



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ciencias Naturales
Licenciatura en Nutrición



**: EFECTO DE LA CORTISONA SOBRE LA EXPRESIÓN DE 11 β -
HIDROXIESTEROIDE DESHIDROGENASA 1 (11 β -HSD1) Y ACUAPORINA 7
(AQP7) EN CÉLULAS 3T3 L1.**

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de
Licenciado en Nutrición

Presenta:

Tania Paloma Quesada López

Dirigido por:

Dra. María Ofelia Mora Izaguirre

SINODALES

María Ofelia Mora Izaguirre

Presidente

Firma

Enrique Piña Garza

Secretario

Firma

Teresa Garcia Gasca

Vocal

Firma

Miriam Aracely Anaya Loyola

Suplente

Firma

Nombre y Firma

Director de la Facultad

Nombre y Firma

Director de
Investigación y
Posgrado

Centro Universitario
Querétaro, Qro.
Noviembre 2012
México

**A la fortaleza de mi vida,
mi familia que siempre está ahí para apoyarme.**

Agradecimientos

Quiero agradecer a mis padres y a mis abuelos por ser el ejemplo y el principal apoyo en la carrera de mi vida; por darme la oportunidad de crecer y aprender pero sobre todo por el amor y el cariño que siempre me han brindado. También quiero agradecer a mis hermanos, Abril y Joel, quienes con sus travesuras y bromas hacen de los días algo emocionante y diferente. Y al resto de la familia por las alegrías y buenos momentos que hemos vivido. A todos, gracias por su apoyo y por su aliento, los amo.

Así mismo quiero agradecer a la Dra. Ofelia Mora quien me ha brindado la oportunidad de aprender y crecer en su laboratorio y en el grupo de investigación. Doctora, muchas gracias por su ejemplo, por su apoyo, por los consejos y por creer en mí; es usted un gran ejemplo como mujer y como investigadora. Al Dr. Enrique Piña por abrir su mente y sus oídos a este proyecto, por transmitirme su pasión y sus conocimientos por la bioquímica, por guiarme en el camino de la investigación, por su apoyo y paciencia a lo largo de mi estancia en el laboratorio; sus conocimientos pero ante todo sus consejos los recordaré siempre. Al Dr. Armado Shimada por escuchar y aconsejar con paciencia, dar su punto de vista e invitarnos a preguntarnos más allá. A Lau por su enorme paciencia, por su disponibilidad, por ayudarme con los reactivos, accesibilidad, consejos y apoyo en el laboratorio; gracias Lau, por la ayuda en todos los experimentos, técnicas, dudas y consejos.

A la doctoras Tere Garcia Gasca y Aracely Anaya por haber sido excelentes profesoras y asesoras de tesis. Sin duda, sus clases me alentaron a seguir el camino de la investigación y la bioquímica, gracias por el ejemplo que dan en el aula y fuera de ella; Ara, gracias por apoyarme y acercarme al grupo de investigación de la Dra. Ofe. También quiero agradecer al resto de mis maestros de la licenciatura y a mis tutoras durante la carrera, Olga y Anita, por los conocimientos compartidos, la paciencia, la destreza, la entrega, los oídos y los

consejos. A la UAQ, en particular a la FCN, por haber sido mi casa de estudios y brindarme las posibilidades para crecer como universitaria.

Al Dr. Francesc Villarroya por darme la oportunidad de realizar una estancia de investigación en su laboratorio y grupo de investigación (Biología Molecular, Tejido Adiposo Marrón) en la Facultad de Biología de la Universidad de Barcelona.

A mis compañeros y amigos del laboratorio, Ana Pau, Dani, Elisa, Jonathan, Lau, Magda, Marianita, Martín, Nataly, Rosita, Sergio y Yumi; en verdad no tengo palabras para agradecer todo lo que he crecido a su lado. Gracias por compartir sus conocimientos, las técnicas, secretos, bromas, chistes, antojos y locuras... ¡ah, y el estrés (hablando de cortisona)!; por la paciencia y comprensión que han tenido conmigo y ser una gran familia ☺.

A Toño, mi mejor amigo y compañero, gracias por tu apoyo, por tu amor, por tratar de aprender algo de biología molecular mientras te cuento mi día, por dar risas y buenos ratos a mis días pero sobre todo por caminar de la mano conmigo en mi trayectoria de vida, aceptarla y disfrutar juntos de nuestros gustos y decisiones. Gracias por creer en mí y dar esas palabras de aliento, entusiasmo y optimismo.

A mis amigos de la licenciatura, en especial a Brenda, Felipe, Fer M, Norma, Roger, Sara y Sarai, quienes compartieron conmigo 5 años de tareas, risas, fiestas, desvelos, chistes, estrés, malos entendidos, foros, cursos de inducción, congresos, frustraciones, etc. ¡Gracias nutriólogos, por creer en mí y compartir esos momentos!

A mis amigos de la vida quienes están ahí en las buenas y en las malas, para festejar o para escuchar. Muchas gracias por compartir sus vidas y momentos especiales conmigo. Gracias por abrirme las puertas de sus vidas, por echarme porras cuando lo necesito y por escuchar con atención cuando trato de

explicar mis experimentos. En especial, quiero agradecer a Andrea, Ani Lau, Auryñ, Caro, Damián, Leamsy, Lucy y Polo porque han estado incondicionalmente escuchándome, aconsejándome y apoyándome.

Al laboratorio A03 del INB de la UNAM, en especial al Dr. Varela por permitirme entrar y trabajar en su laboratorio. A la unidad de proteogenómica, a la Dra. Anaid Antaramian y a Adriana Gonzalez, por facilitarme los equipos para realizar mis experimentos y consejos para el manejo de los protocolos.

Igualmente, quiero agradecer al CONACYT y al SNI por otorgarme la beca para continuar con mi trabajo de investigación y por los recursos que se le brindaron al laboratorio para la investigación.

Resumen

La obesidad es una enfermedad que se ha incrementado en la última década, ocupando México el primer lugar en prevalencia. Durante su desarrollo, diversos tejidos, entre ellos el tejido adiposo, presentan modificaciones que contribuyen a la fisiopatología del Síndrome Metabólico (SM). Normalmente, las células del tejido adiposo se encuentran expuestas a corticoesteroides (específicamente cortisona), sin embargo, en la obesidad y SM se encuentran cantidades incrementadas de su forma activa (cortisol), la cual se ha vinculado con la 11 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa1 (11 β -HSD1), enzima responsable de su activación. Así mismo, en la obesidad se disminuyen los niveles de Acuaporina 7 (AQP7), proteína relacionada con el transporte de glicerol. Motivo por el cual, el objetivo del presente estudio fue conocer el efecto de diferentes concentraciones de cortisona a través del tiempo sobre la expresión de 11 β -HSD1 y AQP7 en adipocitos diferenciados (línea 3T3 L1). Para ello, se aplicaron cuatro diferentes concentraciones de cortisona: 0, 0.1, 1 y 10 μ M durante 0, 5, 10, 15, 20 minutos y 48 horas. Al final del tratamiento se obtuvo el RNA total, se realizó una transcripción reversa y se midió por PCR de tiempo real la expresión de 11 β -HSD1 y AQP7 (gen endógeno, MnSOD). Los resultados indican que para la enzima 11 β -HSD1 la concentración más baja (0.1 μ M) y la más alta (10 μ M) disminuyeron su expresión, mientras que 1 μ M produjo un incremento significativo hacia los 10 minutos, para posteriormente disminuir su expresión ($P < 0.01$). Para AQP7, en la mayor concentración la expresión no fue detectable; en el caso de 0.1 y 1 μ M se observa un incremento significativo hacia los 5 minutos, una disminución en la expresión a los 10 minutos, un aumento a los 15 minutos para finalmente reprimirse a las 48 horas ($P < 0.01$). Se puede concluir que la cortisona tiene efecto sobre la expresión de 11 β -HSD1 y AQP7, siendo dependiente del tiempo y de la dosis, lo cual podría vincularse con los efectos negativos de los corticoesteroides sobre el metabolismo de las células adiposas en el SM.

Palabras clave: Células 3T3 L1, Síndrome Metabólico, cortisona, 11-HSD1, AQP7.

Abstract

In the last decade, obesity has increased considerably; Mexico is the country with the highest prevalence of this disease. During its development, several tissues, including adipose tissue, present cellular modifications that contribute to the physiopathology of the Metabolic Syndrome (MS). Under normal conditions, the cells in the adipose tissue are exposed to corticosteroids (specifically cortisone); however, in obesity and MS there is an increased amount of its active form (cortisol), which has been linked to the enzyme 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase 1 (11 β -HSD1), responsible of the hormone activation. Also, in obesity the amount of Aquaporin 7 (AQP7), protein related to glycerol transport, is decreased. The aim of this study was to describe the effect of different concentrations of cortisone over the expression of 11 β -HSD1 and AQP7 during time in differentiated adipocytes (3T3 L1 cell line). To accomplish this, four different concentrations of cortisone: 0, 0.1, 1 and 10 μ M were applied during 0, 5, 10, 15, 20 minutes and 48 hours. At the end of the treatment total RNA from the samples was obtained, reverse transcript was carried out and the expression of 11 β -HSD1 and AQP7 (housekeeping gene MnSOD) was quantified with quantitative PCR probes. The results suggest that for 11 β -HSD1, the lowest concentration (0.1 μ M) and the highest (10 μ M) diminished the expression while 1 μ M produced an increase at 10 minutes and a subsequent decrease in the expression ($P < 0.0001$). For AQP7, the expression was undetectable for the treatment with the highest concentration; but the treatments with 0.1 and 1 μ M produced an increase at the first five minutes of treatment, then a decay of the expression by 10 minutes, another increase by 15 minutes and finally a repression at 48 hours ($P < 0.0001$). It can be concluded that cortisone has an effect over the expression of 11 β -HSD1 and AQP7, time and dose dependent, response than can be linked with the negative effects of corticosteroids over adipocytes metabolism in MS.

Keywords: 3T3 L1 cells, Metabolic Syndrome, cortisone, 11-HSD1, AQP7.

ÍNDICE GENERAL

DEDICATORIAS	I
AGRADECIMIENTOS	II
RESUMEN	V
ABSTRACT	VI
ÍNDICE GENERAL	VII
ÍNDICE DE CUADROS	IX
ÍNDICE DE FIGURAS	X
ABREVIATURAS	XII
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	3
II.I Síndrome Metabólico	3
II.II Tejido adiposo	6
II.II.I Constitución del Tejido Adiposo	8
II.II.II El tejido adiposo blanco	9
II.II.III Adipocitos	10
II.II.IV Diferenciación de los adipocitos	12
II.II.V Lipogénesis y lipólisis	16
II.II.VI Tejido Adiposo en el Síndrome Metabólico	18
II.III Hormonas Esteroides	18
II.III.I Los corticoesteroides y el cortisol	19
II.III.II 11 β -HSD1	22
II.IV Acuaporinas (AQPs)	24
II.IV.I Las acuagliceroporinas y Acuaporina 7 o Acuaporina Adiposa (AQP7/AQPap)	26
III. HIPÓTESIS	29
IV. OBJETIVOS	29
V. METODOLOGÍA	30

V.I Cultivo Celular.	30
V.II Rojo Oleoso.	31
V.III Aplicación de los Tratamientos.	32
V.IV Extracción de ARN.	32
V.V Transcripción Inversa (RT).	33
V.VI PCR en tiempo real (qPCR).	34
V.VII Determinación de la glucosa en el medio.	35
V.VIII Determinación de glicerol en el medio.	36
V.IX Modelo Experimental y Análisis estadístico.	37
VI. RESULTADOS	38
VI.I Microscopía de los cambios morfológicos de los adipocitos.	38
VI.II Tinción de rojo oleoso.	39
VI. III Fotografías de gel de agarosa.	40
VI.IV Expresión relativa de la enzima 11 β -HSD1 y la proteína AQP7.	40
VI.V Cuantificación de la glucosa y glicerol para el control y el tratamiento 1 μ M.	44
VII. DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN	46
VIII. PERSPECTIVAS	55
IX. REFERENCIAS	56

Índice de Cuadros

Cuadro 1. Definiciones de Síndrome Metabólico	4
Cuadro 2. Modelos celulares <i>in vitro</i> para el estudio de la diferenciación adipocitaria.	11
Cuadro 3. Elementos participantes en la diferenciación adipocitaria.	15
Cuadro 4. Conformación de los medios de diferenciación del adipocito.	30
Cuadro 5. Secuencias de los oligonucleótidos utilizados en la qPCR.	35

Índice de Figuras

Figura 1. Prevalencia de sobrepeso y obesidad, según grupo d edad y sexo.	6
Figura 2. Prevalencia de sobrepeso y obesidad en niños enre 5 y 11 años.	6
Figura 3. Prevalencia d sobrepeso y obesidad en niños entre 12 y 19 años.	6
Figura 4. Conformación celular del tejido adiposo.	7
Figura 5. Morfología del tejido adiposo blanco y marrón.	8
Figura 6. Desarrollo de los adipocitos.	10
Figura 7. Regulación transcripcional de la diferenciación de la línea celular 3T3 L1.	16
Figura 8. El colesterol y sus derivados esteroides.	19
Figura 9. Eje Hipotálamo-Hipófisis-Adrenales (HHA) en la síntesis de corticoesteroides.	20
Figura 10. Mecanismo de acción de las hormonas corticoesteroides.	21
Figura 11. Acción de las enzimas 11 β -HSD1 y 11 β -HSD2.	23
Figura 12. Estructura de las acuaporinas.	26
Figura 13. La familia de acuaporinas.	26
Figura 14. Mecanismo de regulación de AQP7 durante el ayuno o respuesta a estrés.	28
Figura 15. Gel de Agarosa para RNA..	32
Figura 16. Gel de Agarosa para Retrotranscripción.	33
Figura 17. Cambios morfológicos de células 3T3 L1 tras la diferenciación y después de un tratamiento de 48 horas con concentraciones de 0, 0.1, 1 y 10 μ M de cortisona.	39
Figura 18. Imagen al microscopio electrónico con 5 amentos de la tinción con rojo oleoso.	40

Figura 19. Expresión relativa del gen de 11 β -HSD1 en células 3T3 L1 por efecto de la adición de diferentes niveles de cortisona. 41

Figura 20. Expresión relativa del gen de 11 β -HSD1 en células 3T3 L1 por efecto de la adición de diferentes niveles de cortisona. 42

Figura 21. Expresión relativa del gen de AQP7 en células 3T3 L1 por efecto de la adición de diferentes niveles de cortisona. 43

Figura 22. Expresión relativa del gen de AQP7 en células 3T3 L1 por efecto de la adición de diferentes niveles de cortisona. 44

Figura 23. Cambios en la concentración de glucosa en el medio extracelular de las células 3T3 L1 por efecto de la adición de cortisona. 45

Figura 24. Cambios en la concentración de glucosa en el medio extracelular de las células 3T3 L1 por efecto de la adición de cortisona. 45

Figura 25. Cambios en la concentración de glicerol en el medio extracelular de las células 3T3 L1 por efecto de la adición de cortisona. 46

Figura 26. Cambios en la concentración de glicerol en el medio extracelular de las células 3T3 L1 por efecto de la adición de cortisona. 46

Abreviaturas

11β-HSD1	11 β -Hidroxiesteroide Deshidrogenasa1
ACC	Acetil coenzima A carboxilasa
ACTH	Hormona adenocoticotropina
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ADP	Adenosin difosfato.
ARN	Ácido Ribonucleico
ATGL	Triacilglicerol Lipasa Adiposa
ATP	Adenosina trifosfato
ATP III	Programa Nacional de Educación en Colesterol
AQPs	Acuaporinas
AQP7/AQPap	Acuaporina 7 o acuaporina adiposa
BMAL1	Proteína similar a ARNT reguladora circadiana de cerebro y músculo.
BMP	Proteínas morfogénicas óseas
cADN	ADN complementario
cAMP	Adenosina 5'-monofosfato cíclico
CDK	Quinasa dependiente de ciclina
C/EBP	Proteína de unión a CCAAT/enhancer
CREB	Elemento de unión a la respuesta del cAMP.
CRH	Hormona Liberadora de Corticotropina
DHAP	Dihidroxiacetona fosfato
DM2	Diabetes Mellitus Tipo 2
DMEM	Medio Eagle Modificado por Dulbecco
dNTPs	Deoxinucleótidos trifosfato
EAC	Enfermedad Arterial Coronaria
ECM	Expansión Clonal Mitótica
ECN-1	Corteza Ectodermoneural-1
ECV	Enfermedad Cerebrovascular
ENSANUT	Encuesta Nacional de Salud y Nutrición
EPAS1	Domino-PAS proteico-endotelial 1.
EVC	Células estroma-vasculares
FABP	Proteína de union a ácidos grasos
Familia WNT	Familia de proteínas señalizadoras de la membrana al núcleo.
FAS	Ácido graso sintasa
FGF	Factor de crecimiento fibroblástico
FOXA	<i>Forkhead Box A1</i>
FOXO	<i>Forkhead Box O1</i>
GATA	Factor de transcripción capaz de unirse a GATA
GLUT-4	Transportador de glucosa de tipo 4
GlyK	Glicerol quinasa
GRE	Elemento de respuesta a glucocorticoides.
HATs	Aciltransferasas de histonas
HDACs	Desacetilasas de histonas

HDL	Lipoproteínas de alta densidad
HPA	Eje hipotálamo-hipófisis-suprarenales
HSL	Lipasa sensible a hormonas
IBMX	Isobutilmetilxantina
IDF	Federación Internacional de Diabetes
IGF-1	<i>Insulin-like growth factor 1</i>
IL	Interleucina
IMC	Índice de masa corporal
IRS	Sustrato Del receptor de insulina
KLF	Factor parecido a Kruppel
LPL	Lipoproteína lipasa
MAPK	Proteína quinasa mitógeno-activadora
mARN	ARN mensajero
MGL	Monoglicerol lipasa
miARN	Micro ARN
MnSOD	Superoxido Dismutasa dependiente de Manganeseo
MSCs	Células Troncales Mesenquimales
NADH	Dinucleótido de nicotinamida adenina, forma reducida
NEFAs	Ácidos grasos no esterificados
OMS	Organización Mundial de La Salud
PA	Presión Arterial.
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PEPCK	Fosfoenolpiruvato carboxiquinasa
PGC-1α	Coactivador del receptor activado por proliferadores peroxisomales γ -1 α
PKA	Proteína quinasa A
PKC	Proteína quinasa C
PPAR-γ	Receptor activado por proliferadores peroxisomales gamma
Pref-1	Factor del preadipocito 1
P/S	Penicilina/estreptomicina
rcf	<i>Relative centrifuge force</i>
RI	Resistencia a La Insulina
qPCR	Reacción en cadena de polimerasa cuantitativa (tiempo real)
SC	Síndrome de Cushing
SFB	Suero fetal bovino
SIRT	Sirtuina
SM	Síndrome Metabólico
SMAD3	<i>Mothers against decapentaplegic homolog 3.</i>
SREBP	Elemento de unión a La proteína reguladora de esteroles.
SWI/SNF	Complejo remodelador de nucleosomas <i>SWItch/Sucrose Non Fermentable</i>
Sybr	Fluoróforo comúnmente utilizado en la prueba de qPCR.
TA	Tejido adiposo
TAB	Tejido adiposo blanco
TAF8	Factor de unión a proteínas asociadas a TATA.

