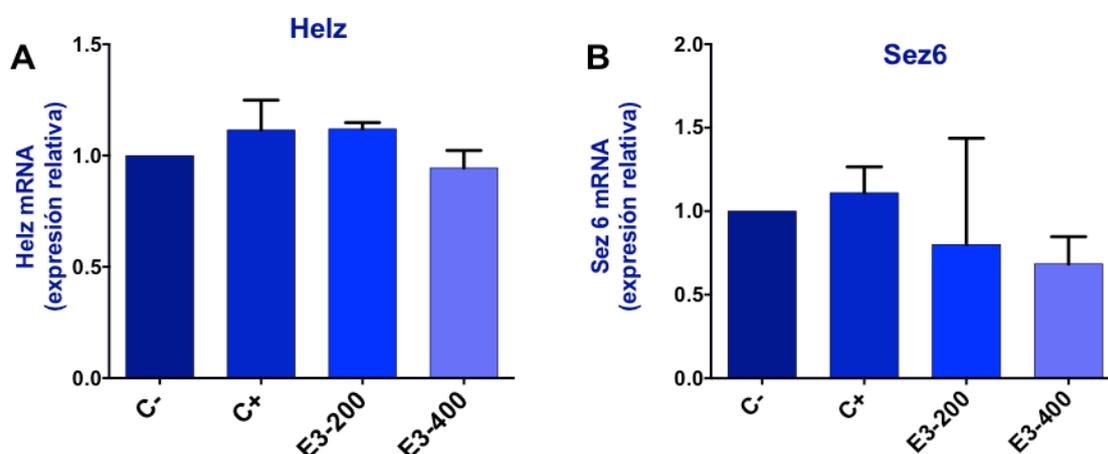
**Figura 11.** Efecto del extracto E3 sobre la expresión de los genes Sik2 (A) y Hist1h4c (B). El control negativo (C-) se corresponde con los preadipocitos 3T3-L1 no diferenciados, el control positivo (C+) con los diferenciados en ausencia de extracto, y las muestras tratadas se diferenciaron en presencia del extracto E3 a concentraciones de 400 y 600  $\mu\text{g/ml}$  (E3-400 y E3-600), respectivamente. En estos experimentos se ha empleado el gen Rn18s como control de expresión.

El gen Hist1h4c codifica para la histona H4, una importante proteína reguladora del ciclo celular y de la expresión de múltiples factores de transcripción involucrados en distintas rutas celulares. A pesar de que esta proteína no parece tener un efecto directo sobre el proceso de adipogénesis, estudios recientemente publicados (y parte de esta tesis) han comprobado cambios representativos en la expresión de este gen en preadipocitos diferenciados en presencia del extracto E3 (27), por lo que es posible que ejerza un efecto indirecto sobre el proceso de adipogénesis. Sin embargo, según los resultados de las RT-qPCRs (Figura 11B), las variaciones en la expresión en función de la diferenciación como en función de la presencia o ausencia del extracto E3 fueron poco llamativas. No obstante, en el análisis de los resultados de las RT-qPCR, lo que más destaca sobre el gen Hist1h4c fue su patrón de expresión, que parecía mostrar una tendencia ligeramente diferente a los otros cinco genes descritos con patrones repetitivos. Entre estos genes, Hist1h4c fue el único cuya expresión no aumentaba aparentemente con la diferenciación pero sí parecía verse afectada directamente con la aplicación del extracto. En concreto, la expresión de Hist1h4c disminuyó un 16% en las células diferenciadas en presencia de 200  $\mu\text{g/ml}$  de E3 con respecto a los preadipocitos 3T3-L1 no diferenciados. No obstante, la tendencia de expresión vuelve a cambiar con concentraciones de 400  $\mu\text{g/ml}$ , cuando la expresión de Hist1h4c es de un 2.7 % más que las células del control positivo y por tanto en este caso del control negativo. Así, en caso de que el extracto E3

inhibiera la expresión de Hist1h4c solo sería cuando se aplicara en concentraciones cercanas a los 200  $\mu\text{g/ml}$ . Aun así, los cambios que se observaron en la expresión de Hist1h4c en presencia del extracto E3 fueron muy sutiles, con lo cual era probable que su diferencia no se llegara a apreciar cuantitativamente a nivel de proteínas.

El gen Helz codifica para la proteína helicasa del mismo nombre, la cual está involucrada en la regulación de la proliferación celular, el inicio de la transcripción y la fosforilación de proteínas ribosomales (31). Los resultados de las RT-qPCRs mostraron un aumento del 11% en la expresión del gen Helz en las células del control positivo con respecto a las del control negativo (Figura 12A). El extracto E3 no pareció tener un efecto inhibitorio de la expresión de Helz a una concentración de 200  $\mu\text{g/ml}$ . Sin embargo, en las células tratadas con el extracto E3 a una concentración de 400  $\mu\text{g/ml}$  se observa una disminución de la expresión del gen Helz en un 15% con respecto a su expresión en las células del control positivo.

A diferencia del caso anterior, la expresión del gen Sez6, el cual codifica para la proteína Sez6 implicada en mecanismos de señalización neuronal (42) resultó ser un poco más sensible a la presencia del extracto E3. En las células diferenciadas se observó un 11% más de expresión del gen Sez6 que en las no diferenciadas (Figura 12B). En este caso, con una concentración de 200  $\mu\text{g/ml}$  del extracto E3 ya se observó un efecto inhibitorio del 28% en la expresión de Sez6 con respecto a las células del control positivo. Además, para el gen Sez6 sí se observó una acción inhibitoria de su expresión que parecía dosis dependiente a la concentración del extracto E3. Así, una concentración superior del extracto E3 (400  $\mu\text{g/ml}$ ) consiguió inhibir la expresión del gen Sez6 en un 38%



**Figura 12.** Efecto del extracto E3 sobre la expresión de los genes Helz (A) y Sez6 (B). El control negativo (C-) se corresponde con los preadipocitos 3T3-L1 no diferenciados, el control positivo (C+) con los diferenciados en ausencia de extracto, y las muestras tratadas se diferenciaron en presencia del extracto E3 a concentraciones de 400 y 600  $\mu\text{g/ml}$  (E3-400 y E3-600), respectivamente. En estos experimentos se ha empleado el gen Rn18s como control de expresión.

No obstante, al igual que ocurría con *Hist1h4c*, los niveles de expresión de los genes *Helz* y *Sez6*, aunque presentaran cambios en función del extracto E3, éstos resultan en general muy bajos, con lo cual era probable que su diferencia no se llegara a apreciar cuantitativamente a nivel de proteínas debido a la incapacidad para detectar las mismas.

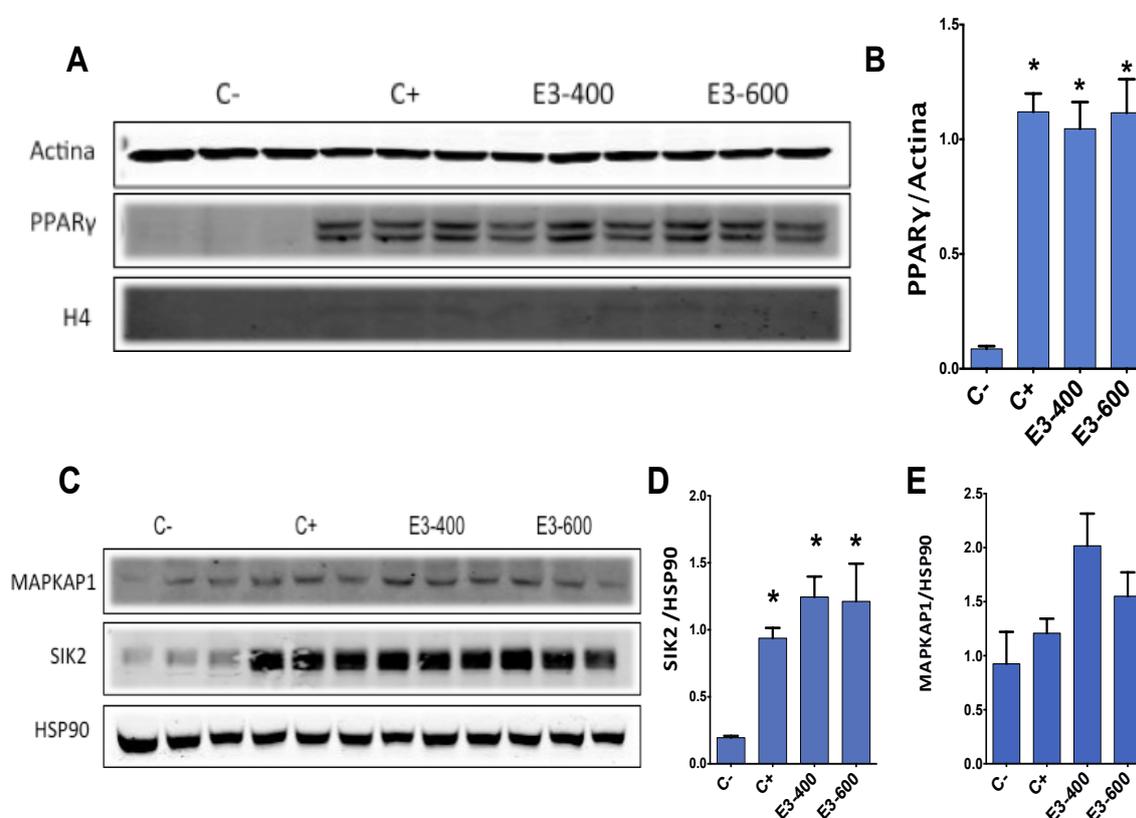
#### **4.4. Estudio de la influencia del extracto de *Taraxacum officinale* en la síntesis de proteínas durante la adipogénesis de células 3T3-L1**

Finalmente se quiso comprobar si las variaciones en la expresión de algunos genes detectadas mediante las RT-qPCRs, se correlacionaban con cambios en los niveles celulares de las proteínas codificadas por esos mismos genes. Esto es relevante ya que si se viera una disminución en la expresión de ciertas proteínas involucradas en el proceso adipogénico cuando se aplica el tratamiento, se podría demostrar que el mecanismo molecular por el cual el extracto E3 ejerce su efecto funcional antiobesidad (inhibición de la adipogénesis y disminución del contenido de TG) se basa al menos en parte, en una menor síntesis y por lo tanto actividad de al menos esas proteínas en concreto.

Para comprobar estos cambios potenciales en la síntesis de proteínas se empleó la técnica analítica Western blot, la cual se basa en el empleo de anticuerpos específicos para detectar proteínas de interés en una mezcla compleja de diferentes proteínas. Se decidió comenzar con la inmunodetección de las proteínas cuya concentración era más probable que variara en función del extracto, es decir, se realizaron Western blot para las proteínas de aquellos genes cuya expresión se había modificado en mayor medida debido a la presencia del extracto E3 durante la diferenciación. De acuerdo con los análisis de las RT-qPCRs, dentro de grupo de genes con un patrón de expresión repetitivo, los genes *Ppar $\gamma$* , *Mapkap1* y *Sik2* fueron aquellos cuya expresión sufrió cambios más acusados cuando las células se diferenciaban tanto en ausencia como en presencia de extracto E3 (Figura 9). Por tanto, se decidió realizar experimentos de Western blot para detectar los niveles de síntesis de las tres proteínas codificadas por estos tres genes en cada condición del estudio. El resto de genes seleccionados por presentar un patrón de expresión coherente entre las distintas RT-qPCRs (*Helz*, *Sez6* y *Hist1h4c*) no presentaban cambios de expresión génica demasiado acusados cuando las células se diferenciaban ni en presencia ni en ausencia del extracto E3. Además, las mayores tasas de

expresión de estos genes eran muy bajas, con lo cual era probable que aunque hubiera ligeros cambios en la síntesis de las proteínas codificadas por estos genes, la cantidad de proteína expresada en estas muestras fuera tan poca que no se pudiera detectar diferencias de concentración proteica mediante inmunodetección. Así, el único de estos tres genes cuya proteína se decidió detectar por Western blot fue Hist1h4c con la intención de probar si la detección de su proteína asociada se podía realizar a niveles tan bajos de expresión.