TAG	Triacilglicéridos
TAM	Tejido adiposo marrón
TAZ	Coactivador transcripcional con motivo de unión a PDZ.
TGFβ	Factor de crecimiento transformante β
TNFα	Factor de necrosis tumoral alfa
TRα1	Receptor de tiroides α 1
TRAP220	Proteína de unión a PPAR.

I. Introducción

El desarrollo de diferentes patologías metabólicas, incluido el denominado Síndrome Metabólico (SM) que se caracteriza por la resistencia a la insulina (RI), incremento en la grasa del cuerpo (visceral principalmente) y algunas cardiopatías (Morales-Villegas *et al.*, 2006) se ha ubicado como la pandemia de la actualidad. Existe un incremento en paralelo de la frecuencia de obesidad y SM tanto a nivel mundial como nacional (García-García, 2008). Por esta razón, y por ser factores de riesgo importantes para el desarrollo de diferentes patologías metabólicas, como la Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2), la enfermedad arterial coronaria y cerebrovascular por aterosclerosis, se ha optado por estudiar ambas condiciones a la par, es importante considerar que no debiesen estudiarse con una perspectiva limitada ya que son condiciones complementarias entre sí (García-García, 2008). Por ello, es necesario estudiar los cambios y efectos que se presentan en algunas características del tejido adiposo durante el desarrollo y en la enfermedad y poder diseñar mejores estrategias de prevención y tratamiento (Fantuzzi *et al.*, 2007).

Es importante mencionar que dichas enfermedades han comenzado a detectarse desde edades tempranas conduciendo a complicaciones en la salud con alto impacto. México ocupa el segundo lugar a nivel mundial en obesidad de adultos y de niños y el primer lugar en diabetes infantil, esta condición no solo compromete la calidad de vida del individuo, también afecta el entorno familiar y social llegando a afectar, incluso, la productividad y eficiencia en el manejo de recursos del estado enfocados a la salud (Olaiz-Fernández *et al.*, 2006; UNICEF, 2011).

El tejido adiposo juega un papel importante en la regulación y mantenimiento del metabolismo energético del individuo; anomalías en la regulación de su funcionamiento pueden conducir a una excesiva acumulación de grasa e incluso a un catabolismo mal regulado en situaciones de carencia. Se ha reportado que las hormonas de respuesta al estrés contribuyen en la regulación

del metabolismo del tejido adiposo, en específico se ha vinculado a las hormonas corticoesteroides con la hipertrofia e hiperplasia de los adipocitos (Campbell *et al.*, 2010). La activación y acción de las hormonas corticoesteroides controlan el metabolismo celular, incluso se ha relacionado el incremento en la concentración sanguínea y celular de estas hormonas con el desarrollo de la DM2 (Peckett *et al.*, 2011). La acción se ve regulada por enzimas de activación como es el caso de la enzima reductora 11 β -Hidroxiesteroide Deshidrogenasa 1 (11 β -HSD1) que reduce la cortisona a cortisol haciéndola activa y desencadenando los efectos metabólicos correspondientes (Campbell *et al.*, 2010).

Por otro lado, la degradación de triglicéridos en el tejido adiposo conduce a la liberación de ácidos grasos libres y glicerol al medio extracelular. El glicerol sale de la célula por un canal de transporte denominado acuaporina 7 (Aqp7). Esta acuaporina contribuye a la movilización tanto de agua como de glicerol para su uso en la gluconeogénesis y otras vías metabólicas (Maeda *et al.*, 2004). Aunado a las anomalías hormonales reportadas en la obesidad y el síndrome metabólico, también se reporta una disminución de la Aqp7 en el tejido adiposo (Hibuse *et al.*, 2005; Maeda *et al.*, 2008).

La presente investigación expone los cambios en la expresión de la enzima 11 β -HSD1 y la proteína Aqp7 en respuesta a diferentes concentraciones de cortisona como contribución a un posible esclarecimiento de los mecanismos fisiopatológicos que contribuyen en el desarrollo del Síndrome Metabólico.

II. Revisión de la literatura

II.I. Síndrome Metabólico

El Síndrome Metabólico fue descrito por primera vez por Himsworth en 1939, él lo describió como un síndrome caracterizado por una RI y obesidad, principalmente visceral. Fue él quien manifestó por primera vez que la RI era el antecedente de la DM2 y diversas complicaciones metabólicas (Muñoz-Calvo, 2007).

La obesidad y el síndrome metabólico son situaciones complejas producto de diversos factores dentro de los que destacan la genética, el ambiente y el estilo de vida. En los últimos años la frecuencia de dichas condiciones ha incrementado proporcionalmente en México y en el mundo. La relevancia epidemiológica del incremento de ambas condiciones es que aumentan el riesgo de desarrollo de condiciones cardiometabólicas que ponen en riesgo la salud y la vida. Dentro de las condiciones que se desencadenan se encuentran la DM2 y la aterosclerosis, causante de enfermedad arterial coronaria (EAC) y cerebrovascular (ECV), principales causas de muerte en el país, lo cual los convierte en el principal problema de salud pública.

En México, el grupo académico para el estudio, la prevención y el tratamiento de la obesidad y el síndrome metabólico de la Comisión Coordinadora de los Institutos Nacionales de Salud, Hospitales Federales de Referencia y Hospitales de Alta Especialidad indica que la obesidad es el parámetro más constante en el diagnóstico del SM (según los criterios en el cuadro 1); la obesidad es el resultado del desequilibrio entre la incorporación de energía y su utilización, resulta en un balance positivo y una ganancia de peso y es en sí misma un riesgo para la salud debido a su implicación en el conjunto de anomalías metabólicas características del SM. La mayoría de los individuos obesos experimentan SM por ello se ha llegado a catalogar como una de sus co-morbilidades (García-García, 2008; Rodríguez de la Concepción, 2004).

Cuadro 1.Definiciones de Síndrome Metabólico.

En la población adulta:

Organización Mundial de la Salud (OMS)

Dos o más de los siguientes criterios:

- Hipertensión Arterial (140/90)
- Hipertrigliceridemia (>150 mg/dL) y/o colesterol HDL<35 mg/dL en hombres o <40 en mujeres
- Microalbuminuria>20 µg/min
- Obesidad: IMC >29.9 kg/m² y/o relación cintura/cadera elevada (hombres >0.9, mujeres >0.85)
- Más de la presencia de una se las siguientes condiciones: Diabetes tipo 2, intolerancia a la glucosa o resistencia a la insulina (insulina de ayuno >percentil 75 de la población en estudio).

Programa Nacional de Educación en Colesterol (ATP III)

Tres o más de las siguientes condiciones:

- Obesidad: Perímetro de cintura > 88 cm en mujeres y > 102 cm en hombres.
- Hipertrigliceridemia: >150 mg/dL
- Colesterol HDL bajo: <40 mg/dL en hombres y <50 mujeres
- Hipertensión arterial: 130/85 mmHg o diagnóstico previo
- Diabetes o glucosa anormal de ayuno: 100 mg/dL.

Federación Internacional de Diabetes (IDF)

- Obesidad central: perímetro de cintura >94 cm en hombres y >80 cm en mujeres (de origen europeo); con valores de especificidad étnica para otros grupos. Además, dos de los siguientes cuatro factores:
- Hipertrigliceridemia: >150 mg/dL [1.7mmol/L], o tratamiento específico para esta anormalidad.
- Colesterol HDL bajo: (<40 mg/dL [1.0 mmol/L] en hombres y <50 mg/dL [1.3 mmol/L] en mujeres o tratamiento específico para esta anormalidad.
- Presión arterial alta: sistólica >130 o diastólica >85 mm Hg o tratamiento para hipertensión previa.
- Diabetes previa o glucosa anormal en ayuno >100 mg/dL [5.6 mmol/L]. Si la glucosa en ayuno es superior a 5.6 mmol/L o 100mg/dL, se recomienda una carga de tolerancia a la glucosa oral aunque no es necesaria para definir la presencia del síndrome.

En población pediátrica:

Federación Internacional de Diabetes (IDF)

- Obesidad: IMC mayor a la centila 95 para una población dada. Además dos o más de los siguientes criterios:
- Pre púberes: Cintura mayor a la centila 90
- Púberes: Cintura mayor a ala centila 90
- Triglicéridos > a centila 90

- HDL-C <a la centila 10
- PA > 130/85
- Glucosa en ayuno >100 mg/dL
- Pos púberes:
- Cintura > 94 cm en hombres
- Cintura > 80 cm en mujeres
- HDL < 40mg/dL en varones
- HDL < 50 mg/dL en mujeres
- PA > 130/85
- Glucosa en ayunas > 100 mg/dL

La encuesta más reciente que evalúa la prevalencia de la obesidad en México es la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2006 (ENSANUT, 2006) en donde se observó un aumento del 12% en la prevalencia del sobrepeso y obesidad del año de 1999 al 2006. Actualmente se considera que aproximadamente el 70% (mujeres 71.9%, hombres 66.7%) de la población mexicana adulta se encuentra en esta condición y el 26 % de los niños entre 5 y 11 años (26.8% niñas, 25.9% niños, evidenciando un aumento de un tercio desde 1999); en el caso de la población de 12 a 19 años un tercio de la población presentó sobrepeso u obesidad(Olaiz-Fernández *et al.*, 2006).

Se considera que el 75% de la mortalidad de los adultos en América Latina se debe a enfermedades crónicas ligadas a la obesidad. El impacto que ha tenido esta enfermedad sobre la macroeconomía mundial se debe a que la mayoría de los portadores de esta condición conforman la población económicamente activa teniendo consecuencias socioeconómicas y de calidad de vida. (Garcia-Garcia *et al.*, 2008). Las figuras 1, 2 y 3 muestran la distribución del sobrepeso y obesidad en diferentes grupos de edad según la ENSANUT 2006 (Olaiz-Fernández *et al.*, 2006).

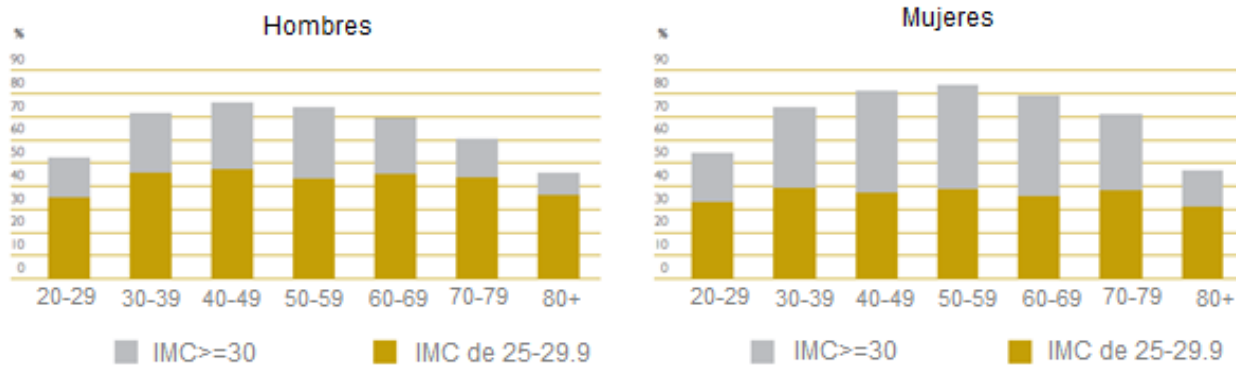


Figura 1. Prevalencia de sobrepeso y obesidad, según grupo de edad y sexo. (México, ENSANUT, 2006.)

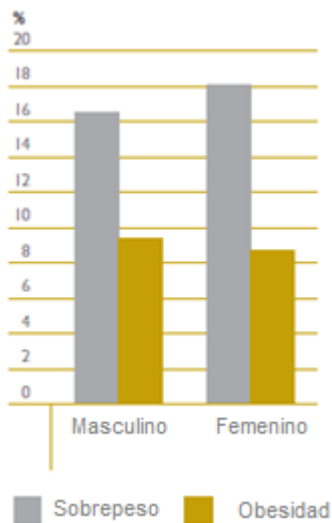


Figura 2. Prevalencia de sobrepeso y obesidad en niños de entre 5 y 11 años (México, ENSANUT, 2006.)

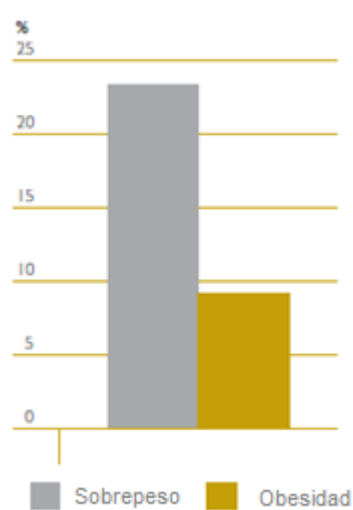


Figura 3. Prevalencia de sobrepeso y obesidad en niños de entre 12 y 19 años (México, ENSANUT, 2006.)

II.II Tejido Adiposo

El tejido adiposo se había considerado únicamente como un depósito de energía inerte e 'inofensivo' para el organismo. Fue hasta el momento en el que se vinculó su existencia con el desarrollo de diferentes patologías metabólicas que comenzó a estudiarse con mayor profundidad. A partir de ello dejó de considerarse solo como un almacén y se comenzó a considerar como un tejido

con actividad de gran impacto en el estado nutricional del individuo, su desarrollo e incluso su reproducción (Ailhaud, 2001).

Por lo tanto, el tejido adiposo se ha identificado como un tejido altamente especializado que almacena la energía en forma de triglicéridos y los libera cuando existe demanda. Tiene diferentes ubicaciones anatómicas con diferentes funciones cada una de ellas. Así mismo, en un individuo puede tener diferentes proporciones que van desde el 20% de la masa total hasta un 70% en sujetos con obesidad severa (Fantuzzi y Mazzone, 2007).

Es un tejido sumamente heterogéneo, se calcula que únicamente un tercio del tejido adiposo comprende adipocitos maduros y el resto consta de células troncales mesenquimales (MSCs), células T reguladoras, células precursoras endoteliales, macrófagos y preadipocitos en varias etapas de la diferenciación (Figura 4). La plasticidad que lo caracteriza se debe a la capacidad de los preadipocitos para proliferar y diferenciarse en adipocitos maduros durante toda la vida. (Dani y Billon, 2012). Sin embargo, contrario a lo que se ha venido pensando por mucho tiempo, existe recambio celular en el tejido adiposo. Un estudio realizado con ^{14}C estableció al tejido adiposo como una población de células bastante dinámica y regulada; se estipula que alrededor del 50% de los adipocitos de humano se reemplaza cada 8 años. Por ello se considera que el cambio en el tamaño del tejido no solo depende del tamaño celular sino también de la cantidad de células diferenciadas. (Spalding *et al.*, 2008).

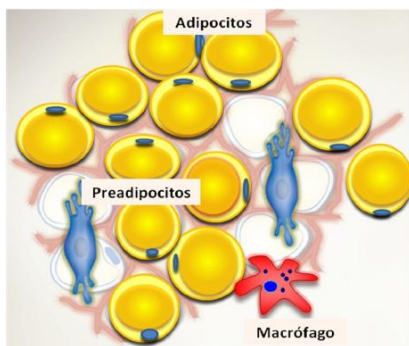


Figura 4. Conformación celular del tejido adiposo. (Wellen y Hotamisligil, 2003)

II.II.I Constitución del Tejido Adiposo

El tejido adiposo se divide en dos tipos, el tejido adiposo blanco (TAB) y el tejido adiposo marrón (TAM), ambos tienen un origen mesenquimático común, con vínculos embriológicos e histológicos que se han adaptado a requerimientos del organismo, y poseen la capacidad de metabolizar y a almacenar lípidos, sin embargo tienen diferentes funciones. La diferencia entre ambos tejidos va más allá de la coloración. El TAB es el tejido que funge como el principal almacén de energía y se ha demostrado que lleva a cabo un gran número de funciones endócrinas que regulan el metabolismo intermedio. Las células que lo conforman se caracterizan por ser uniloculares, es decir que poseen una sola gota de grasa, y con los organelos distribuidos en la periferia de la célula. Por su parte, el TAM desempeña una función termogénica y quizá de amortiguación de ingresos energéticos excesivos, las células que lo conforman se caracterizan por tener gotas de grasa multiloculares y una gran cantidad de mitocondrias (Figura 5). (Dani y Billion, 2012; Montero, 2000; Moreno-Navarrete y Fernández-Real, 2012; Nicholls y Locke, 1984, Rodríguez de la Concepción, 2004)

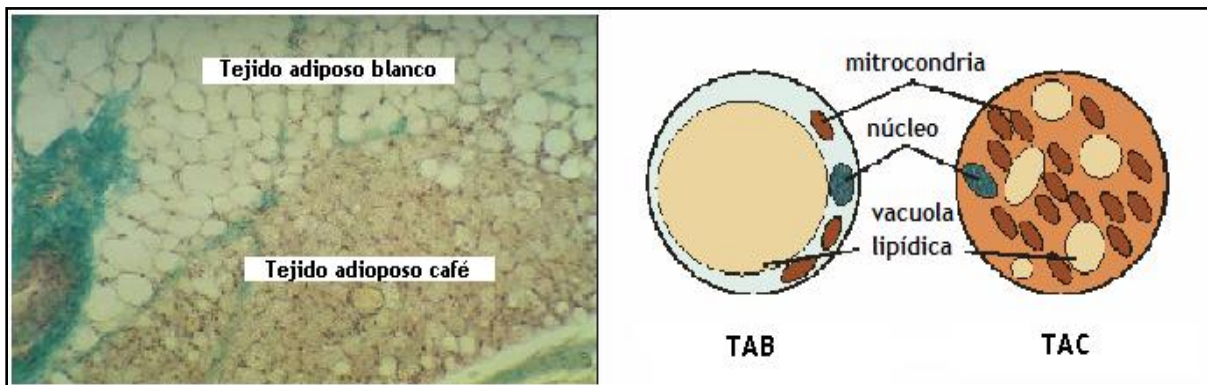


Figura 5. Morfología de tejido adiposo blanco y marrón (Cinti, 1999).