Por tanto, se decidió detectar mediante Western blot las cuatro proteínas codificadas por los genes Ppar $\gamma$ , Mapkap1, Hist1h4c y Sik2; cuyos nombres son PPAR $\gamma$ , MAPKAP1, H4 y SIK2, respectivamente. La inmunodetección de cada proteína se llevó a cabo por duplicado y como marcadores de carga se emplearon las proteínas Actina y HSP90, cuya síntesis debía permanecer constante en todas las condiciones estudiadas. De esta manera, si los niveles de estas dos proteínas eran iguales en todos los pocillos detectados en el Western blot, podríamos saber con seguridad que las diferencias de concentración de la proteína de interés en el pocillo no se debía a distintos volúmenes de muestra cargada en el pocillo.



**Figura 13.** Perfil de expresión de proteínas PPAR $\gamma$ , SIK2, MAPKAP1 y H4 en preadipocitos 3T3-L1 no diferenciados (C-), diferenciados (C+) y diferenciados en presencia de 400 (E3-400) y 600 (E3-600) µg/ml de E3. (A) Revelado de Western blot en los que se han empleado anticuerpos contra PPAR $\gamma$ , H4 y contra la proteína control de carga Actina. (B) Cuantificación de la expresión de PPAR $\gamma$ . (C) Revelado de Western blot contra MAPKAP1, H4 y la proteína de control de carga HSP90. Cuantificación de la expresión de SIK2 (D) y MAPKAP1 (E).

En el caso de la proteína PPAR $\gamma$ , los resultados de su inmunodetección (Figura 13A-B) se correlacionaron con aquellos obtenidos en los análisis del perfil de expresión génica mediante RT-qPCR (Figura 10). Es decir, la proteína PPAR $\gamma$  (codifica por el gen del mismo nombre) fue de las cuatro proteínas detectadas por Western blot, la que más aumentó su expresión en las células diferenciadas (control positivo) con respecto a las células no diferenciadas (control negativo). Este aumento en la síntesis de PPAR $\gamma$  se observó inicialmente mediante el revelado del Western (Figura 13A) y después mediante la cuantificación de la cantidad de proteína expresada en relación a la proteína control Actina (Figura 13B). Además, el análisis estadístico de la cuantificación de PPAR $\gamma$  en el Western blot determinó que las diferencias de expresión de esta proteína entre las muestras de células diferenciadas y las no diferenciadas eran estadísticamente significativas. Como ya se ha comentado con anterioridad, al igual que ocurría a nivel génico, el aumento de la síntesis de proteína PPAR $\gamma$  es indicador de un correcto desarrollo del proceso de adipogénesis debido a su papel esencial como factor de transcripción en la activación de la adipogénesis (74). Sin embargo, a simple vista dentro de las muestras de células diferenciadas, no se observaron grandes diferencias en la síntesis de PPAR $\gamma$  entre las células tratadas y no tratadas con extracto (Figura 13A). No obstante, la cuantificación del Western blot reveló, aunque pequeña, una inhibición de la expresión de esta proteína del 6,6% en presencia de extracto E3 a una concentración de 200  $\mu\text{g/ml}$  en relación con las muestras control (Figura 13B). No obstante, al igual que ocurría con la expresión génica, el efecto inhibitorio de la síntesis de PPAR $\gamma$  se saturó a la concentración de 400  $\mu\text{g/ml}$ , pues este efecto fue menor que a la concentración de 200  $\mu\text{g/ml}$  y sólo consiguió reducir un 0.4% la síntesis de esta proteína con respecto al control de células diferenciadas.

Tras el revelado del Western blot realizado contra la proteína H4 (Figura 13A) se obtuvo, tal y como se había previsto, una imagen en la que la cuantificación de esta proteína codificada por el gen Hist1h4c resultaba imposible debido a la baja tasa de expresión de la misma en todas y cada una de las condiciones estudiadas. Aunque no fue posible la cuantificación de su correspondiente Western blot, sí se observa con detenimiento la imagen resultante de su revelado (Figura 13A), sí que se llega a apreciar un sutil aumento de proteína en las muestras de células diferenciadas con respecto a las células no diferenciadas, lo cual indicaba que la síntesis de H4 se había incrementado durante el proceso de adipogénesis. No obstante, no ha sido posible determinar si hubo cambios cuantitativos en la expresión de esta proteína cuando las células se diferenciaron en presencia de distintas concentraciones de extracto E3, con lo cual en este caso, el efecto del extracto, que ya parecía ser muy leve a nivel de expresión génica, resultó imposible de determinar a nivel de síntesis de proteína.

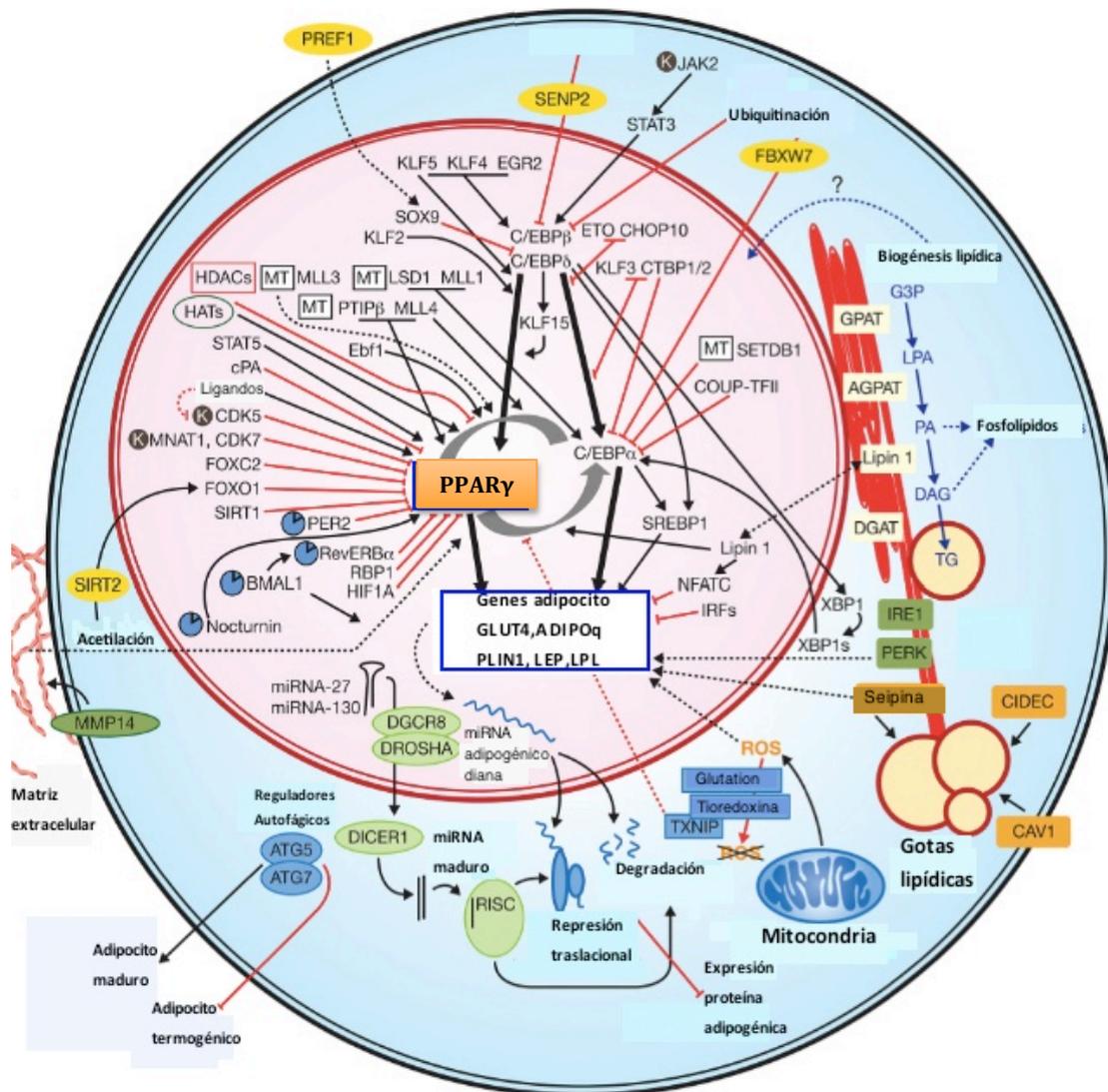
Los Western blot realizados contra la proteína SIK2 ofrecieron resultados más esclarecedores que en la situación anterior. En este caso un considerable aumento de la síntesis de esta proteína codificada por el gen *Sik2* con la diferenciación de los preadipocitos 3T3-L1 es observable en el revelado de Western blot (Figura 13C). Además, la cuantificación de proteínas en este experimento determinó que la síntesis de SIK2 aumentaba de manera estadísticamente significativa en las muestras de células diferenciadas con respecto a las células no diferenciadas (Figura 13D). Este aumento de la expresión de SIK2 en las células diferenciadas, además de correlacionarse con los resultados del análisis de la expresión génica (Figura 11A) se corresponde con la bibliografía, en la que se afirma que esta proteína está presente a niveles elevados en las células grasas debido a su implicación en el metabolismo energético de los adipocitos (15; 53). Por tanto, una inhibición de la expresión de esta proteína durante la adipogénesis en presencia del extracto E3 hubiera resultado de gran interés desde el punto de vista del efecto antiobesogénico del mismo. Sin embargo, a pesar de que los resultados de las RT-qPCRs indicaban una inhibición de la expresión génica de *Sik2* en presencia de extracto E3 durante la diferenciación (Figura 11 A), los resultados obtenidos de la cuantificación de proteína SIK2 no corroboró tal inhibición a nivel de síntesis de proteínas (Figura 13D).

La última proteína detectada mediante Western blot, MAPKAP1, presentó tras su cuantificación, un resultado similar al anterior (Figura 13C y 13E). Es decir, aunque menos acusado, se observó un aumento de la expresión de esta proteína en las células diferenciadas con respecto a las no diferenciadas, pero no se observó efecto inhibitorio del extracto E3 en la expresión de MAPKAP1 en las células diferenciadas. Estos resultados corroboran aquéllos observados en los análisis de expresión del gen *Mapkap1* (Figura 10B) y que parecen indicar que el extracto E3 no ejerce su efecto funcional mediante una fuerte inhibición de la síntesis de *Mapkap1*.

En resumen, tras el análisis de los Western blot realizados contra estas cuatro proteínas, el extracto E3 sólo demostró tener un efecto inhibitorio a nivel de expresión tanto transcripcional como traduccional para el gen *Ppargy*. Sin embargo, los genes *Mapkap1*, *Sik2* y *Hist1h4c*, aunque modifican su expresión génica en presencia del extracto E3, la expresión de sus proteínas no pareció verse alterada por el mismo, según indican los datos obtenidos. Por tanto, la expresión del resto de genes estudiados parecía verse influida de manera muy reducida en presencia del extracto E3 durante el proceso de adipogénesis.