II.II.II El Tejido Adiposo Blanco

A lo largo de la evolución, los organismos han adquirido la capacidad de almacenar la energía para ser utilizarla en periodos de carencia. Como se mencionó anteriormente, el TAB es el principal almacén de energía en el organismo y se encuentra principalmente vinculado la actividad metabólica y endócrina (autócrina y parácrina) repercutiendo en el desarrollo de diferentes patologías de carácter metabólico. (Dani y Billion, 2012; Montero, 2000)

El TAB se compone principalmente de adipocitos maduros y células estroma-vasculares (EVC) dentro de las cuales se incluyen células del sistema inmunológico, endoteliales, precursoras de adipocitos, fibroblastos y neurocitos. Los adipocitos son las unidades del tejido capaces de almacenar, y en caso de ser necesario, degradar los triacilglicéridos (TAG) y formar ácidos grasos ya que cuentan con las enzimas lipolíticas y las lipogénicas necesarias (Montero, 2000).

Se estima que un adipocito tienen la capacidad de almacenar hasta 1.2 μg de TAG sin embargo en un individuo sano se almacena entre 0.4 y 0.6 μg de TAG por adipocito. Una vez alcanzado un tamaño crítico, que varía considerablemente debido a la capacidad elástica y de adaptación de la membrana citoplasmática de dichas células, se promueve la proliferación adipocitaria dependiente de la regeneración de un cúmulo de precursores de adipocitos, los preadipocitos, que permanecen presentes en el tejido como se muestra en la figura 6. La importancia metabólica del tejido se ha comprobado con la gran irrigación que presenta, incluso se estima que es superior a la presente en el tejido muscular pues cada adipocito tiene contacto con algún capilar. (Dani y Billion, 2012; Montero, 2000).

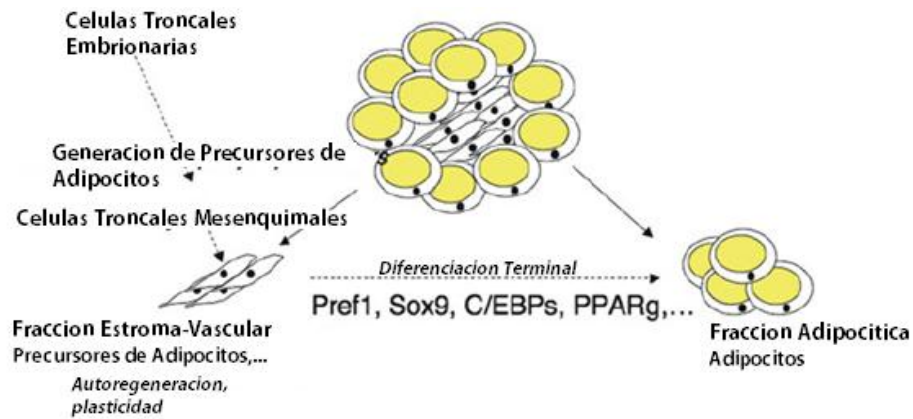


Figura 6. Desarrollo de los adipocitos. (Dani y Billion, 2012)

Aunado a estas condiciones, el tejido adiposo es un órgano de importante actividad hormonal ya que responde a diferentes hormonas y péptidos en el mantenimiento del metabolismo mediante el anabolismo y catabolismo de su contenido lipídico. Algunos órganos blanco de los productos de la lipólisis llevada a cabo por el TAB son el riñón, el hígado, el miocardio y el músculo esquelético durante el ayuno o el incremento en las demandas energéticas (Pérez-Miguelsanz *et al.*, 2010).

II.II.III Adipocitos

Los adipocitos son la unidad 'funcional' del tejido adiposo; se derivan de células troncales multipotentes (capaces de diferenciarse a adipocitos, condrocitos, osteoblastos y miocitos). La célula adiposa posee una gran actividad metabólica y hormonal ya que responde a las señales hormonales producidas en otras partes del cuerpo y ella posee la capacidad de producir hormonas con actividad autócrina, endócrina y parácrina.

El proceso de diferenciación adipocitaria y el estudio de su relación con procesos patológicos han sido ampliamente estudiados utilizando modelos celulares *in vitro* brindando información relevante de la actividad celular adiposa. Las líneas más utilizadas pueden ubicarse en tres categorías: las células

embrionarias totipotenciales, las células multipotentes y las células previamente comprometidas a la línea adiposa (la descripción detallada se encuentra en el cuadro 2). Respecto a las células previamente comprometidas, se han utilizado las líneas 3T3L1 (utilizadas en el presente estudio) y 3T3-F442A. Dichas líneas han sido aisladas por clonaje desde células derivadas de ratones Swiss 3T3 y han sido ampliamente utilizadas para el estudio del comportamiento adiposo. (Ailhaud y Hauner, 1998; Moreno-Navarrete y Fernández- Real, 2012; Torres, 2009).

Cuadro 2. Modelos celulares <i>in vitro</i> para el estudio de la diferenciación adipocitaria.			
Líneas celulares	Origen/especie	Inductores de la diferenciación	Categoría
ES	Blastocitos/Embrión ratón	Acido retinoico	Totipotente
TAI	Fibroblastos 10 T1/2 tratados con 5-azacitidina/Embrión ratón	10% SFB, insulina, dexametasona	Multipotente
3T3-L1	Fibroblastos/Embrión ratón	10% SFB, insulina, dexametasona, IBMX.	Unipotente
3T3-F442A	Fibroblastos/Embrión ratón	10% SFB, insulina	Unipotente
Ob17	Grasa epididimal/ratón ob/ob adulto	8% SFB, insulina, triyodotironina	Unipotente
Cultivos primarios	Origen	Inductores de la diferenciación	Categoría
Rata	Células estroma vasculares de grasa subcutánea, epididimal, retroperitoneal	Insulina con o sin SFB	Unipotente
Ratón	Células estroma vasculares de grasa subcutánea y perirrenal	Insulina, HDL, Dexametasona	Unipotente
Cerdo	Células estroma vasculares de grasa subcutánea y perirrenal	Insulina con o sin glucocorticoides	Unipotente
Humano	Células estroma vasculares de grasa subcutánea y omental	Insulina y glucocorticoides	Unipotente
SFB: Suero fetal bovino; IBMX: Isobutilmetilxantina; HDL: Lipoproteína de alta densidad (obtenido de Agüeros, 2009).			

II.II.IV Diferenciación de los adipocitos.

Las unidades del tejido adiposo deben encontrarse en las condiciones adecuadas para que se lleve a cabo la diferenciación. Este proceso ha sido ampliamente estudiado en los últimos años y va desde el compromiso de la célula mesenquimal hacia el fenotipo adiposo hasta la diferenciación terminal. Es un proceso perfectamente bien regulado que involucra cascadas de señalización mediadas por factores de transcripción, proteínas reguladoras del ciclo celular que regulan la expresión génica y que llevan al desarrollo del adipocito, entre otras cosas. El proceso en conjunto se ha estudiado a detalle en modelos *in vitro* que facilita el control de las variables y condiciones. La plasticidad del tejido durante todo el ciclo de vida se debe a la alta capacidad proliferativa y de diferenciación; el proceso de incremento en el número de células puede deberse al incremento de la diferenciación de los preadipocitos o a la de-diferenciación seguida de una proliferación y re-diferenciación (Moreno-Navarrete y Fernández- Real, 2012).

Como ya se había mencionado la diferenciación consta de dos fases, la fase de determinación y la fase terminal de diferenciación. La primera comprende el compromiso de la célula mesenquimal hacia el linaje adiposo mientras que la segunda se refiere a la cascada de señalización necesaria para obtener un adipocito maduro con acumulación lipídica. La cascada se lleva a cabo con la activación e inactivación de diversos factores de transcripción y proteínas que desencadenan diferenciación. El proceso comienza con un cambio morfológico de la célula que se logra con el incremento de la proteína ECN-1 (Corteza Ectodermoneural-1) la cual se une a la actina, reorganiza el citoesqueleto y modifica la morfología fibroblástica para adoptar una forma esférica. El ARN mensajero (mARN) de esta proteína se incrementa de 8 a 12 veces al inicio de la diferenciación (durante las primeras 12 horas) desencadenando la cascada de plasminógeno que favorece el cambio morfológico y la expresión de genes específicos del adipocito y de lipogénesis como PPAR- γ (receptor activado por

proliferadores peroxisomales gamma) y C/EBP α (proteína de unión al promotor/CCAAT- α) (Gregoire *et al.*,1998; Rodríguez de la Concepción, 2004; Zhao *et al.*, 2000).

La diferenciación experimental *in vitro* se lleva a cabo con un coctel 'hormonal' (generalmente consiste en isobutilmetilxantina (IBMX), dexametasona e insulina) una vez que los preadipocitos han alcanzado la confluencia necesaria. Entonces, las células preadiposas permanecen en un arresto del crecimiento y al administrar el coctel hormonal vuelven a entrar en uno o dos ciclos de mitosis postconfluencia, esto se conoce como Expansión Clonal Mitótica (ECM). A la par de este proceso, se desencadena una respuesta que provoca un incremento drástico en la expresión de C/EBP- β y C/EBP- δ durante las primeras 24 horas. Cuando la célula pasa de la fase G1 a la fase S del ciclo celular estas isoformas de C/EBP se hiperfosforilan activando a la glicógeno sintasa quinasa 3B y la proteína quinasa mitógeno-activadora (MAPK) quienes inducen la expresión de PPAR- γ y C/EBP α , reguladores clave de la diferenciación adiposa. Ambos factores inician un mecanismo de retroalimentación positiva que provoca un incremento en su expresión y acumulación del mensajero. C/EBP α es una proteína que forma parte de la familia de factores de transcripción bZIP capaz de unirse al ADN y transactivar genes característicos del adipocito diferenciado como son GLUT4, PEPCK y el receptor a insulina. Así mismo, durante la diferenciación C/EBP α se fosforila con la ciclina D3 inhibiendo la proliferación celular y comprometiendo a la célula a iniciar la etapa final de la diferenciación (Farmer, 2006; Ramji y Foka, 2002;Rodríguez de la Concepción, 2004; Tang *et al.*, 2005).

Por su parte, PPAR- γ funge como un factor de transcripción que forma parte de la familia de los receptores nucleares. Estos receptores nucleares son proteínas que pueden regular la transcripción génica reclutando enzimas que modifican histonas y alterando el estatus de la actividad transcripcional de la cromatina permitiendo o inhibiendo la transcripción de determinados genes. (Astapova y Leff, 2010; Chawla *et al.*, 2001; Sanhueza y Valenzuela, 2006).PPAR-

y se ha considerado como el regulador clave de la adipogénesis ya que la expresión de éste en sí mismo puede promover la diferenciación contrario a lo que ocurre con C/EBP α que solo la inducirá en presencia de PPAR- γ . Sin embargo la activación de los genes subsecuentes en la cascada de señalización para la adipogénesis es responsabilidad de ambos y se requiere la expresión de C/EBP α para brindar sensibilidad del adipocito hacia la insulina.. (Rosen y Spigleman, 2002; Tontonoz *et al.*, 1994; Wu *et al.*, 1999).

Otra cascada de señalización que se ha identificado es por parte de los KLFs (factores parecidos a Kruppel) que son una familia de proteínas reguladoras de diversos procesos celulares y que han demostrado tomar parte en la diferenciación del adipocito, tales como KLF6, KLF9 y KLF15. Por el contrario, KLF2 y KLF7 parecen tener actividad represora de la diferenciación (Moreno-Navarrete y Fernández- Real, 2012). El cuadro 3 contiene información de algunos agentes que participan en la diferenciación y algunos que pudiesen fungir como represores de la misma y la figura 7 ilustra la cascada de señalización en orden cronológico durante la diferenciación.

Cuadro 3. Elementos participantes en la diferenciación adipocitaria. (Recopilación de Moreno-Navarrete y Fernández-Real, 2012y Rodríguez de la Concepción, 2004).

Tipo de elemento	Pro diferenciación	Represor de la diferenciación
Factores de Transcripción	SREBP1c CREB EPAS1 BMAL1	FOXO1 FOXA2 GATA2 GATA3
Cofactores transcripcionales	HATs SWI/SNF TRAP220 TAF8 CDK6 CDK4	Ciclina D1 TAZ HDACs (y reclutadores, SIRT1) Corepresores y silenciadores de los receptores de retinoides y hormonas tiroideas.
Regulación Extranuclear	IGF1, IRS y cascadas de señalización de insulina. Hormonas tiroideas (T3-TR α 1) Mineralocorticoides MAPK (ERK1, p38) Agonistas de PPAR y FGF α (1,2 y 10)	Hormonas tiroideas (T3-TR α 2) Familia Wnt (WNT10b) β -catenina TGF β SMAD3 BMP4, BMP2 Pref-1 TNF α , IL1, IL6 e IL11 Tratamiento HIV (nelfavir y indinavir) Metformina Ácido Retinóico
Factores Epigenéticos	La metilación y desmetilación del DNA a lo largo del proceso de diferenciación puede ser determinante para la diferenciación.	
miARNs	Existen pequeños ARNs que pueden fungir como reguladores de los procesos metabólicos, actualmente se han identificados algunos que forman parte de la diferenciación como miR-143, miR-103, miR-107, miR-143, miARN378/378 quienes promueven adipogénesis y miR-222 y miR-221 que al parecer la inhiben. Se han descrito cerca de 70 miARNs involucrados en la diferenciación e incluso en enfermedades metabólicas.	
Genes cronobiológicos	Se ha comenzado a investigar la participación de genes reloj en la diferenciación y lipogénesis.	

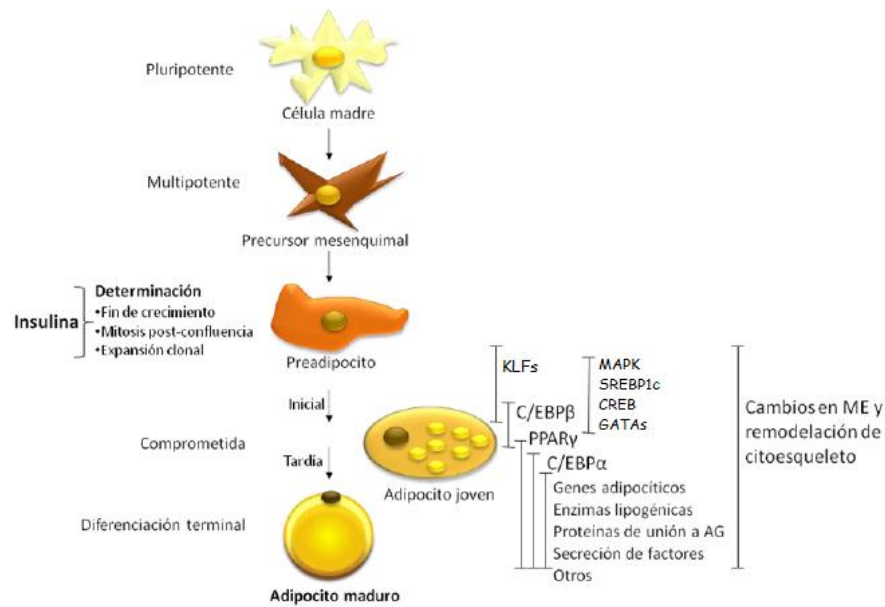


Figura 7. Regulación transcripcional de la diferenciación de la línea celular 3T3 L1 (Modificado de Gregoire *et al.*, 1998).

II.II.V Lipogénesis y lipólisis

Debido a su papel como reserva energética, el tejido adiposo cuenta con una maquinaria especializada en el ensamblaje (lipogénesis) y degradación (lipólisis) de TAG. La lipogénesis es el proceso que se lleva a cabo dentro del adipocito y en algunas otras células del cuerpo como las hepáticas. Durante mucho tiempo se pensó que la acumulación de TAG en el tejido adiposo era únicamente por recepción de lipoproteínas provenientes de otros órganos (como el intestino posterior a su absorción y del hígado posterior a la síntesis) sin embargo en 1999 Hellerstein encontró que el adipocito también presenta las enzimas necesarias para sintetizar TAG pero en menor cantidad que el hígado.

La síntesis de TAG en el adipocito se lleva a cabo, en principio, por la síntesis de los ácidos grasos que comienza con la entrada de glucosa a través de proteínas transportadoras de glucosa (GLUTs) especializadas. Esta glucosa citosólica es metabolizada a piruvato para después ser transformada en acetil-CoA por la piruvato carboxilasa en la mitocondria. El acetil-CoA sintetizado entra al

ciclo de Krebs donde uno de sus intermediarios, el citrato, es capaz de salir de la mitocondria por medio de un transportador. Fuera de la mitocondria se puede volver a sintetizar acetil-CoA citosólico, por la citrato liasa, y finalmente producir, a partir de este acetil-CoA y CO_2 , malonil-CoA por la acetil-CoA carboxilasa (ACC). Posterior a ello, la enzima sintasa de ácidos grasos (FAS) mediará la elongación del ácido graso en formación mediante la reducción de NADPH y la adición de dos carbonos de acetil CoA por ciclo. La actividad de las enzimas clave para la síntesis de ácidos grasos está finamente regulada por la presencia de hormonas tal como la insulina, sus diferentes metabolitos y cambios en la relación energética (ATP/ADP). Posteriormente se formarán los TAG por esterificación, por parte de la acil-CoA sintetasa, de los ácidos grasos antes sintetizados o provenientes de otros órganos y las aciltransferasas facilitarán la acilación del glicerol-3-fosfato para formar TAG (Gesta y Kahn, 2012).

Contrario a la lipogénesis, la lipólisis es la respuesta a un incremento en la demanda energética y sus productos son ácidos grasos no esterificados y glicerol; los primeros pueden salir a la sangre y unirse a la albumina para su transporte hacia otros tejidos mientras que el glicerol se dirige al hígado, principalmente, para llevar a cabo la gluconeogénesis. Durante este proceso metabólico, el TAG debe someterse a la acción de tres diferentes enzimas. La primera de ellas debe asociarse a una proteína en la gota lipídica, la perilipina, y ésta a su vez asociarse a un cofactor, CGI-58 (Identificación de Genes Comparativo 58), desencadenando la movilización de la primera enzima, Triacilglicerol Lipasa Adiposa (ATGL), desde el citosol hacia la gota lipídica. La acción la ATGL liberará un ácido graso y un diacilglicerol que se transporta hacia el citosol donde una segunda enzima, la lipasa sensible a hormonas (HSL), libera un segundo ácido graso y un monoacilglicerol que es finalmente metabolizado por la enzima monoglicerol lipasa (MGL) produciendo un ácido graso y un glicerol (Jaworski *et al.*, 2007, Gesta y Kahn, 2012).