No obstante, a pesar de solo haberse demostrado un claro efector inhibitorio del extracto E3 sobre la expresión de la proteína PPAR $\gamma$ , los estudios funcionales realizados han demostrado que este extracto ejerce un evidente efecto reductor de la adipogénesis en el modelo celular de preadipocitos 3T3-L1. De hecho, además de haberse demostrado en este estudio y en estudios previos (27) esta capacidad del extracto de raíz pulverizada del diente de león de frenar el proceso adipogénico, también se ha demostrado su capacidad de reducir el número de triglicéridos totales que se acumulan a nivel intracelular en los adipocitos.

Además, según los resultados de los microarrays obtenidos en estudios previos (24), el extracto de polvo de raíz de *Taraxacum officinale* (E3) modificó significativamente la expresión génica de las muestras.



**Figura 14.** Esquema de la cascada de señalización que conduce al fenotipo de adipocito maduro (49). Se aprecia como el factor de transcripción PPAR $\gamma$  se sitúa en el centro de la cascada de señalización controlado por muchos otros genes, y como junto con C/EBP $\alpha$  es el responsable principal de la expresión de los genes característicos del adipocito maduro como ADIPOQ, LEP o GLUT (84; 85).

Teniendo en cuenta todos estos resultados de manera conjunta, la interpretación más lógica de los mismos sugiere que el extracto ejerce su efecto inhibitorio del proceso adipogénico mediante pequeñas modificaciones en la expresión de muchos genes distintos, los cuales están involucrados de manera más o menos directa en la compleja cascada de señalización de la adipogénesis. Así, estas pequeñas alteraciones de la expresión génica serían mínimas y por tanto no detectables con seguridad mediante técnicas de biología molecular, pero sin embargo resultarían en su conjunto en al menos una inhibición de la expresión del gen que se encuentra en el centro de esta cascada de señalización (Figura 14), el gen *Ppar $\gamma$*  (36) ; y por lo tanto resultarían también en la inhibición de la síntesis de la proteína PPAR $\gamma$  codificada por este gen. Esta proteína, que como se ha explicado con antelación es el principal factor de transcripción de la adipogénesis, induce la expresión de C/EBP $\alpha$  y es junto con este segundo factor de transcripción el último responsable de la expresión de muchos genes específicos del fenotipo maduro del adipocito y de su sensibilidad a la insulina (86). Así por tanto, el mecanismo molecular mediante el cual el extracto E3 es capaz de inhibir la adipogénesis mediante la disminución del tamaño (hipertrofia) y del número (hiperplasia) de adipocitos maduros; se basa en la suma de pequeñas alteraciones en la expresión de muchos genes , las cuales derivan como mínimo en una reducción de la síntesis del factor de transcripción PPAR $\gamma$ , lo cual en último lugar supone una menor expresión de los genes específicos del adipocito maduro y por tanto una inhibición de la adipogénesis (86). Además, es probable que el mecanismo molecular por el cual el extracto E3 ejerce su efecto antiobesogénico no solo se base en último lugar en la reducción de PPAR $\gamma$ ; sino que la cascada de modificaciones a nivel de expresión génica afecte a la expresión de otros factores de transcripción también muy importantes del proceso adipogénico como por ejemplo las proteínas de la familia C/EBP (9). No obstante, en este estudio solo se ha comprobado la alteración significativa de PPAR $\gamma$  en presencia del extracto, con lo cual futuros estudios que profundicen en el mecanismo molecular por el cual el extracto de raíz pulverizada de *Taraxacum officinale* (E3) ejerce su efecto deberían ser realizados en un futuro.

## 5. CONCLUSIONES y OBJETIVOS FUTUROS

A partir del análisis de los resultados obtenidos durante la realización de este proyecto se han extraído las siguientes conclusiones:

- A. El extracto de raíz pulverizada de *Taraxacum officinale* (E3) inhibe la adipogénesis mediante la reducción del número de preadipocitos 3T3-L1 que alcanzan el fenotipo de adipocito maduro (reducción de la hiperplasia).
- B. El extracto de raíz pulverizada de *Taraxacum officinale* (E3) inhibe la adipogénesis de preadipocitos 3T3-L1 mediante la reducción de los niveles de triglicéridos intracelulares acumulados en los adipocitos maduros, lo cual a su vez evita (o previene) el aumento del tamaño de los mismos (reducción de la hipertrofia).
- C. El extracto de raíz pulverizada de *Taraxacum officinale* (E3) presenta una baja capacidad antioxidante, motivo por el cual la actividad inhibidora de la adipogénesis demostrada por este extracto en preadipocitos 3T3-L1 no parece estar vinculada a los mecanismos antioxidantes.
- D. El extracto de raíz pulverizada de *Taraxacum officinale* (E3) reprime la expresión del gen Ppar $\gamma$ , el cual es imprescindible para el correcto desarrollo del proceso de diferenciación de preadipocitos 3T3-L1. Además, este extracto también reprime ligeramente la expresión de otros genes relacionados con la adipogénesis como Sik2, el cual está involucrado en el metabolismo energético de los adipocitos.
- E. El extracto de raíz pulverizada de *Taraxacum officinale* (E3) reprime la síntesis de la proteína PPAR $\gamma$ , la cual es un factor de transcripción imprescindible para el correcto desarrollo del proceso de diferenciación de preadipocitos 3T3-L1.
- F. El extracto de raíz pulverizada de *Taraxacum officinale* (E3) es capaz de inhibir la adipogénesis de preadipocitos 3T3-L1, así como el contenido de triglicéridos intracelulares en adipocitos maduros, lo cual convierte a esta planta en una potencial fuente de fitoquímicos con actividad antiobesogénica.

En conclusión, la principal hipótesis deducida a partir de los resultados de estos estudios indica que el extracto de raíz pulverizada de *Taraxacum officinale* (E3) ejerce su papel represor de la adipogénesis mediante ligeras alteraciones en la expresión de muchos genes, las cuales en suma, derivan en una inhibición de la expresión del gen Ppar $\gamma$  a través de la modificación de la cascada de señalización de la adipogénesis. Esto a su vez, genera por tanto una disminución de la síntesis del factor de transcripción PPAR $\gamma$ , que al ser un regulador clave de la diferenciación de adipocitos (1), inhibe la adipogénesis de los mismos.

No obstante, el efecto inhibitorio que este extracto de raíz pulverizada de *Taraxacum officinale* ejerce sobre la expresión de PPAR $\gamma$  no parece ser tan acusado como para que esta estrategia sea por sí sola la responsable del efecto antiobesogénico total demostrado por el extracto E3. Por tanto, es probable que la actividad inhibidora de la adipogénesis descrita para este extracto se base, además de en su inhibición de la expresión de PPAR $\gamma$ , en otras rutas alternativas que condujeran también al mismo efecto funcional. Sin embargo, la influencia del extracto E3 en la expresión de muchos otros genes involucrados en el proceso de diferenciación, como por ejemplo los genes que codifican las proteínas de la familia C/EBPA, no ha llegado a ser validada con exactitud en este estudio. Por tanto, futuros estudios que describan con mayor precisión y detalle el mecanismo molecular por el cual el extracto E3 ejerce su actividad inhibidora de la adipogénesis son necesarios.

## 6. REFERENCIAS

1. Ajuwon KM, Spurlock ME. 2005. Adiponectin inhibits LPS-induced NF-kappaB activation and IL-6 production and increases PPARgamma2 expression in adipocytes. *Integr Comp Physiol* **288**:1220-25.
2. Aubert J, Saint-Marc P, Belmonte N, Dani C, Negrel R, Ailhaud G. 2000. Prostacyclin IP receptor up-regulates the early expression of C/EBPbeta and C/EBPdelta in preadipose cells. *Mol Cell Biol* **160**:149-56.
3. Bio-Rad. A Guide to Polyacrylamide Gel Electrophoresis and Detection. *Boletín* **6040**
4. Bio-Rad. Protein Blotting Guide. *Boletín* **2895**
5. Bisset NG, Philipson JD, Czygan FC. 1994. *Herbal Drugs and Phytopharmaceuticals: A handbook for Practice on a Scientific Basis*. Boca Raton. FL:CRC Press:486-9
6. Bouchard C, Tremblay A. 1997. Genetic influences on the response of Body and Fat distribution to positive and negative balance in human identical twins. *J Nutr* **127**:943-7
7. Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Sci and Technol* **28**:25-30
8. Bray GA. 2004. Medical Consequences of Obesity. *J Clin Endocrinol Metab* **89**:2583-9
9. Calle EE, Thun MJ. 2004. Obesity and cancer. *Oncogene* **23**:6365-78
10. Cao Z, Umek RM, McKnight SL. 1991. Regulated expression of three C/EBP isoforms during adipose conversion of 3T3-L1 cells. *Genes Dev* **5**:1538-52
11. Clavijo MA, Camargo DG, Alegría CG. 2007. Adipogénesis in vitro de células 3T3-L1. *Rev.Med* **15**:170-6
12. CNB-CSIC. GeneCoDis3. <http://genecodis.cnb.csic.es>
13. Cora J Dillard, Bruce JG. 2000. Phytochemicals: nutraceuticals and human health. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **80**: 1744-56
14. Dong C, Sanchez LE, Price RA. 2004. Relationship of obesity to depression: a family-based study. *International Journal of Obesity* **28**:790-5
15. Du J, Chen Q, Takemori H, Xu H. 2008. SIK2 Can be Activated by Deprivation of Nutrition and It Inhibits Expression of lipogenic Genes in Adipocytes. *Obesity* **16**:531-38
16. Fajas L, Schoonjans K, Gelman L, Kim JB, Najib J, Martin G, Fruchart JC, Briggs M, Spiegelman BM, Auwerx J. 1999. Regulation of peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  expression by adipocyte differentiation and determination factor 1/sterol regulatory element binding protein 1: Implications for adipocyte differentiation and metabolism. *Mol Cell Biol* **19**:5495-503
17. FAO. 2013. The state of food and agriculture 2013. Food systems for better nutrition.

18. Farese RV , Walther TC. 2009. Lipid droplets finally get a little R-E-S-P-E-C-T. *Cell* **139**:855-60
19. Gallagher SR. 2012. SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE). *Current Protocols Essential Laboratory Techniques* 7.3
20. Gasca JMG. 2000. Fitoterapia: Diente de león. *Medicina naturista* **1**:20-23
21. Ghosh D, Srivastava GP, Xu D, Schulz LC, Roberts RM. 2008. A link between SIN1 (MAPKAP1) and poly(rC) binding protein 2 (PCBP2) in counteracting environmental stress. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**:11673-78
22. Goldberg I. 1994. *Functional foods: designer foods, pharmafoods, nutraceuticals*. Aspen Publication
23. Gomez A, Perdomo L, Escribano O, Benito M. 2013. Role of brown and perivascular adipose tissue in vascular complications due to obesity. *Clín Inv Arterioesclerosis*
24. González-Castejón Marta. 2013. Efecto de Extractos de *Taraxacum officinale* sobre la Adipogénesis y el Metabolismo Lipídico de Células 3T3-L1. Departamento de Química Física Aplicada. Universidad Autónoma de Madrid
25. González-Castejón M, Rodríguez-Casado A. Dietary phytochemicals and their potential effects on obesity: A review. *Pharm Res* **64**:438-55
26. González-Castejón M, Visioli F, Rodríguez-Casado A. Diverse biological activities of dandelion. *Nutrition Reviews* **70**:534-47
27. González-Castejón, García-Carrasco B, Fernández-Dacosta R, Dávalos A, Rodríguez-Casado R. 2013. Reduction of Adipogenesis and Lipid Accumulation by *Taraxacum officinale* (Dandelion) Extracts in 3T3L1 Adipocytes: An in vitro Study. *Phytotherapy Research Online* early version
28. Green H and Kehinde O. 1975. An established preadipose cell line and its differentiation in culture. II. Factors affecting the adipose conversion. *Cell* **5**:19-27
29. Gregoire FM. 2001. Adipocyte differentiation: from fibroblast to endocrine cell. *Exp Biol Med* **226**:997-1002
30. Harvard Med.School. PrimerBank. <http://pga.mgh.harvard.edu/primerbank/>
31. Hasgall PA, Hoogewijs D, Faza MB, Panse VG, Wenger RH, Camenisch G. 2011. The Putative RNA Helicase HELZ Promotes Cell Proliferation, Translation Initiation and Ribosomal Protein S6 Phosphorylation. *PLoS ONE* **6**:e22107
32. Heck AM, Yanovski JA, Calis KA. 2000. Orlistat, a new lipase inhibitor for the management of obesity. *Pharmacotherapy* **20**:270-9
33. HMGene. Therapies for Metabolic Disorders. Adipocytes and Obesity. [http://www.hmgene.com/htmls/hmgene\\_tech.html](http://www.hmgene.com/htmls/hmgene_tech.html)