II.II.VI Tejido Adiposo en el Síndrome Metabólico

Existen dos condiciones presentes en el sobrepeso y la obesidad. La hipertrofia del adipocito y la hiperplasia. La primera, hipertrofia, se refiere al aumento del tamaño del adipocito mientras que la segunda, hiperplasia, se refiere al aumento en el número de células grasas. La hipertrofia es una característica común de los individuos con sobrepeso y obesidad mientras que la hiperplasia se relaciona con la severidad de la obesidad (Hirsch y Batchelor, 1976). Sin embargo, se ha identificado que periodos de ganancia de peso en la edad adulta se relaciona con el aumento del número de adipocitos y estudios con animales apoyan la teoría que sugiere que incremento en el tamaño del adipocito precede incrementos en el número de células. Últimamente, existen estudios que sugieren que la hipertrofia es en sí misma un factor de riesgo independiente para el desarrollo de la DM2. (Moreno-Navarrete y Fernández- Real, 2012).

Ambas condiciones están asociadas a anomalías metabólicas intracelulares en la función adiposa, en específico del retículo endoplásmico y el estrés mitocondrial. Ello conduce a problemas en el metabolismo celular que se han relacionado con la resistencia a la insulina, producción de adipocinas, etc. (Torres, 2009).

II.III Hormonas Esteroides

Las hormonas esteroides son hormonas derivadas del colesterol que se sintetizan en diferentes lugares como la glándula suprarrenal, la placenta, los ovarios y los testículos. Su función consiste en regular el metabolismo, inflamación, la maduración sexual y la regulación de los ciclos de reproducción, la respuesta del sistema inmune e incluso el equilibrio hídrico por medio de la inducción de síntesis de proteínas en la célula blanco. Estas hormonas se dividen en cinco grupos: los prostágenos, los estrógenos, los andrógenos, los

glucocorticoides (o corticoesteroides por producirse en la corteza suprarrenal) y los mineralocorticoides (figura 8). Es esteroide de mayor presencia en la mayoría de los mamíferos y otras especies pertenece al grupo de los corticoesteroides, es el cortisol (Heffner y Schust, 2010).

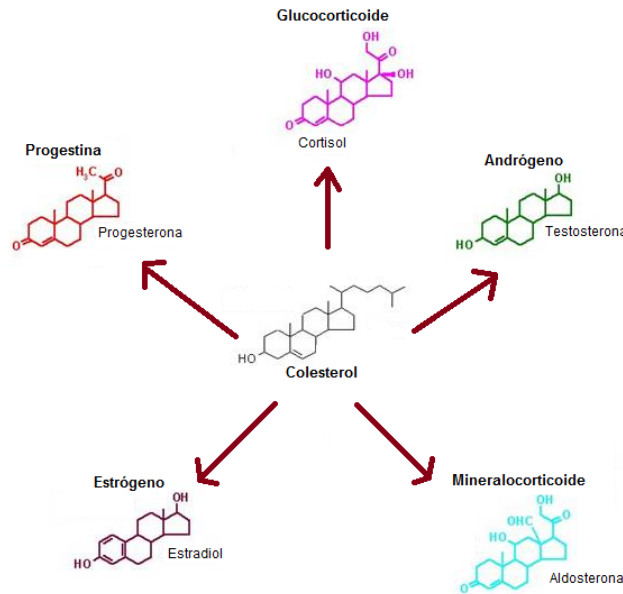


Figura 8. El colesterol y sus derivados esteroides (Modificado de Vazquez-Contreras, 2003).

Debido a su origen en el colesterol, las hormonas esteroides también conservan las propiedades liposolubles de dicho lípido e incluso se habla de su capacidad para atravesar la membrana citoplasmática para ingresar a las células blanco no siendo así para la progesterona a la cual se le ha identificado un receptor en la membrana citoplasmática (Pocock y Richards, 2005). Aún con ésta característica se sabe que los esteroides utilizan receptores intracelulares que se encuentran en el citoplasma, el retículo endoplásmico, e incluso en el núcleo; los cuales facilitan y potencian la respuesta intracelular. (Champe *et al.*, 2007; Vera Ávila *et al.*, 2010)

II.III.I Los corticoesteroides y el cortisol

Los corticoesteroides son hormonas con gran actividad metabólica, inflamatoria e incluso inmune, se sintetizan en la glándula suprarrenal y su secreción está regulada por la actividad del eje-hipotálamo-hipófisis-suprarenales (HPA), que consiste en una cascada hormonal que comienza con la liberación de la Hormona Liberadora de Corticotropina (CRH) por las neuronas del núcleo paraventricular. La acción de esta hormona en la hipófisis estimula la síntesis y liberación de la hormona adenocorticotropina (ACTH) que viaja vía sanguínea hasta la glándula suprarrenal promoviendo la síntesis y liberación de diferentes corticoesteroides, tal como la cortisona (Figura 9). La secreción se ve influenciada por el ciclo circadiano y la exposición a estrés promoviendo la respuesta deseada a diferentes situaciones (Grasa, 2004). Una vez secretados, los corticoesteroides viajan vía sanguínea unidos a la globulina fijadora de corticoesteroides, o transcortina, y ejercen sus efectos en otros órganos además de provocar un efecto de retroalimentación negativa sobre el hipotálamo y la adenohipófisis.

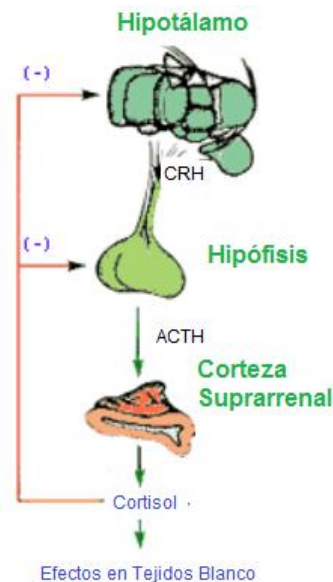


Figura 9. Eje Hipotálamo-Hipófisis-Suprarenales (HPA) en la síntesis de corticoesteroides. (Modificado de Velazquez, 2012).

El mecanismo de acción de las hormonas corticoesteroides comienza una vez que han atravesado la membrana plasmática de las células blanco y dentro de ellas se unen a los receptores específicos (en citosol o núcleo); tras su unión forman complejos receptor-ligando y comienzan su acumulación intranuclear formando dímeros y uniéndose a secuencias reguladoras en el ADN que reconocen estos complejos. Una vez lograda la fijación al ADN pueden reclutar proteínas coactivadoras y por consecuencia a la maquinaria de transcripción provocando un incremento en la transcripción de genes específicos. O por el contrario combinarse con proteínas correpresoras e inhibir la transcripción (Figura10). (Champe *et al.*, 2007; Ira-Fox, 2003)

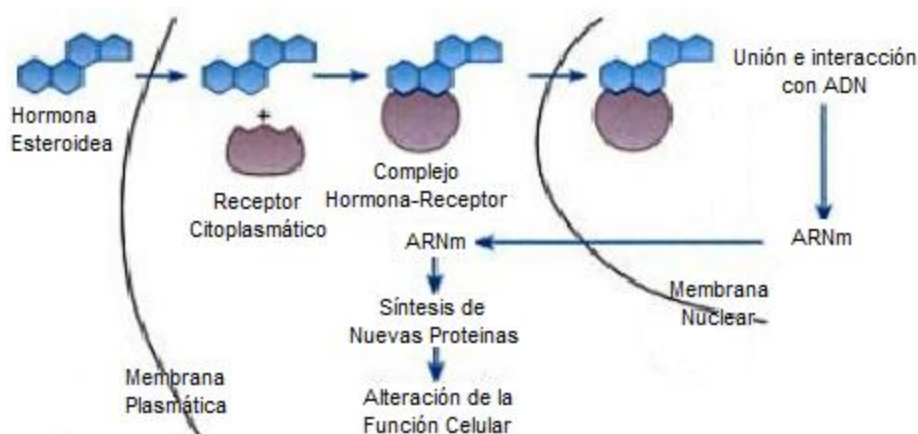


Figura 10. Mecanismo de acción de las hormonas corticoesteroides (Modificado de Pocock y Richards, 2005).

Una función importante de las hormonas corticoesteroides es la regulación del metabolismo intermedio de los hidratos de carbono, proteína y grasas ya que se asocian con procesos gluconeogénicos y lipolíticos, considerándose como importantes catabólicos en el mantenimiento de niveles de glucosa en sangre durante el ayuno a largo plazo (Ira-Fox, 2003).

El cortisol es la principal hormona corticoesteroide en los mamíferos y algunos otros organismos; su liberación actúa en favor de la administración

necesaria de energía a las demandas energéticas elevadas en los órganos producto de la exposición al estrés o al ayuno. Su liberación y acción hace disponibles glucosa, aminoácidos, glicerol y ácidos grasos para su utilización en el abastecimiento de energía y así favorecer el mantenimiento de la homeostasia. Por ello, el cortisol se ha catalogado como una hormona catabólica de acción a largo plazo; en casos de respuesta al estrés la respuesta inmediata es mediada por las catecolaminas y el cortisol parece tener efectos posteriores y por un periodo de tiempo mayor debido a sus efectos en la inducción y represión en la expresión génica (en especial induciendo la expresión de enzimas responsables de la lipólisis) (Zhou y Cidlowski, 2005; Peckett *et al.*, 2011; Villalobos, 2003).

Dentro de las funciones principales de esta hormona se encuentran el mantenimiento de la presión arterial durante el día, mantenimiento de los niveles de glucosa en sangre, metabolismo de macronutrientes y supresión del sistema inmunitario. Así mismo, es importante en la respuesta al estrés y en algunas condiciones extremas para mantener la homeostasia. La cortisona viaja por la sangre en su forma inactiva y llega hasta los diferentes tejidos para ser activada y promover cambios en el metabolismo local (Tomilinson *et al.*, 2004).

Bajo condiciones normales, el cuerpo se encarga de mantener niveles séricos de cortisona los cuales no son estáticos durante el día, por el contrario la cortisona se presenta en concentraciones elevadas por la mañana y menores por la noche; los valores de cortisona en plasma oscilan entre 5 y 15 $\mu\text{g/dL}$ (ó 0.15 - 0.5 $\mu\text{mol/L}$) en pacientes sanos y en ratones se encuentra alrededor de 300 ng/dL (1 $\mu\text{mol/L}$) (Peckett *et al.*, 2011).

II.III.II 11 β -HSD1

El estudio del cortisol, en los últimos años, ha brindado información sobre su metabolismo y concentraciones tanto séricas como celulares. Como se mencionó, la hormona es secretada de la corteza suprarrenal en su forma inactiva,

y algunas moléculas activas, que viajan vía sanguínea hasta llegar a las células blanco quienes cuentan con enzimas de activación e inactivación para regular su función. Estas enzimas son la 11 β -HSD1 y 11 β -HSD2 (Figura 11). La primera de ellas cataliza la activación de la cortisona a cortisol permitiendo que ejerza sus efectos metabólicos; se encuentra en diferentes tejidos como el hígado, cerebro, músculo, tejido adiposo y el corazón. Por otro lado, la 11 β -HSD2 cataliza la inactivación del cortisol y se localiza únicamente en el hígado y, al parecer, en algunos tipos celulares del riñón (Desbriere *et al.*, 2006; Masuzaki *et al.*, 2001; Walker *et al.*, 2006). Una vez activa, la hormona puede ejercer sus funciones, que son principalmente a largo plazo e involucran cambios en la expresión génica.

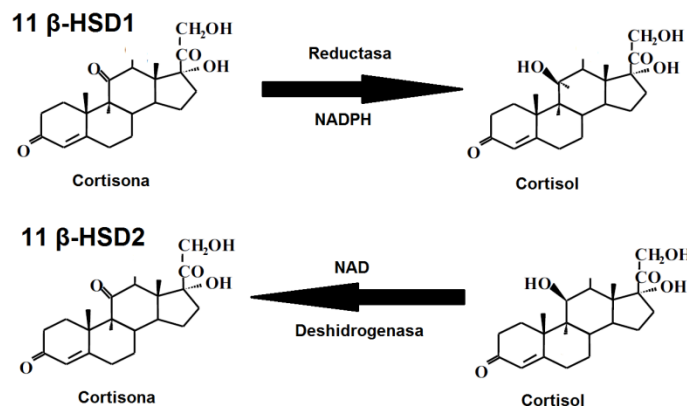


Figura 11. Acción de las enzimas 11 β -HSD1 y 11 β -HSD2. (Modificado de Espíndola y Kater, 2007).

Las concentraciones de la hormona no se mantienen estáticas en el organismo ya que funcionan como reguladores del ciclo circadiano sin embargo existen patologías como el Síndrome de Cushing (SC) en las cuales una alteración en la secreción de las hormonas liberadoras ocasionan un incremento significativo en la liberación de cortisol propiciando alteraciones metabólicas similares a aquellas del SM (Ira-Fox, 2003). Aún así y siendo que comparten alteraciones metabólicas que se ven ligadas a la mortalidad, en la obesidad y el SM no se ha reportado incremento significativo en los niveles plasmáticos de la hormona (Espíndola y Kater, 2007). No obstante, estudios sobre el tejido adiposo reportan

incrementos locales (a nivel del tejido) de entre 10 y 15 veces respecto a aquellos presentes en el plasma lo cual se ha asociado a un incremento en la expresión de la enzima 11 β -HSD1. (Fediuc *et al.*, 2006; Stewart *et al.*, 2003). Esta condición parece incrementar los niveles locales de esta hormona contribuyendo al desarrollo y complicaciones de la obesidad, ya sea favoreciendo la hipertrofia del adipocito o bien provocando un incremento en los niveles de glucosa y de lípidos circulantes (Andrews *et al.*, 2002; Bujalska *et al.*, 2007). Así mismo, se han asociado las complicaciones del síndrome metabólico con un fallo en la retroalimentación negativa del eje HHA.

II.IV Acuaporinas (AQPs)

El agua es el compuesto más abundante en el cuerpo humano y es de suma importancia ya que es el disolvente universal dentro de los organismos. Durante mucho tiempo se pensó que el único mecanismo de transporte de esta molécula hacia el interior de la célula era la difusión pasiva a través de la membrana. Esta explicación causaba controversia sobre todo al momento de comprender el mecanismo de reabsorción de agua en los túbulos renales. Sin embargo en 1989 Peter Agre descubrió un nuevo mecanismo de transporte a través de poros.

Agre se encontraba estudiando la proteína del grupo Rh de los eritrocitos, al momento de tratar de purificar la proteína de 30 kDa se encontró con que copurificaba con una proteína de menor tamaño (28 kDa); pensando que se trataba de un subproducto de la hidrólisis del grupo Rh realizó un análisis estructural encontrando todo lo contrario. A partir de ello se analizó la secuencia y estructura de dicha proteína, ahora denominada acuaporina 1 (AQP1), encontrándole gran similitud con proteínas de transporte de agua en otras células como PIM abundante el cristalino (que posteriormente se denominó AQP0). (Echeverría y Zardoya, 2006)

Desde entonces se ha estudiado profundamente su estructura y función. Las acuaporinas (AQPs) son proteínas que atraviesan la membrana plasmática en seis segmentos unidos por 5 lazos conectores; dos de estos lazos se pliegan hacia la membrana y, debido a la presencia de dos secuencias de asparragina-prolina-alanina (NPA), forman la estructura del poro. El pliegue asemeja un reloj de arena puesto se ensancha conforme se abre hacia ambos lados de la membrana. Una característica importante de las acuaporinas es que, a pesar de que por sí solas forman el poro, tienden a formar tetrámeros en la membrana brindándoles mayor estabilidad en el entorno lipídico de la membrana.(Coppo, 2008)

El canal que se forma al centro por ambos grupos de NPA tiene un diámetro de 3 armstrong que permite el paso de la molécula de agua con (2.8 armstrong).Esta secuencia de aminoácidos en la parte más angosta del poro permite que el oxígeno de la molécula de agua forme puentes de hidrógeno, imposibles de formarse con otros aminoácidos de la proteína, con las asparraginaspermitiendo la permeabilidad al agua alcanzando a filtrar un litro de agua en 7 segundos (3×10^9 moléculas/segundo). Las secuencias de aminoácidos en estas proteínas brindan permeabilidad a otras moléculas como el CO_2 (AQP1) y ser sensibles a cambios en el medio como el pH, componentes de mercurio para su regulación o bloqueo e incluso fosforilación (Coppo, 2008; Echeverría y Zardoya, 2006).

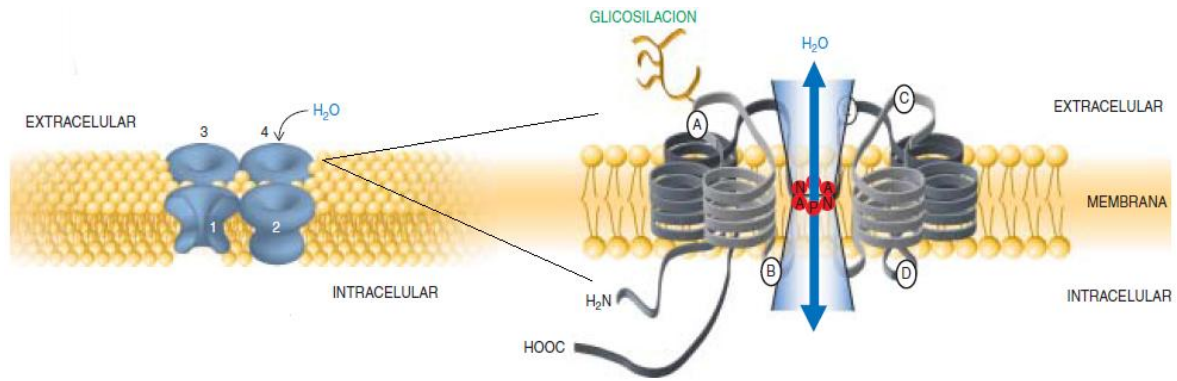


Figura 12. Estructura de las acuaporinas (Modificado de Echeverría y Zardoya, 2006).

II.IV.I Las acuagliceroporinas y Acuaporina 7 o Acuaporina Adiposa (AQP7/AQPap)

Como se mencionó, las AQPs son una gran familia de proteínas de membrana; se encuentran presentes en prácticamente todos los reinos animales lo cual evidencia su importancia fisiológica (Zardoya, 2005). En los mamíferos se han identificado 13 acuaporinas (Figura 11) (AQP0-AQP13) de las cuales 4 se subcategorizan como acuagliceroporinas (AQP3, AQP7, AQP9 y AQP10) debido a que también son permeables a glicerol. Entre algunas otras de sus funciones destacan la movilización de gases y su intervención en las uniones comunicantes (Echeverría y Zardoya, 2006).