34. Hsu CL, Yen GC. 2006. Induction of cell apoptosis in 3T3-L1 pre-adipocytes by flavonoids is associated with their antioxidant activity. *Mol Nutr Food Res* **50**:1072-79
35. Hutcheson R, Rocic P. 2012. The metabolic syndrome, oxidative stress, environment, and cardiovascular disease: the great exploration. *Exp Diabetes Res* 2012:Article ID 271028
36. Ikeda Y, Hama S, Kajimoto K, Okuno T, Tsuchiya H, Kogure K. 2011. Quantitative comparison of adipocytokine gene expression during adipocyte maturation in non-obese and obese rats. *Biol Pharm Bull* **34**:865-70
37. Janssen I, Heymsfields SB, Allison DB, Kotler DP, Ross R. 2002. Body mass index and waist circumference independently contribute to the prediction of nonabdominal, abdominal, subcutaneous and visceral fat. *Am J Clin Nutr* **75**:683-8
38. Jiang L, Rong J, Wang Y, Hu F, Bao C, Li X, Zhao Y. The relationship between body mass index and hip osteoarthritis: a systematic review and meta-analysis. *Joint Bone Spine* **78**:150-5
39. Kalny P, Fijałek Z, Daszczyk A, et al. 2007. Determination of selected microelements in Polish herbs and their infusions. *Sci Total Environ* **381**:99-104
40. Katsiki N, Ntaios G, Vemmos K. 2011. Stroke, obesity and gender: a review of the literature. *Maturitas* **69**:239-43
41. Kim CY, Le TT, Chen C, Cheng JX, Kim KH. 2011. Curcumin inhibits adipocyte differentiation through modulation of mitotic clonal expansion. *J Nutr Biochem* **22**:910-20
42. Kim MH, Gunnarsen JM, Tan SS. 2002. Localized expression of the seizure-related gene SEZ-6 in developing and adult forebrains. *Mech Dev* **118**:171-4
43. Kirchoff E. 2005. *Souci-Fachmann-Kraut: Food Composition and Nutrition Tables*. Medpharm Scientific Publishers: Stuttgart
44. Kuo LC, Polson AM, Kang T. 2008. Associations between periodontal diseases and systemic diseases: a review of the inter-relationships and interactions with diabetes, respiratory diseases, cardiovascular diseases and osteoporosis. *Publ Health* **122**:417-33
45. Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**:680-5
46. Lafontan M, Sengenès C, Galitzky J, Berlan M, De Glisezinski I, Crampes F, Stich V, Langin D, Barbe P, Riviere D. 2000. Recent developments on lipolysis regulation in humans and discovery of a new lipolytic pathway. *Int J Obes Relat Metab Disord* 24 Suppl **4**:47-52
47. Latham KE, Sapienza C, Engel N. 2012. The epigenetic loraX: gene environment interactions in human health. *Epigenomics* **4**:383-402
48. Livak KJ, Schmittgen TD. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-</sup>(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* **25**:402-8

49. Lowe EC, O'Rahilly S, Rochford JJ. 2011. Adipogenesis at a glance. *J Cell Science* **124**:2681-6
50. Luque CA, Rey JA. 1999. Sibutramine: a serotonin-norepinephrine reuptake-inhibitor for the treatment of obesity. *Ann Pharmacother* **33**:968-78
51. Marinou K, Tousoulis D, Antonopoulos AS, Stefanadi E, Stefanadis C. 2010. Obesity and cardiovascular disease: from pathophysiology to risk stratification. *Int J Cardiol* **138**:3-8
52. Mokdad HA, Marks JS, Stroupand DF, Gerberding JL. 2004. Actual Causes of Death in the United States. *JAMA* **291**:1238-45
53. Muraoka M, Fukushima A, Viengchareun S, Lombes M, Kishi F, Miyauchi A, Kanematsu M, Doi J, Kajimura J, Nakai R et al. 2009. Involvement of SIK2/TORC2 signaling cascade in the regulation of insulin-induced PGC-1alpha and UCP-1 gene expression in brown adipocytes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **296**:1430-9
54. NCBI. Primer Designing Tool. tmf-INDICE.docx
55. NCBI. Pubmed. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>
56. Ntambi JM, Young-Cheul K. 2000. Adipocyte differentiation and gene expression. *J Nutr* **130**:3122-6
57. OECD. 2012. Obesity and the economics of prevention: Fit not fat. Key facts-Spain update 2012.
58. Olshansky SJ PD, Hershow RC, Layden J, Carnes AB, Brody J, Hayflick L, Butler R, Allison DB, Ludwig DS. 2010. A Potential Decline in Life Expectancy in the United States in the 21st Century. *N Eng J Med* **352**:1138-45
59. Ordovás JM, Shen J. 2009. Gene–Environment Interactions and Susceptibility to Metabolic Syndrome and Other Chronic Diseases. *J Periodontol*. **79**:1508-13
60. Palomo IG, Gutierrez MC, Astudillo LS, Rivera CS, Torres CU, Guzmán LJ, Moore RC, Carrasco GS, Alarcón ML. 2009. Antioxidant Effect of Fruits and Vegetables od Central Region of Chile. *Rev Chil Nutr* **36**
61. Palou A, Serra F, Bonet ML, Picó C. 2000. Obesity: molecular bases of a multifactorial problem. *Eur J nutr* **39**:127-44
62. Petrone A, Zavarella S, Iacobellis G, Zampetti S, Vania A, Di-Pietro S, Galgani A, Leonetti F, Di Mario U, Buzzetti R. 2006. Association of beta2 adrenergic receptor polymorphisms and related haplotypes with triglyceride and LDL-cholesterol levels. *Eur J Hum Genet* **14**:94-100
63. Popkin MB, Adair SL, Wen NS. 2012. The Global Nutrition Transition: The Pandemic of Obesity in Developing Countries. *Nutr Rev* **70**:3-21
64. Richon VM, Lyle RE, McGehee RE. 1997. Regulation and expression of retinoblastoma proteins p107 and p130 during 3T3-L1 adipocyte differentiation. *J biol chem* **272**:10117-24