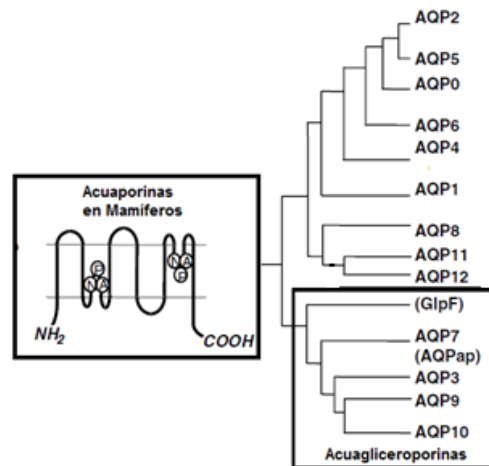


Figura 13. La familia de acuaporinas. (Modificado de Kishida, 2010)

Las AQP7 son proteínas que se encuentran en casi todos los tipos celulares debido a su importancia en el transporte de agua y mantenimiento de la homeostasia. Al analizar la expresión génica del tejido adiposo se encontró expresión importante de una proteína miembro de esta familia, la AQP7 (que otro grupo nombró simultáneamente AQP7) (Maeda *et al.*, 1997). Retomando el papel del adipocito como centro de almacenaje de energía. Éste debe contar con los mecanismos necesarios para hacer eficiente la formación y degradación de TAG. El adipocito tendrá la capacidad de responder a hormonas (p.e. insulina) y sintetizar TAG; por el contrario en un estado de ayuno o ejercicio este deberá responder a la señal de degradación y deberá desencadenar una cascada enzimática y de movilización de proteínas para asegurar la liberación tanto de ácidos grasos como de glicerol (Figura 14) (Maeda *et al.*, 2004).

La relevancia de la existencia de estas proteínas de transporte en el SM radica en que forma parte del metabolismo energético ya que moviliza el glicerol obtenido de la lipólisis para ser utilizado en la gluconeogénesis hepática contribuyendo en el mantenimiento de niveles adecuados de glucosa, triglicéridos y proteínas. (Beitz *et al.*, 2009; Maeda *et al.*, 2009). Incluso se ha demostrado que la AQP7 contribuye a mantener una salida controlada del glicerol evitando que la degradación incrementada provoque un incremento agudo en la circulación sanguínea de este metabolito (Kuriyama *et al.*, 1997). Se ha propuesto que la regulación de la movilización de esta proteína hacia la membrana es producto de la fosforilación mediada por cAMP y PKA. Las acuaporinas se encuentran secuestradas en vesículas citoplasmáticas que al ser fosforiladas se movilizan hacia la membrana plasmática. Así mismo se sabe que la regulación puede verse mediada por una inducción en la transcripción del gen producto de la acción de alguna hormona.

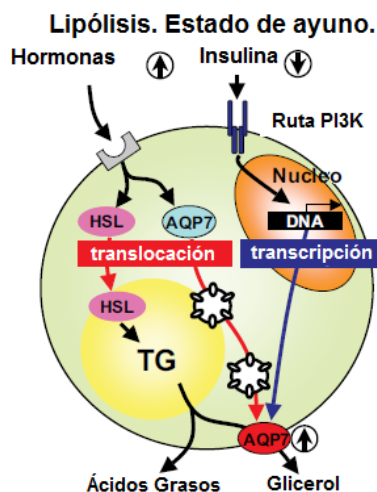


Figura 14. Mecanismo de regulación de AQP7 durante el ayuno o respuesta a estrés. (Modificado de Kishida, 2010)

Al igual que en el caso de los niveles alterados de hormonas, la regulación de las proteínas de membrana del adipocito también se ha visto relacionada con el desarrollo de diversas patologías metabólicas (Marrades *et al.*, 2006). Existen algunos experimentos realizados con ratones en los que se suprimió el gen codificante para Aqp7. Como resultado se obtuvieron ratones obesos cuyos adipocitos evidenciaban hipertrofia debido a una mayor acumulación de triglicéridos y glicerol. Así mismo los ratones mutantes se volvieron insulino-resistentes. Algunos otros estudios en poblaciones con individuos obesos y delgados han descubierto que en la obesidad la expresión de Aqp7 se ve disminuida, sin embargo los mecanismos fisiopatológicos que describan el mecanismo por el cual se ve afectada su expresión aún se desconocen así como su asociación con una resistencia a la insulina. (Hara-Chikuma *et al.*, 2005; Hibuse *et al.*, 2005; Maeda *et al.*, 2005; Marrades *et al.*, 2006). , aunque aún existe controversia sobre si se encuentra disminuida o aumentada en casos de DM2 (Prudente *et al.*, 2007; Macdougald *et al.*, 2005).

III. Hipótesis

Incrementos en la concentración de cortisona ligados a la fisiopatología del Síndrome Metabólico en el medio extracelular provocarán un aumento en la expresión de 11 β -HSD1 y una disminución en la expresión de Aqp7 en células 3T3 L1.

IV. Objetivos

IV.I General

Conocer el efecto de la cortisona sobre la expresión de la enzima 11 β -HSD1 y de la proteína de transporte Aqp7 tras la adición de cuatro diferentes concentraciones de cortisona (0, 0.1, 1 y 10 μ M) en células 3T3L1 diferenciadas.

IV.II Específicos

Evaluar el efecto de diferentes dosis de cortisona (0, 0.1, 1 y 10 μ M) en adipocitos de la línea celular 3T3L1 sobre la expresión de 11 β -HSD1 y Aqp7 mediante PCR en tiempo real.

Evaluar el efecto de estos tratamientos sobre la concentración de glucosa y glicerol en los medios de cultivo de las células tratadas.

V. Metodología

V.I Cultivo Celular

Para el cultivo celular se adquirió lo siguiente: Medio Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM) alto en glucosa, solución amortiguadora de fosfatos PBS 10x, insulina, penicilina, sulfato de estreptomicina y suero fetal bovino (SFB) fueron provistos por GIBCO (Grand Island, NY, EUA) y la cortisona se obtuvo de Sigma (C2755). Las cajas petri de 10 y 3.5 cm de diámetro y pipetas de plástico de 5 y 10 mL fueron provistos por NUNCTM Brand Products (EUA). Los tubos de fondo cónico con capacidad para 50 y 15 mL Falcon se obtuvieron de BD Falcon TM (Becton, Dickinson and Company®, B-D Labware, EUA). Para realizar el experimento, se obtuvo una alícuota de la línea celular 3T3 L1 donada por el Dr. Luis Antonio Salazar Olivo de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica (IPICYT).

Para iniciar con el protocolo, se tomaron células de una caja de 10 cm de diámetro y se sembraron cajas de 3.5 cm de diámetro con 40,000 células. Después de 48 hrs de proliferación, se indujo la diferenciación con el uso consecutivo de los tres medios de diferenciación (cuadro 4); el primero de ellos aplicado 48 hrs, el segundo 24 hrs y el tercero de 48 – 96 hrs, como se hace convencionalmente para este tipo celular.

Cuadro 4. Conformación de los medios de diferenciación del adipocito.			
Medio Basal	Medio de Diferenciación 1	Medio de Diferenciación 2	Medio Diferenciación 3
48 hrs	48 hrs	24 hrs	48 – 96 hrs
DMEM SFB Penicilina/Estreptomina (P/S)	DMEM SFB P/S Insulina Dexametasona IBMx	DMEM SFB P/S Insulina	DMEM SFB P/S

Los medios utilizados se cambiaron al menos cada 48 horas con excepción del medio de diferenciación 2 que únicamente se administra 24 horas.

Previo a la aplicación del tratamiento se eligieron 3 pozos al azar para realizar una prueba de rojo oleoso y comprobar el estado de diferenciación de las células.

V.II Rojo Oleoso

Es necesario que la mayoría de las células (>80%) en tratamiento estén diferenciadas pues se quiere ver el efecto sobre el adipocito y no sobre el precursor o sobre la diferenciación. La técnica de rojo oleoso se emplea para determinar si es que las células tratadas se han diferenciado en al menos un 80%. El procedimiento consiste en fijar las células al pozo con formalina al 3.5% durante 1 hr a 4°C. Posteriormente se realizó un lavado con agua a chorro para eliminar residuos y se dejó secar. Una vez seco se agregó una solución de rojo oleoso al 5% en isopropanol al 60% y se incubó a temperatura ambiente por 2 horas. Terminada la incubación se retiró el exceso y se enjuagó nuevamente con agua y se dejó secar. Para la lectura, se agregó 1 mL de isopropanol a cada pozo y se dejó reposar por 10 minutos a temperatura ambiente para desprender la muestra y disolver la coloración obtenida para la lectura. Con el mismo isopropanol se enjuagó el pozo para tomar toda la muestra y se colocó en la celda para lectura en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 510 nm. Para blanquear se utilizó 1 mL de isopropanol absoluto. La grasa neutra de las células absorbe el rojo oleoso, por lo tanto a mayor cantidad de grasa en las células, mayor será la absorción del reactivo y se obtendrá una mayor coloración de las gotas de grasa que se observarán al microscopio antes de diluir en isopropanol. Las células diferenciadas mostrarán las gotas coloreadas 6-8 días después de iniciar la diferenciación (Oficina Española de Patentes y Marcas, 2006). Para determinar si la mayoría de las células (>80%) se encuentran diferenciadas el valor de absorbancia debe de ser mayor de 0.5 (Life Science, 2009).

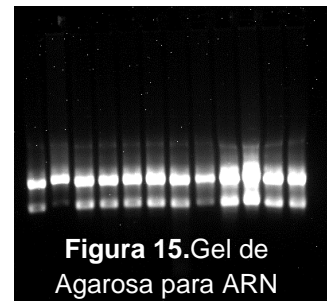
V.III Aplicación de los tratamientos.

Una vez terminado el proceso de diferenciación, las células se dejaron en un periodo de 'restricción' sin SFB por un periodo de 4 horas. Para ello se utilizó DMEM y penicilina/estreptomicina.

Al terminar el periodo de ayuno se aplicó el tratamiento con cortisona administrando 0, 0.1, 1 y 10 μ M en el medio de diferenciación basal durante 6 periodos de tiempo diferentes, 0, 5, 10, 15, 20 minutos y 48 horas. Al finalizar el tratamiento, se recolectaron y almacenaron a -20°C los medios para cuantificar la glucosa y el glicerol y se realizaron los protocolos correspondientes para obtener DNA complementario de las muestras.

V.IV Extracción de ARN

Una vez retirado el medio de diferenciación se agregó 1 mL Trizol (QIAGEN®) para realizar la lisis celular y con una punta de 1 mL se raspó el fondo de la caja de siembra. El homogenado obtenido se colocó a un tubo Ependorf de 1.5 mL. A esta muestra se le agregó 1 μ L de RNasa Out con el fin de eliminar cualquier RNasa que pudiese degradar la muestra y se incubó 5 minutos. A continuación, se agregaron 200 μ L de cloroformo por cada mililitro de Trizol empleado y se centrifugó a 12 000 rcf (relative centrifuge force) por 10 minutos para separar la fase orgánica e inorgánica, la fase superior se transfirió a un tubo nuevo y se agregaron 500 μ L de isopropanol para precipitar y limpiar la muestra formando un pellet, el ARN, después de haber centrifugado 10 min a 12000 rcf. Finalmente se lavó el precipitado obtenido dos veces con etanol al 70% y se centrifugó 7500 rcf por 5 minutos. Después de realizar ambos lavados se diluyó en 40 μ L de agua libre de RNAsas y se almacenó a -70°C . Para comprobar la integridad de ARN, se buscaron 2 bandas (que evidencian el peso del RNA de las dos subunidades ribosomales 18S y 20S) en gel de agarosa al 10%. Este



procedimiento se realizó en frío, es decir que los reactivos y las muestras se mantuvieron a 4°C.

V.V Transcripción Inversa (RT).

Se midió la concentración y pureza del ARN extraído mediante un espectrofotómetro Nanodrop 1000 (ThermoScientific) para corroborar la concentración de ARN y la pureza del mismo. Esto con el fin de poder realizar una transcripción inversa, o retrotranscripción, y obtener un fragmento complementario de ADN (cADN) que fuese estable a la temperatura y al protocolo para llevar a cabo la reacción en cadena de polimerasa y cuantificar la expresión de los genes en estudio.

Para cada muestra se calculó el volumen en el cual se contiene 1µg de ARN y se realizó la transcripción inversa de la muestra para obtener el cADN. El procedimiento consiste en la unión de un cebador a una secuencia de nucleótidos de interés y a la actividad catalítica de la enzima transcriptasa reversa (RT-superscript) que extiende el cebador uniendo nucleótidos complementarios a la hebra de ARN (Alberts et al. 2002).

Para obtener el cADN, se realizó una mezcla con las enzimas necesarias para la síntesis de la hebra correspondiente para cada una de las muestras. Para comenzar, se agregó 0.75 µL de DNasa a temperatura ambiente durante 15 minutos por cada muestra. Después se incubó 5 minutos a 70°C. Para detener la reacción, se depositó la muestra en hielo y se agregaron 2µL de buffer 5X, 3 µL de DTT y 1 µL de inhibidor de RNasa lo cual aseguró que los ARNs obtenidos no se degraden durante la síntesis de la cadena complementaria. Una vez homogenizado se incubó a 42°C por 2 minutos y al finalizar la incubación se detuvo la reacción nuevamente al enfriar la muestra y se añadió 1 µL de RT-superscript para realizar la transcripción; ésta se incubó por 50 minutos a 42°C y después 15 minutos a 70°C. Al finalizar se almacenó a -20°C.



Figura 16. Gel de Agarosa para cDNA

Una vez más se comprobó la integridad de la muestra ubicando un barrido en gel de agarosa al 10%.

V.VI PCR en tiempo real (qPCR).

La reacción en cadena de polimerasa en tiempo real (qPCR) es una técnica muy utilizada ya que es muy sensible y permite la amplificación del gen en estudio y su cuantificación. Para la cuantificación, la fluorescencia emitida por la muestra es medida en cada ciclo de amplificación lo cual hace al método muy preciso ya que la fluorescencia emitida es directamente proporcional a la cantidad de producto de PCR. El fluoróforo que se utilizó en este experimento fue el SYBR Green I, éste se une a la doble cadena del DNA emitiendo una señal fluorescente de longitud de onda definida sobre la unión. La excitación y emisión máxima del SYBR son a 494 nm y 521 nm respectivamente, compatibles para su uso con cualquier termociclador de tiempo real (para este experimento se utilizó el termociclador StepOne de Applied Biosystems).

Para la identificación de la expresión de los genes AQP7, 11 β -HSD1 y MnSOD (gen que mostró mayor estabilidad para ser utilizado como endógeno), primero se diseñaron oligonucleótidos sentido y antisentido (Cuadro 5) cortos para poder obtener la secuencia específica del gen problema. Previo a las cuantificaciones se realizaron curvas de validación utilizando las diluciones 1:5, 1:50 y 1:500 y también para elegir la concentración sobre la cual se cuantificarían las muestras (1:50).

Una vez que se obtuvieron las diluciones del cADN para cada muestra se realizó el protocolo colocando la reacción para cada una en placas de tubos para PCR. La reacción consiste en agregar 5 μ L cADN, 2 μ L de agua, 1 μ L MgCl₂, 1 μ L de oligos sentido y antisentido y 1 μ L SYBR[®] Green Taq ReadyMix[™] I. Las muestras se prepararon por duplicado y se ingresaron en el equipo StepOne que amplifica y cuantifica de forma absoluta la amplificación del ADN. En la mezcla utilizada se incluye el marcador Sybr Green (Roche, 12 239 264 001) que es detectado por sensores de fluorescencia a la longitud de onda antes mencionada.

Las condiciones bajo las cuales se programó el equipo para realizar la cuantificación fueron 40 ciclos con temperaturas de 95°C por 10 min para la desnaturalización de las hebras, 65°C por 10 s para la hibridación de los oligonucleótidos y 8 s a 72°C para la elongación. Posteriormente se programaron las siguientes condiciones para la curva de fusión 95°C por un segundo, 60°C por un minuto y 95°C por 15 segundos.

Una vez obtenida la cuantificación de los tres genes para cada una de las muestras se realizaron los cálculos para obtener la cuantificación relativa de los genes en estudio (11β-HSD1 y AQP7) que se estima comparando los valores de Ct. El modelo que se utilizó fue el de la doble delta Ct ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) que supone que la eficiencia de la reacción para los tres genes es óptima e idéntica y se utiliza para realizar una estimación rápida de la proporción relativa de la expresión génica. Los valores de la expresión relativa que se obtuvieron fueron los utilizados para realizar el análisis estadístico.

Cuadro 5. Secuencias de los oligonucleótidos utilizados en la qPCR.		
Gen	Oligonucleótidos	Tamaño del amplicón
AQP7 (Acuaporina 7)	Sentido – TATGGTGCGAGAGTTTCTGG Antisentido – GCCTAGTGCACAATTGGTGA	200
11β-HSD1 (11β Hidroxiesteroide Deshidrogenasa 1)	Sentido – GACCCATTGCAAGGAACAA Antisentido – GTAGTAAGCGTGCTCCACAC	174
MnSOD (Manganeso Superóxido Dismutasa)	Sentido – TCAGACCAGAAATGCTCCAG Antisentido – GCCAGCAATGTAGTGAGCAG	69

V.VII Determinación de Glucosa en el Medio.

Para la cuantificación de la glucosa total en el medio se empleó la técnica de glucosa oxidasa-peroxidasa la cual consiste en sintetizar H₂O₂ a partir de glucosa con la enzima glucosa oxidasa. Este peróxido de hidrógeno producido por la oxidasa reaccionará con la orto-dianicina y peroxidasa para producir el tinte de

quinonimina que es detectado por el espectrofotómetro a una longitud de onda de 540 nm.

Para la lectura se preparó previamente un stock de las enzimas necesarias para llevar a cabo la reacción y determinar la glucosa. Se utilizó una solución de fosfatos (Na_2HPO_4 y KH_2PO_4) en glicerol al 40% a un pH de 7; a esta solución se le agregaron la glucosa oxidasa, responsable de producir H_2O_2 a partir de la glucosa presente en el medio, orto-dianicina y peroxidasa, las cuales producirán el tinte que será detectado por el espectrofotómetro. Se tomaron 50 μL del medio previamente extraído por cada muestra y se preparó para su lectura agregando 300 μL del stock de enzimas; para favorecer la reacción se incubó a 37°C mezclando a 900 rpm por 30 minutos y posteriormente se agregó 1 mL de HCl 4 N. Una vez agregado el ácido se obtuvo la lectura correspondiente en el espectrofotómetro (HewlettPackard) utilizando como referencia una reacción con 50 μL de agua.

V.VIII Determinación de Glicerol en el Medio.

En el caso de la determinación del glicerol libre se siguió el protocolo para el kit de medición de glicerol libre de Sigma. Para ello se tomaron 10 μL de medio por muestra. A este medio se agregaron 800 μL del reactivo del kit de glicerol libre el cual contiene enzimas para realizar la fosforilación del glicerol libre del medio para posteriormente oxidarse y producir peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Al igual que en el ensayo de glucosa-peroxidasa, este peróxido produjo una tinción de quinoneimina. Este reactivo se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente para permitir la reacción y finalmente se obtuvieron las lecturas de las muestras en el espectrofotómetro (HewlettPackard) a una longitud de onda de 540 nm.

V.IX Modelo Experimental y Análisis Estadístico

El diseño del experimento fue completamente al azar con un arreglo factorial 4 x 6 donde los factores fueron: tratamiento (0, 0.1, 1 y 10 μ M de cortisona) y el tiempo (0, 5, 10, 15, 20 minutos y 48 horas).

El modelo fue:

$$y = \mu + Tx_i + Tiempo_j + (Tx*Tiempo)_{ij} + E_{ij}$$

Donde:

y = variable de respuesta

μ = es la media poblacional

Tx_i = es el efecto del i-ésimo tratamiento

$Tiempo_j$ = es el efecto del j-ésimo tiempo

$Tx*Tiempo$ = es la interacción del i-ésimo tratamiento y el j-ésimo tiempo

E_{ij} = es el error experimental

Los resultados fueron analizados mediante el procedimiento de modelos lineales generales del SAS (2009) y se aplicó una prueba de comparación de medias por diferencias mínimo cuadráticas (lsmeans).

VI. Resultados

VI.I Microscopía de los cambios morfológicos de los adipocitos.

Las células 3T3 L1 se indujeron a la diferenciación y se obtuvieron adipocitos con los cuales se realizó el experimento. Se agregaron cuatro concentraciones de cortisona 0, 0.1, 1 y 10 μM en el medio de diferenciación basal durante 6 periodos de tiempo diferentes, 0, 5, 10, 15, 20 minutos y 48 horas. Debido a la rapidez con la que se realizaron los primeros 5 periodos, y a la improbabilidad de observar cambios significativos en la morfología, únicamente se adquirieron imágenes de aquellos pozos que estuvieron bajo tratamiento durante 48 horas obteniendo las imágenes recopiladas en la figura 17. En la parte superior de la imagen se muestran los preadipocitos, en la parte media los adipocitos maduros (que fueron utilizados para realizar la técnica del rojo oleoso) y finalmente se encuentran las imágenes de los cuatro tratamientos después de 48 horas. Todas fueron capturadas a 10 aumentos en un microscopio electrónico.

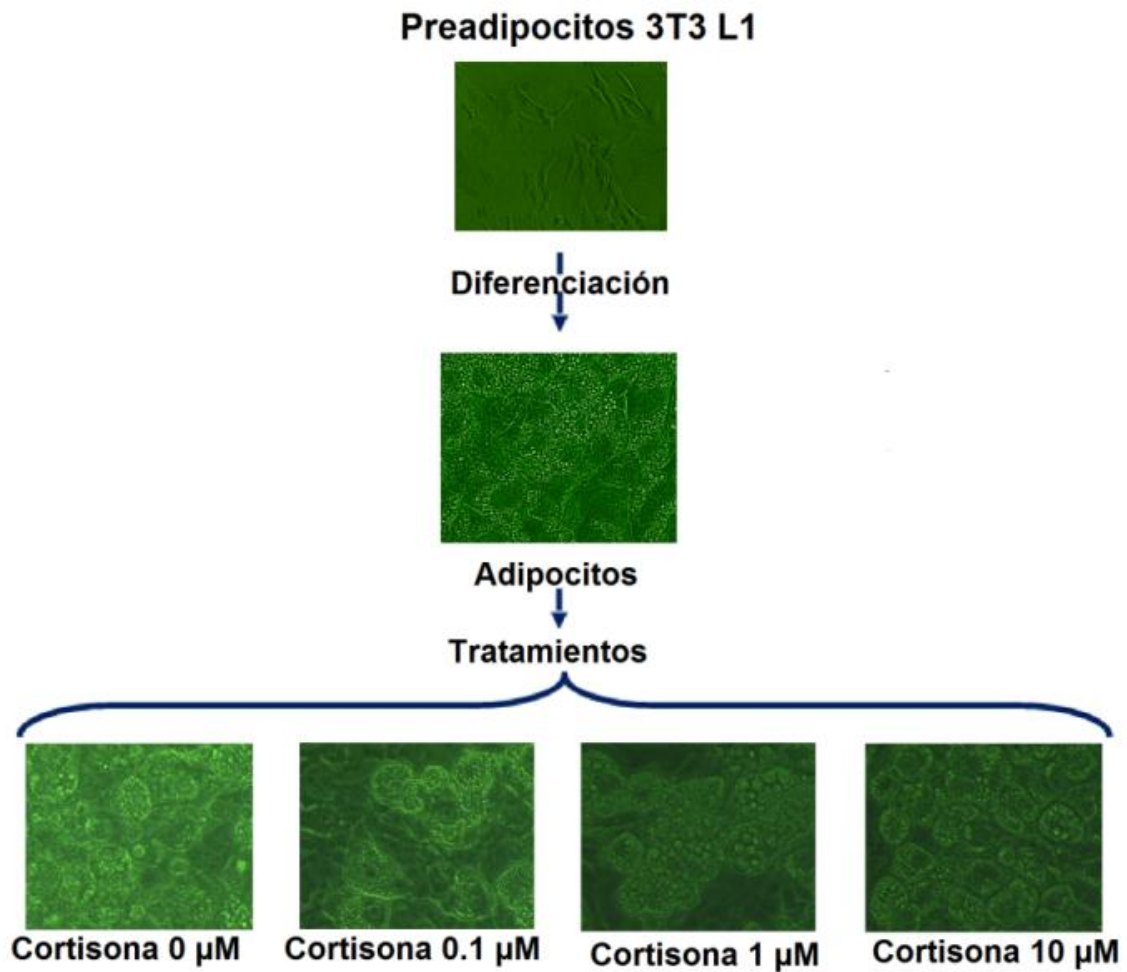


Figura 17. Cambios morfológicos de células 3T3 L1 tras la diferenciación y después de un tratamiento de 48 horas con concentraciones de 0, 0.1, 1 y 10 μM de cortisona.

VI.II Tinción de rojo oleoso

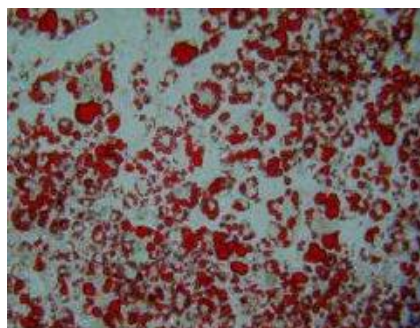


Figura 18. Imagen al microscopio electrónico con 5 aumentos de la tinción con rojo oleoso.

Como se mencionó en el apartado anterior, las células diferenciadas fueron sometidas a un análisis de acumulación lipídica mediante la técnica de rojo oleoso. Tras una incubación de 2 horas y observar al microscopio se pudo observar lo que se muestra en la figura 18. Además de ello, se cuantificó la absorbancia al microscopio obteniendo un valor de 2.5871. Se sugiere que los adipocitos diferenciados deben mostrar absorbancias mayores a 0.5 como se mostró en este caso y concordando con datos obtenidos por otros investigadores (Calvijo *et al.*, 2007; Pulido, 2010; Rojas 2009).



VI.IV Expresión de la enzima 11 β -HSD1 y la proteína AQP7.

Tras extraer el ARN y sintetizar el cADN para cada muestra se realizó una prueba de reacción en cadena de polimerasa cuantitativa (qPCR) y una vez que se obtuvo el valor al cual la fluorescencia alcanzó el umbral de detección (Ct) los resultados se sometieron análisis de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ para determinar su expresión relativa en base al gen endógeno MnSOD. Posteriormente, se realizó el análisis estadístico con el software SAS el cual arrojó los resultados ilustrados en las figuras 19 a 22.

En el caso de la enzima 11 β -HSD1 los resultados muestran una disminución significativa ($p \leq 0.0001$) de la expresión de la enzima con 0.1 μM y 10 μM de cortisona no siendo así para el tratamiento con 1 μM de cortisona el cual evidenció un incremento de más de tres veces en su expresión y se disminuyó después de los 10 minutos de tratamiento (Figura 19).

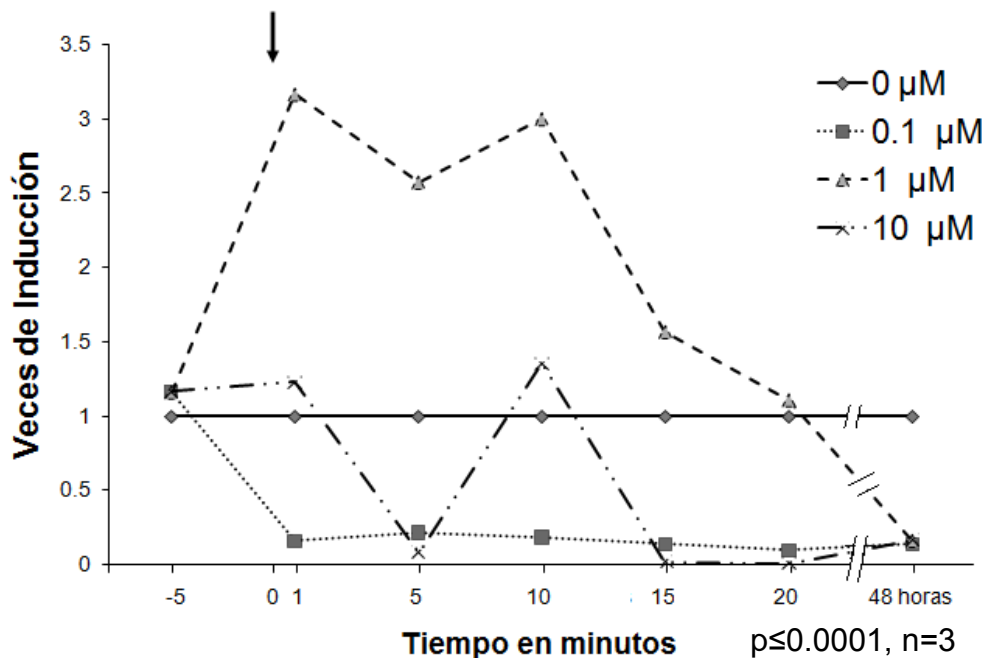


Figura 19. Expresión relativa del gen de 11 β -HSD1 en células 3T3 L1 por el efecto de diferentes niveles de cortisona. La flecha negra en la parte superior de la figura indica el inicio del tratamiento. Esta figura muestra el comportamiento de la expresión a lo largo del experimento, los datos comparativos con errores estándar se muestran en la figura 20.

En la figura 20 se puede observar el comportamiento lineal de la expresión de la enzima durante los intervalos de tiempo que fue administrado el tratamiento. Se puede observar un incremento en la expresión de 11 β -HSD1 en el tratamiento 1 μ M hasta el minuto 15 con una posterior disminución. En el caso de los tratamientos con 0.1 μ M y 10 μ M estos son de inhibición en la expresión y oscilatorios respectivamente.

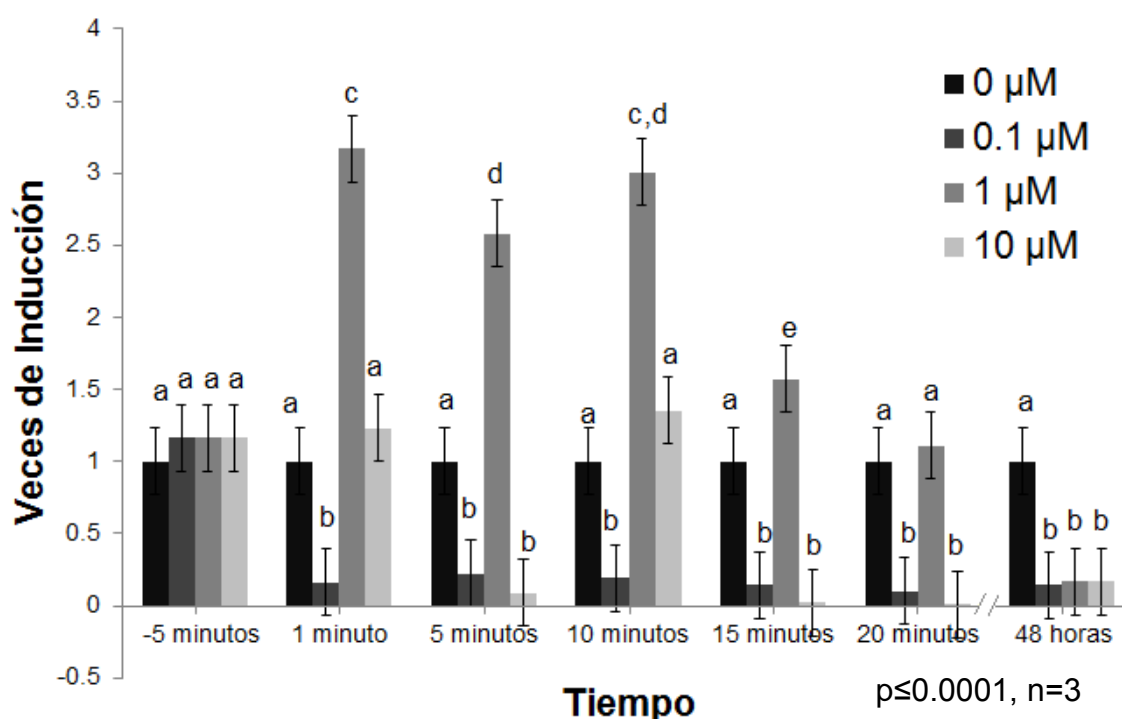


Figura 20. Expresión relativa del gen de 11 β -HSD1 en células 3T3 L1 por efecto de diferentes niveles de cortisona.

La situación con la expresión de Aqp7 fue diferente ya que existió un incremento con la concentración 0.1 μ M y 1 μ M que se vio completamente disminuida a las 48 horas. En el caso de la expresión con el tratamiento de 10 μ M, la cantidad de ciclos de amplificación para la qPCR fueron insuficientes para su detección lo cual da lugar a pensar que su expresión fue mínima (Figura 21). Al

igual que en el caso de la enzima, al minuto 10 existe un comportamiento de disminución y posterior incremento en la expresión que se ilustra perfectamente en la gráfica lineal de la expresión del gen para ambos tratamientos (Figura 22). En esta figura se muestra perfectamente una disminución al minuto 10 y un comportamiento oscilatorio posterior para finalmente disminuir cercanamente a cero la expresión hacia las 48 horas.

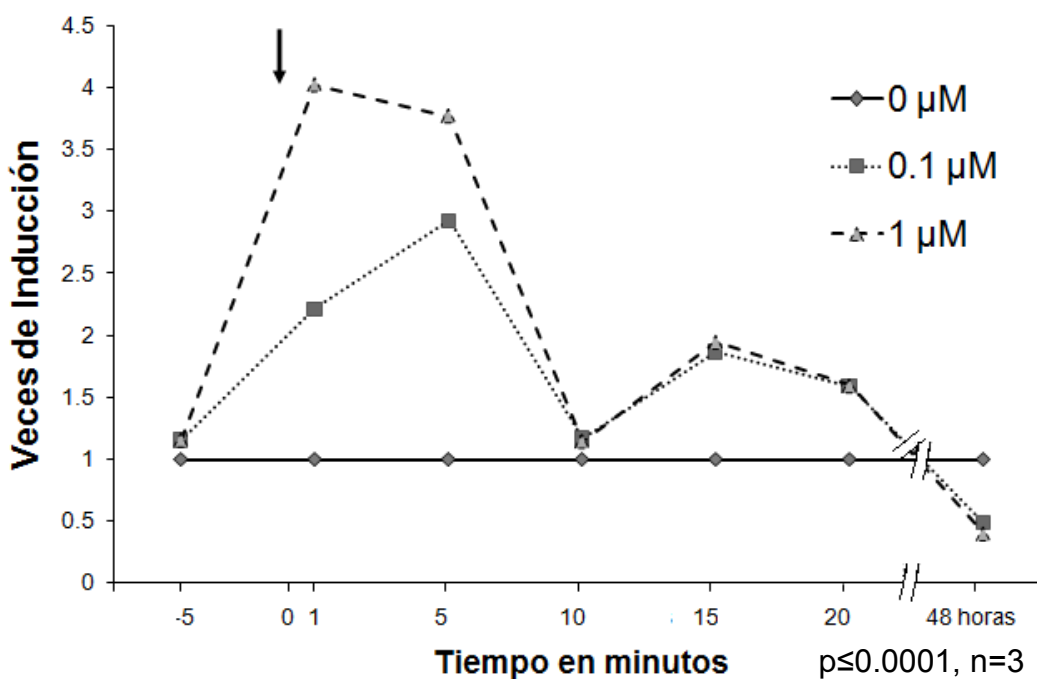


Figura 21. Expresión relativa del gen de AQP7 en células 3T3 L1 por efecto de la adición de diferentes niveles de cortisona. La flecha negra en la parte superior de la figura indica el inicio del tratamiento. Esta figura muestra el comportamiento de la expresión a lo largo del experimento, los datos comparativos con errores estándar se muestran en la figura 22.

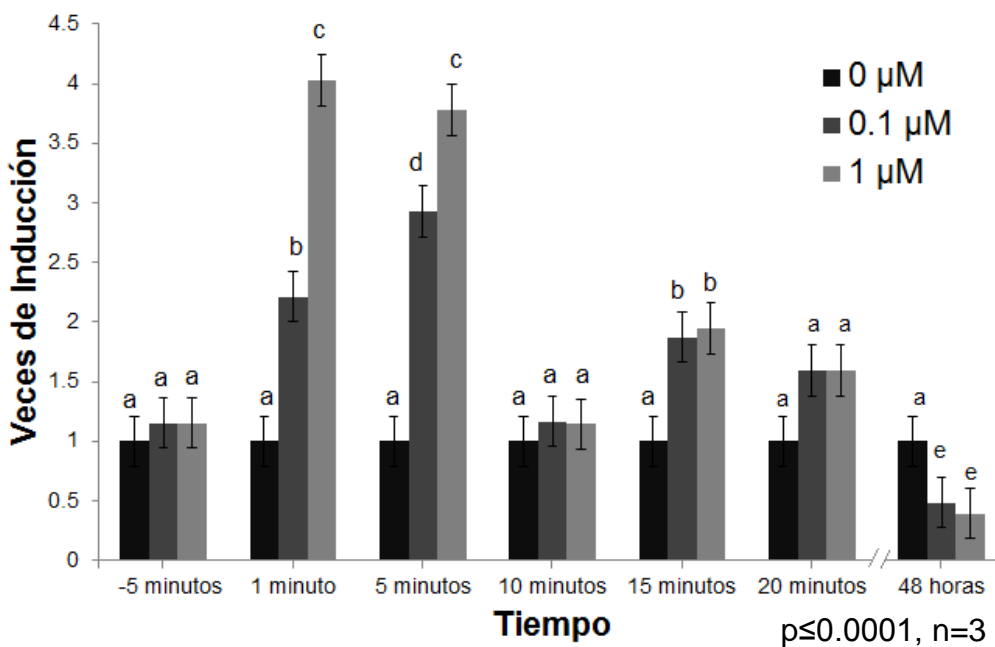


Figura 22. Expresión relativa del gen de AQP7 en células 3T3 L1 por efecto de la adición de diferentes niveles de cortisona.