65. Ronti T, Lupattelli G, Mannarino E. 2006. The endocrine function of adipose tissue: an update. **64**:355-65
66. Rosen ED, MacDougald OA. 2006. Adipocyte differentiation from the inside out. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **7**:885-96
67. Sabin MA, Werther GA, Kiess W. 2011. Genetics of obesity and overgrowth syndromes. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* **25**:207-20
68. Saely CH, Geiger K, Drexel H. 2012. Brown versus White Adipose Tissue: A Mini-Review. *Gerontology* **58**:12-23
69. Sassi F, Devaun M. 2012. OBESITY UPDATE 2012. ed. OECD
70. Schutz K, Carle R, Schieber A. 2006. Taraxacum--a review on its phytochemical and pharmacological profile. *J Ethnopharmacol* **107**:313-23
71. Schutz K, Muks E, Carle R, Schieber A. 2006. Separation and quantification of inulin in selected artichoke (*Cynara scolymus* L.) cultivars and dandelion (*Taraxacum officinale* WEB. ex WIGG.) roots by high-performance anion exchange chromatography with pulsed amperometric detection. *Biomed Chromatogr* **20**:1295-303
72. Singla P, Bardoloi A, Parkash A. 2010. Metabolic effects of obesity: A review. *World J Diabetes* **15**:76-88
73. Socha P, Wierzbicka A, Neuhoff-Murawska J, Wlodarek D, Podlesny J, Socha J. 2007. Nonalcoholic fatty liver disease as a feature of the metabolic syndrome. *Rocz Panstw Zakl Hig* **58**:129-37
74. Spiegelman BM, Flier JS. 1996. Adipogenesis and obesity: rounding out the big picture. *Cell* **87**:377-89
75. Stumvoll M, Goldstein BJ, Va-Haeflten TW. 2008. Type 2 diabetes: pathogenesis and treatment. *Lancet* **371**:2153-6
76. Stunkard AJ, Harris JR, Pedersen NL, McClearn GE. 1990. The body-mass index of twins who have been reared apart. *N Eng J Med* **322**:1483-7
77. Vazquez-Vela ME, Torres N, Tovar AR. 2008. White adipose tissue as endocrine organ and its role in obesity. *Arch Med Res* **39**:715-28
78. Walley AJ, Asher JE, Froguel P. 2009. The genetic contribution to the non-syndromic human obesity. *Nat REv Genet* **10**:431.42
79. Waxman A. 2004. WHO global strategy on diet, physical activity and health. *Food Nutr Bull* **25**:292-302
80. WHO. Body mass index - BMI. <http://www.euro.who.int>
81. WHO. Obesidad. <http://www.who.int/topics/obesity/es/>

82. WHO. 2000. Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO Consultation. WHO Technical Report Series **894**
83. Wu Z, Bucher NLR, Farmer SR. 1996. Induction of peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  during the conversion of 3T3 fibroblasts into adipocytes is mediated by C/EBP $\beta$ , C/EBP $\delta$ , and glucocorticoids. *Mol Cell Biol* **16**:4128-36
84. Wu Z, Rosen ED, Brun R, Hauser S, Adelmant G, Troy AE, McKeon C, Darlington GJ, Spiegelman B. 1999. Cross-Regulation of C/EBP $\alpha$  and PPAR $\gamma$  Controls the Transcriptional Pathway of Adipogenesis and Insulin Sensitivity. *Molecular Cell* **3**:151-8
85. Wu Z, Xie Y, Morrison RF, Bucher NL, Farmer SR. 1998. PPAR $\gamma$  induces the insulin-dependent glucose transporter GLUT4 in the absence of C/EBP $\alpha$  during the conversion of 3T3 fibroblasts into adipocytes. *J. Clin. Invest* **101**:22-32
86. Yeh WC, Cao Z, Classon M, McKnight SL. 1995. Cascade regulation of terminal adipocyte differentiation by three members of the C/EBP family of leucine zipper proteins. *Genes Dev* **9**:168-81
87. Yun JW. 2010. Possible anti-obesity therapeutics from nature--a review. *Phytochemistry* **71**:1625-41
88. Zhang JW, Yoo S, Yoon HG, Park J, Lee YH, et al. 2010. In vitro and in vivo hepatoprotective effects of the aqueous extract from *Taraxacum officinale* (dandelion) root against alcohol- induces oxidative stresses. *Food Chem Toxicol* **48**

**Raquel Fernández Dacosta**

**MADRID**

**SEPTIEMBRE 2013**