VI.V Cuantificación de glucosa y glicerol para el control y el tratamiento con 1 μM.

Una vez que se realizó la cuantificación relativa de la expresión del gen y se graficó el comportamiento se eligió la concentración a la cual se evidenciaron cambios significativos para ambos genes, es decir 1 μM. De los medios extracelulares recolectados para este tratamiento se realizaron cuantificaciones de glucosa y glicerol totales obteniendo los datos recopilados en las figuras 23 y 24. Los cambios en la concentración total de glucosa y glicerol en los medios extracelulares no fueron estadísticamente diferentes con excepción de la concentración de glucosa en el minuto 10 que fue menor en el tratamiento 1 μM. En el caso del glicerol, no existieron diferencias significativas en las concentraciones del metabolito sin embargo, aunque no es estadísticamente significativa, existe una disminución al minuto 10 (figura 24).

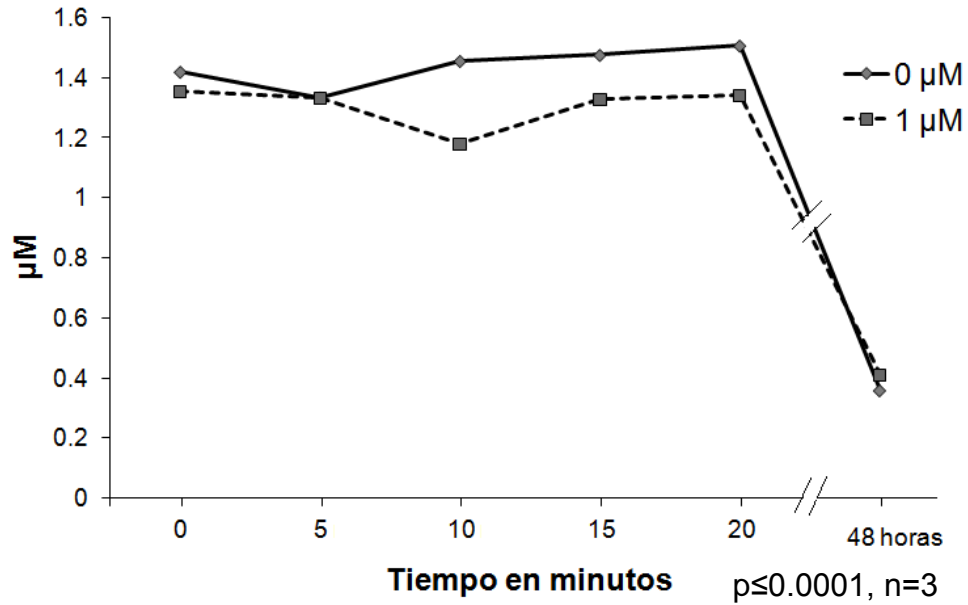


Figura 23. Cambios en la concentración de glucosa en el medio extracelular de las células 3T3 L1 por efecto de la adición de cortisona. Esta figura muestra el comportamiento de la expresión a lo largo del experimento, los datos comparativos con errores estándar se muestran en la figura 24.

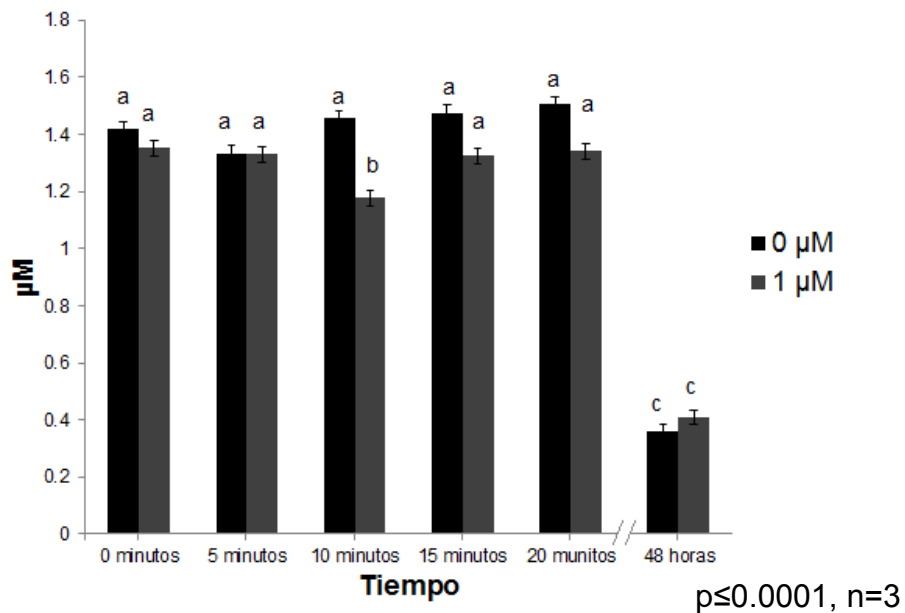


Figura 24. Cambios en la concentración de glucosa en el medio extracelular de las células 3T3 L1 por efecto de la adición de cortisona.

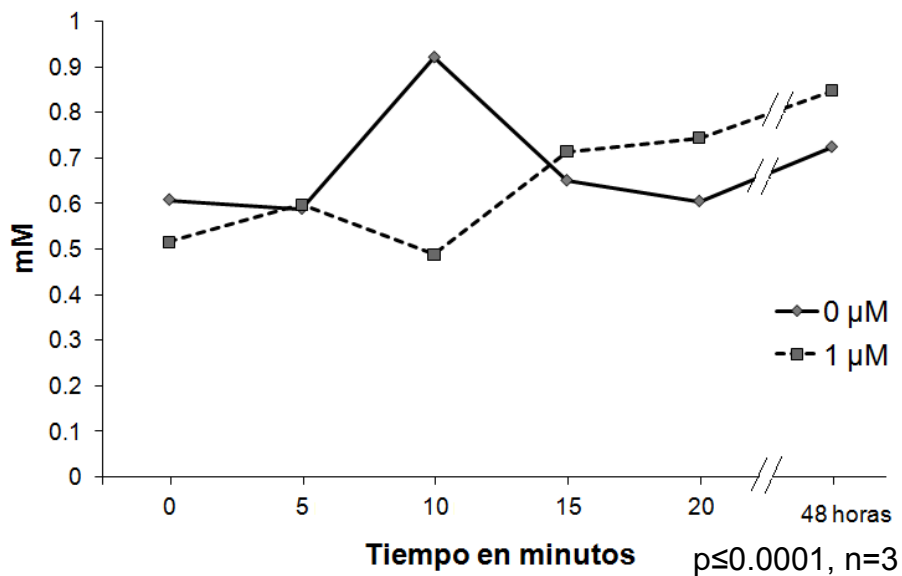


Figura 25. Cambios en la concentración de glicerol en el medio extracelular de las células 3T3 L1 por efecto de la adición de cortisona. Esta figura muestra el comportamiento de la expresión a lo largo del experimento, los datos comparativos con errores estándar se muestran en la figura 26.

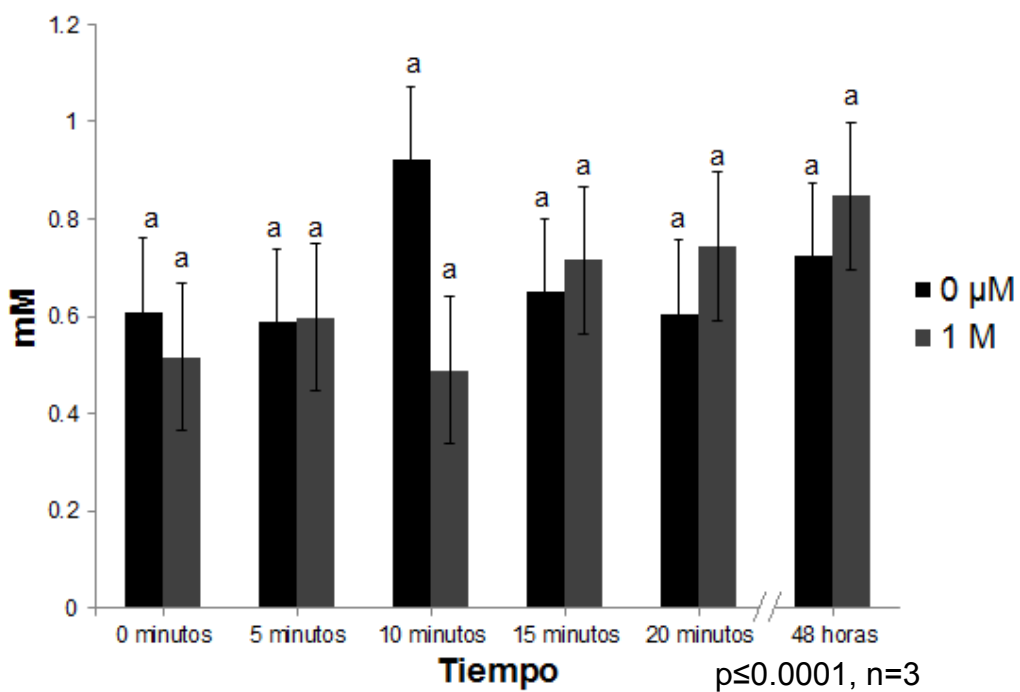


Figura 26. Cambios en la concentración de glicerol en el medio extracelular de las células 3T3 L1 por efecto de la adición de cortisona.

VII. Discusión y conclusión.

El SM está considerado como la pandemia del siglo XXI, éste se caracteriza por anomalías en el control metabólico (como se ilustró en el cuadro 1) y por lo tanto implica un desorden en aquellos señalizadores que modulan la integración de los procesos metabólicos, tales como las hormonas. Como bien se conoce, las hormonas son mensajeros que viajan a través de la sangre hasta las células blanco donde se interpreta el mensaje y se generan respuestas a las situaciones en el organismo para asegurar la conservación de la homeostasia (Pocock y Richards, 2005). La cortisona es una hormona que modula el mantenimiento de la homeostasia formando parte importante de procesos fisiológicos como la respuesta al estrés, metabolismo energético, niveles de electrolitos, presión sanguínea, inmunidad, proliferación y diferenciación celular (Pereira *et al.*, 2012). Quizá sea por esta razón que la respuesta al corticoesteroide esté modulada por enzimas intracelulares tales como la 11 β -HSD1. En el caso preciso del SM, se ha encontrado una relación entre los niveles de expresión y actividad enzimática de esta deshidrogenasa y el grado de obesidad e incluso en situaciones de hiperinsulinemia (Anagnostis *et al.*, 2009; Baudrana *et al.*, 2011; Staab y Maser, 2010; Villeux *et al.*, 2009); el mecanismo fisiopatológico de esta relación no se ha terminado de esclarecer.

Existen numerosos estudios que han explorado los cambios en la expresión y en la concentración de proteína de esta enzima durante la diferenciación adipocitaria, es decir como parte del proceso fisiológico normal. La enzima no está presente en la célula sino hasta algunos días después (aproximadamente 4) que se induce la diferenciación y permanece presente en el adipocito diferenciado. Sin embargo, pareciera que su expresión se ve mediada por diferentes condiciones fisiológicas tales como la respuesta al estrés y el ayuno (Jessen y Stevens, 2002; Kim *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2007; Stewart, 2003; Tomlinson *et al.*, 2002). Como resultado de estos estudios en los que se encontró que la expresión de la enzima era necesaria para la diferenciación pero su incremento crónico se veía ligado al desarrollo del SM, se comenzó a estudiar una forma de disminuir su expresión en

el tejido adiposo de individuos obesos utilizando diversos inhibidores, agonistas de PPAR γ , y la pérdida de peso en sí misma, observando importante disminución en la acumulación lipídica, la respuesta a la insulina, e incluso concentraciones séricas de glucosa (Berger *et al.*, 2001; Edwards, 2012; Srivastava, 2009) y también su relación con agentes inflamatorios como el TNF α y la IL-6 (Edwards, 2012; Ergang *et al.*, 2011; Tomilinson *et al.*, 2001; Tomilinson *et al.*, 2008).

Aún con todos los antecedentes citados, la realidad es que poco se ha hecho por entender la respuesta celular aguda a esta hormona y así poder comprender mejor el desarrollo del desorden metabólico. Por ello se optó por realizar el estudio en adipocitos diferenciados, esto es, que dieran positivo a la prueba de rojo oleoso realizada y las gotas lipídicas fuesen observables al microscopio óptico, lo cual concuerda con resultados obtenidos previamente (Calvijo *et al.*, 2007; Pulido, 2010; Rojas 2009). Como se muestra en la figura 19, la cortisona a concentración 0.1 μ M tuvo un efecto de represión de la enzima, desde el inicio hasta las 48 horas, lo cual es similar al resultado encontrado por otros investigadores (Balachandran *et al.*, 2008). Sin embargo, existe un incremento importante de 3 veces su valor inicial en el caso de la concentración 1 μ M que se disminuyó considerablemente a los 15 minutos. Park (2011) utilizó esta misma concentración en sus ensayos y obtuvo una disminución en la expresión después de 6 días de tratamiento, lo anterior concuerda con la expresión encontrada a las 48 hrs de tratamiento en este experimento. En el caso de emplear la cortisona a la concentración de 10 μ M se obtuvo una expresión disminuida de la 11 β -HSD1 a los 5 minutos, pero que se recuperó a los 10, para finalmente disminuir a los 15 minutos y mantenerse así durante el resto de las mediciones. A pesar de que a las 48 horas las 3 concentraciones de cortisona ocasionaron una disminución en la expresión, que concuerda con resultados previos, quizá no es suficiente tiempo de exposición para explicar el incremento crónico de la expresión de la enzima y su actividad en pacientes con SM debido a que los adipocitos empleados en este experimento son adipocitos recién

diferenciados y que carecen de características y componentes del nicho propio que se presenta en el tejido adiposo durante el SM. Es importante rescatar la respuesta rápida en la expresión ya que desde el primer minuto y durante los siguientes 10 minutos la expresión del mensajero se incrementa 3 veces para finalmente disminuirse súbitamente. Balachandran y sus colaboradores (2008) realizaron un experimento similar en línea celular y también *in vivo* encontrando que la línea mostraba una disminución de la expresión de la enzima mientras que la rata mostró un incremento; es importante mencionar que los tratamientos no fueron iguales para ambos experimentos pues el tratamiento sobre la línea fue de 48 horas y el tratamiento en la rata se llevó a cabo durante 6 días; así mismo las células estuvieron en un medio completamente aislado mientras que el tejido adiposo de las ratas conservó el nicho donde solo un tercio de sus células son adipocitos diferenciados. Esto nos sugiere que quizá sea necesario someter a tratamiento durante un mayor periodo de tiempo y observar una condición similar a aquella encontrada en el SM en el cultivo celular u obtener un cultivo primario de adipocitos que se han desarrollado en el nicho sano y con las modificaciones metabólicas.

Por otro lado y en concordancia con los resultados para la expresión de la enzima, se obtuvieron las lecturas de la concentración de glucosa en el medio para el tratamiento de mayor significancia (1 μ M). En estas lecturas no se observaron cambios significativos a lo largo del tiempo comparando el control y el tratamiento excepto para el minuto 10 que se encontró una disminución significativa entre ambas concentraciones (figura 23) lo cual se relaciona con la disminución en la expresión de la enzima posterior a este tiempo (figura 19). Una posible explicación para la disminución significativa en la concentración de glucosa puede ser que para que la enzima reductora 11 β -HSD1 pueda llevar a cabo su actividad debe de existir una cantidad adecuada del agente reductor NADPH. La disponibilidad de dicho agente para la actividad de la 11 β -HSD1 se ha ligado con la actividad de la enzima hexosa-6-fosfato deshidrogenasa (White *et al.*, 2007).

Ésta es la primera enzima de la fase oxidativa en la ruta de las pentosas fosfato y se encarga de formar 6-fosfogluco galactona y NADPH a partir de la Glucosa-6-fosfato, producto de la fosforilación de la glucosa libre que entra a la célula. Por ello, la entrada de glucosa a la célula podría asociarse con la disminución en la expresión suponiendo que se debe a un incremento de la proteína y en la actividad enzimática. Para poder confirmar esta hipótesis es necesario realizar una cuantificación de la proteína traducida y un ensayo enzimático (Hewitt *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2008; Dzyakanchuk *et al.*, 2008).

Retomando el SM y su estudio, desde hace tiempo se ha relacionado a las proteínas de transporte con las anomalías metabólicas. Una de estas proteínas es la acuaporina adiposa o Aqp7 cuya función es el transporte de agua y glicerol en el adipocito y otros tipos celulares favoreciendo el mantenimiento del metabolismo lipídico y de hidratos de carbono. Al transportar el glicerol hacia el medio extracelular este puede entrar en la gluconeogénesis hepática y mantener niveles de glucosa estables. Esto es de tal importancia que incluso se ha reportado que pacientes con deficiencia de esta proteína tienden a tener problemas para mantener una glucemia durante el ayuno (Kishida *et al.*, 2000; Maeda *et al.*, 2004; Walker *et al.*, 2007).

No demoró en ligarse la presencia de esta proteína con el desarrollo de complicaciones metabólicas. Estudios sobre el tejido adiposo y células adiposas reportaron disminuciones importantes del mensajero y la proteína en individuos obesos y con síndrome metabólico pero además se encontraron concentraciones menores de glicerol circulante en ellos durante periodos de ayuno o ejercicio (Ceperuelo-Mallafré *et al.*, 2007; Desbriere *et al.*, 2006; Maeda *et al.*, 2012; Portois *et al.*, 2011; Prudente *et al.*, 2007). Estudios sobre el adipocito revelaron que al disminuir la Aqp7 la célula experimentaba hipertrofia y un incremento en la reutilización del glicerol por medio un incremento en la actividad de las enzimas

glicerol quinasa (GlyK) y fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (PEPCK). Este hallazgo supone que al retener el glicerol de la lipólisis este es reutilizado para la síntesis de triglicéridos favoreciendo la hipertrofia característca de la obesidad y SM (Franckhauser *et al.*, 2002; Guan *et al.*,2002; Hara-Chikuma *et al.*, 2007; Hibuse *et al.*, 2005; MacDougald *et al.*, 2005; Tordjman *et al.*, 2004).

La presencia de las acuaporinas y sus funciones celulares son hallazgos recientes y por tanto sus estudios son limitados, en el caso de la Aqp7 estos se centran en su expresión y traducción durante el SM (tejido) y cómo se modifica su expresión y cantidad de proteína a lo largo de la diferenciación. El preadipocito carece de expresión y proteína sintetizada, el mensajero comienza a detectarse a partir del sexto día del proceso de diferenciación y la expresión de la proteína se ve incrementada y mantenida en el adipocito maduro (Fasshauer *et al.*, 2002; Miranda *et al.*, 2010). Esto ha provocado que, al igual que con la 11 β -HSD1, se desconozca la respuesta metabólica aguda a la cortisona.

Para Aqp7, los resultados obtenidos en este experimento mostraron un aumento importante de hasta 4 veces en la síntesis del mensajero para la concentraciones de cortisona 0.1 y 1 μ M en los primero 5 minutos, para disminuir a los 10 minutos, duplicar su expresión a los 15 minutos y finalmente observar una disminución hasta las 48 horas. En cuanto a la expresión relativa cuantificada para la concentración 10 μ M de la hormona los ciclos de amplificación fueron insuficientes para alcanzar el umbral lo cual se interpreta como una expresión cercana a cero; el incrementar los ciclos de amplificación nos permitiría comprobar la suposición pero es innecesario ya que datos con más de 40 ciclos se consideran poco fiables. Para explicar este fenómeno es necesario recordar que la Aqp7 es una proteína que tiende a formar tetrámeros para buscar estabilidad en la membrana (Coppo, 2008); quizá la razón por la cual se cuatuplicó su expresión es por dicha razón. Sin embargo para comprobar dicha suposición es necesario

realizar una cuantificación de la proteína posterior a la disminución en el mensajero.

En cuanto a su metabolito de transporte, las concentraciones se mantienen estadísticamente similares al control sin embargo, y a pesar de no ser significativamente diferente, al minuto 10 existe una entrada de glicerol a la célula lo cual pudiese implicar que la Aqp7, suponiendo que la proteína fue traducida y colocada a la membrana, está actuando como mecanismo de transporte hacia dentro de la célula. Esto no deja de ser una suposición puesto que no se cuantificó la proteína ni se realizaron procedimientos de inmunocitoquímica para determinar la ubicación de la proteína; tampoco se realizó un ensayo para determinar la entrada de glicerol a la célula. La inmunocitoquímica sería importante debido a que existen estudios que sugieren que otros miembros de la familias de las acuaporinas se encuentran en vesículas en el citoplasma que se movilizan hacia la membrana plasmática al ser fosforiladas; en el caso de la Aqp7 se ha vinculado la presencia de PKC con la movilización a la membrana de estas vesículas (Kishida K, 2010).

Los datos obtenidos en este trabajo muestran sin duda que la cortisona promueve cambios inmediatos en la expresión de genes de proteínas implicadas en el metabolismo. Por varios años se ha tratado de estudiar, por separado, mecanismos que ayuden a disminuir 11 β -HSD1 y aumentar Aqp7 obteniéndose resultados favorables a la condición metabólica. Así en el caso de 11 β -HSD1 se administran fármacos, tales como fenofibrato, que disminuyen su expresión e incluso su actividad y tienen resultados positivos, en pacientes y en adipocitos que presentan SM, ya que se observa una disminución de glucosa sérica, adiposidad e incluso resistencia a la insulina (Srivastava, 2009; Berger *et al.*, 2001). Por otro lado, compuestos similares o tratamientos que aumentan Aqp7 en tejido adiposo tienen resultados similares en pacientes con esta condición (Gögebakan *et al.*,

2012; Kong *et al.*, 2011; Shen *et al.*, 2012). Además de ello, existen estudios que muestran evidencia de que las citoquinas, como TNF α y la IL-6, incrementan la expresión y actividad de 11 β -HSD1 (Edwards, 2012; Srivastava, 2009; Ergang *et al.*, 2009; Tomilinson *et al.*, 2001) y uno donde estos mismos tienen el efecto contrario sobre Aqp7 (Fasshauer *et al.*, 2002). Apoyando un poco la hipótesis sobre la posibilidad de tener una regulación de Aqp7 por parte de glucocorticoides, se encontró otro estudio realizado durante la foliculogénesis de ratón, en dicho estudio se relacionó el incremento de esteroides con una disminución en Aqp7 durante ocho días de la foliculogénesis (West-Farrell *et al.*, 2008). A pesar de esto, el mecanismo por el cual los esteroides modulan la expresión de Aqp7 aún se desconoce.

Existen algunos mecanismos por los cuales los glucocorticoides pueden modular la expresión de los genes, uno de ellos son los elementos de respuesta a glucocorticoides (GRE). Hasta el momento, no se tiene reportado un GRE en el promotor del gen para AQP7, sin embargo otro miembro de la familia de AQPs, Aqp1, presenta un elemento de respuesta GRE y se ha estudiado el mecanismo de regulación de los glucocorticoides sobre su expresión (Moon *et al.*, 1997).

Por separado, los resultados parecerían incongruentes pero una vez que se integran existen concordancias. Teóricamente, se propone que la respuesta a los corticoesteroides es tardía en el metabolismo puesto que se centra en promover la expresión génica y favorecer la síntesis de proteínas que tomarán parte en el nuevo 'perfil metabólico' sobre el cual trabajará la célula. Sin embargo, a pesar de saber que se induce una respuesta tardía importante, poco se sabe sobre los efectos en la transcripción de diversos genes implicados en el metabolismo; de primera instancia se observa un cambio considerablemente significativo en la expresión de 11 β -HSD1 y Aqp7 triplicando y cuatuplicando su expresión casi de manera inmediata y disminuyen la presencia del mensajero en periodos de 5

minutos lo cual pudiese sugerir un papel crucial de los corticoesteroides en la expresión de genes que codifican proteínas de relevancia metabólica en el adipocito. Ello nos conduce a preguntarnos cuál es el mecanismo de regulación que manejan exactamente los corticoesteroides para favorecer un incremento tan brusco en los mensajeros y así mismo un decremento en su presencia en tan cortos periodos de tiempo y con qué fin. ¿Es acaso que para los 15 minutos se tradujo todo el mensajero presente? La situación más que aclarar la pregunta de investigación nos sugiere mecanismos genómicos de gran importancia mediados por corticoesteroides y nos sumerge en la duda sobre los verdaderos mecanismos celulares de respuesta a esteroides, el momento en el cual la activación de la cortisona pasa de la obesidad a la inflamación como proponen Staab y Masser (2010) y cuál es la condición fisiológica que se presenta para provocar aumento de la enzima 11 β -HSD1 y disminución en la Aqp7 crónicos en el SM. Por lo pronto, el presente estudio pone en evidencia una aparente respuesta génica importante por parte de la cortisona que pudiese estar alterada en patologías como SM y SC. Cabe mencionar que no existen estudios con los cuales se pueda comparar este mecanismo o respuestas similares a las encontradas en este experimento debido, principalmente, a que los estudios sobre la enzima 11 β -HSD1 y sobre la proteína de transporte Aqp7 utilizan tiempos de tratamiento largos (2-6 días) dejando de lado los efectos genómicos que anteceden la ya conocida respuesta tardía (posterior a la acción de la epinefrina) de la cortisona (Peckett *et al.*, 2011). Por esta razón se propone estudiar los efectos sobre la expresión génica que tienen los corticoesteroides en la condición normal y en la condición patológica (P. e. SM y SC).

Existen muchas explicaciones independientes para entender los mecanismos fisiopatológicos del SM pero quedan muchos cabos sueltos, hemos olvidado que el metabolismo es una respuesta que integra varios factores en un mismo organismo. Nos enfrentamos a una situación en la que hay un exceso de información generada y poca integración, debemos hacer un esfuerzo por orientar

las investigaciones a buscar integración de los conocimientos pues existe concordancia entre las respuestas metabólicas para diferentes proteínas y tratamientos. Lo interesante de integrar estos resultados es que las respuestas explicarán a detalle el metabolismo sin centrarse únicamente en explicar el SM.

VIII. Perspectivas.

- Identificar respuesta a exposición crónica *in vitro*.
- Cuantificar ambas proteínas.
- Determinar actividad enzimática de 11 β -HSD1.
- Verificar localización de Aqp7 en respuesta a cortisona.
- Comprobar respuesta metabólica *in vivo*.
- Identificar elementos de respuesta a corticoesteroides en el gen de AQP7.

IX. Referencias

A

Agüeros Mier María del Carmen. 2009. Efecto de las tiazolidinedionas y de la hormona de crecimiento sobre la diferenciación de tejido adiposo blanco de bovino. Tesis de maestría en ciencia y tecnología de alimentos facultad de química. Universidad Autónoma de Querétaro.

Agre P, Parker JC. 1989. Red blood cell membranes: structure, function, clinical implications. Dekker. New York.

Ailhaud G. 2001. Adipose Tissue Protocols. Vol. 155. Humana Press. Totowa NJ.

Ailhaud G., Hauner H. Development of white adipose tissue. 1998. En: GA. Bray, Claude Bouchard, W.P.T. James, editores. Handbook of Obesity. New York: Marcel Dekker Inc., p. 359-378.

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. 2002. Molecular Biology of the Cell. Cuarta Edición. Garland Science. Nueva York.

Anagnostis P., Athyros V., Tziomalos K., Karagiannis A., Mikhailidis D. 2009. The Pathogenetic Role of Cortisol in the Metabolic Syndrome: A Hypothesis. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism Vol. 94, No. 8 2692-2701.

Andrews R., Herlihy O., Livingstone D., Andres R., Walter B. 2002. Abnormal Cortisol Metabolism and Tissue Sensitivity to Cortisol in Patients with Glucose Intolerance. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism Vol. 87, No. 12 5587-5593.

B

Balachandran A., Guan H. Sellan M., van Uum S., Yang K. 2008. Insulin and Dexamethasone Dynamically Regulate Adipocyte 11-Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 1. Endocrinology 149(8):4069–4079.

Baudrana R, Domínguez JM, Carvajala CA, Riquelmeb A, Campinoa C, Micchiavelloa S, Bozinovica M, Moralesa M, Pizarrob M, Solisb N, Escalonac A, Bozac C, Arreseb M, Fardellaa CE. 2011. Overexpression of hepatic 5 α -reductase and 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in visceral adipose tissue is associated with hyperinsulinemia in morbidly obese patients. Metabolism;60(12):1775-80.

Beitz E. 2009. Aquaporins. Handb Exp Pharmacol. 2009;(190):v-vi.

Berger J, Tanen M, Ibrecht A, Hermanowski-Vosatka A, Moller DE, Wright SD, Thieringer R. 2001. Peroxisome Proliferator-activated Receptor- γ Ligands Inhibit Adipocyte 11 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 1 Expression and Activity. *The journal of biological chemistry*. Vol 276, No. 16: 12629-12638.

Bujalska I., Durrani O., Abbott J., Onyimba C., Khosla P., Moosavi A., Reuser T., Stewart P., Tomilson J., Walker E., Rauz S. 2007. Characterization of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase 1 in human orbital adipose tissue: a comparison with subcutaneous and omental fat. *Journal of Endocrinology* 192, 279–288.

C

Campbell JE, Peckett AJ, D'souza AM, Hawke TJ and Riddell MC. 2010. Adipogenic and lipolytic effects of chronic glucocorticoid exposure. *Am J Physiol Cell Physiol* 300:C198-C209.

Calvijo MA, Gómez D, Gómez A. 2007. Adipogénesis *in vitro* de células 3T3 L1. *Revista Med* 15(2): 170-176.

Champe PC, Harvey RA, Ferrier DR. 2007. *Bioquímica*. Tercera Edición McGrawHill. México.

Ceperuelo-Mallafre V, Miranda M, Chacón MR, Vilarrasa N, Megia A, Gutiérrez C, Fernández-Real JM, Gómez JM, Caubet E, Frühbeck G, Vendrell J. 2007. Adipose tissue expression of the glycerol channel aquaporin-7 gene is altered in severe obesity but not in type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab*;92(9):3640-5.

Chawla A, Repa JJ, Evans RM, Mangelsdorf DJ. 2001. Nuclear Receptors and Lipid Physiology: Opening the X-Files. *Science* Vol 204. 1865- 1870.

Cinti S. Adipose tissue morphology: basic concepts and insights. 1999. En: Guy-Grand B, Ailhaud G, editores. *Progress in Obesity Research* 8. London: John Libbey & Company Ltd., p. 3-12.

Coppo JA. 2008. Acuaporinas. *Rev. vet.* 19: 2, 167–178.

D

Dani C, Billon N. 2012. Adipocyte Precursors: Developmental Origins, Self-Renewal, and Plasticity. *Adipose Tissue Biology*. Springer. New York, NY.

Desbriere R, Vuaroqueaux V, Achard V, Boullu-Ciocca S, Labuhn M, Dutour A, Grino M. 2006. 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 mRNA is increased in both visceral and subcutaneous adipose tissue of obese patients. *Obesity (Silver Spring)*;14(5):794-8.

Dzyakanchuka AA, Balázs Z, Nasheva GL, Amreinb KE, Odermatta E. 2009. 11 β -Hydroxysteroid dehydrogenase 1 reductase activity is dependent on a high ratio of NADPH/NADP⁺ and is stimulated by extracellular glucose. *Molecular and Cellular Endocrinology* 301: 137–141.

E

Echeverría M, Zaradoya R. 2006. *Acuaporinas: Los canales de agua celulares. Investigación y Ciencia.*

Eduardo García-García, M Esp, Manuel De la Llata-Romero, M Esp, Martha Kaufer-Horwitz, Dr en CS, María Teresa Tusié-Luna, D en Gen, Raúl Calzada-León, M Esp, Verónica Vázquez-Velázquez, Psicol, Simón Barquera-Cervera, PhD, Alejandro de Jesús Caballero-Romo, M Esp, Lorena Orozco, DC, David Velásquez-Fernández, D en CM, Martín Rosas-Peralta, M Esp, Armando Barriguete-Meléndez, M Esp, Rogelio Zacarías-Castillo, M Esp, Julio Sotelo-Morales, M Esp. 2008. La obesidad y el síndrome metabólico como problema de salud pública. Una reflexión. *Salud Pública*. Vol. 50(6):530-547.

Edwards C. 2012. Sixty Years After Hench-Corticosteroids and Chronich Inflammatory Disease. *J Clin Endocrin Metab*. 97(5): 1443-51.

Ergang P, Vytácková K, Svec J, Bryndová J, Miksik I, Pácha J. 2011. Upregulation of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase 1 in lymphoid organs during inflammation in the rat. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology* 126: 19–25.

Espíndola-Antunes D, Kater CE. 2007. Adipose Tissue Expression of 11 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 1 in Cushing's Syndrome and in Obesity. *Arq Bras Endocrinol Metab*;51/8:1397-1403.

F

Fantuzzi G, Mazzone T. 2007. *Adipose tissue and adipokines in health and disease.* Humana Press, Totowa.

Farmer SR. 2006. Transcriptional control of adipocyte formation. *Cell Metab* 4:263–273.

Fasshauer M, Klein J, Lossner U, Klier M, Kralisch S, Paschke R. 2002. Suppression of Aquaporin Adipose Gene Expression by Isoproterenol, TNF α , and Dexamethasone. *Horm Metab Res*; 35: 222-227.

Fediuc S, Campbell JE, Riddell MC. 2006. Effect of voluntary wheel running on circadian corticosterone release and on HPA axis responsiveness to restraint stress in Sprague-Dawley rats. *J Appl Physiol*;100:1867-75.

Franckhauser S, Muñoz S, Pujol A, Casellas A, Riu E, Otaegui P, Su B, Bosch F. 2002. Increased fatty acid re-esterification by PEPCK overexpression in adipose tissue leads to obesity without insulin resistance. *Diabetes*: 51(3):624-30.

G

García-García E, De la Llata-Romero M, Kaufer-Horwitz M, Tusié-Luna MT, Calzada-León R, Vázquez-Velázquez V, Barquera-Cervera S, Caballero-Romo AJ, Orozco L, Velásquez-Fernández D, Rosas-Peralta M, Barriguete-Meléndez A, Zacarías-Castillo R, Sotelo-Morales J. 2008. La obesidad y el síndrome metabólico como problema de salud pública. Una reflexión. *Salud Pública Méx* 2008; Vol. 50(6):530-547.

Gesta S y Kahn CR. 2012. *White Adipose Tissue*. *Adipose Tissue Biology*. Springer. New York, NY.

Gögebakan Ö, Andres J, Biedasek K, Mai K, Kühnen P, Krude H, Isken F, Rudovich N, Osterhoff MA, Kintscher U, Nauck M, Pfeiffer AF, Spranger J. 2012. Glucose-dependent insulinotropic polypeptide reduces fat-specific expression and activity of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 and inhibits release of free fatty acids. *Diabetes*;61(2):292-300.

Grasa-Martínez MM. 2004. Glucocorticoides y Obesidad. *Rev Esp Obes* Vol. II Núm. 1, 2004: 13-30.

Gregoire FM, Smas CM, Sul HS. 1998. Understanding adipocyte differentiation. *Physiol Rev* 78:783–809.

Guan HP, Li Y, Jensen MV, Newgard CB, Steppan CM, Lazar MA. 2002. A futile metabolic cycle activated in adipocytes by antidiabetic agents. *Nat Med*:1122-8.

H

Hara-Chikuma M, Sohara E, Rai T, Ikawa M, Okabe M, Sasaki S, Uchida S, Verkman AS. 2005. Progressive adipocyte hypertrophy in aquaporin-7-deficient mice: adipocyte glycerol permeability as a novel regulator of fat accumulation. *J Biol Chem*; 280(16):15493-6.

Hara-Chikuma M, Verkman AS (2006) Physiological roles of glycerol-transporting aquaporins: the aquaglyceroporins. *Cell Mol Life Sci* 63:1386–1392.

HeffnerLJ y Schust DJ. 2010. *The Reproductive System at a Glance*. Third Edition. John Wiley & Sons Ltd. Malaysia.

Hellerstein MK. 1999. De novo lipogenesis in humans: metabolic and regulatory aspects. *Eur J Clin Nutr* 53(Suppl 1):S53–S65.

Hewitt KN, Walker EA, Stewart PM. 2006. Minireview: Hexose-6-Phosphate Dehydrogenase and Redox Control of 11-Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 1 Activity. *Endocrinology* 146(6):2539–2543.

Hibuse T, Maeda N, Funahashi T, Yamamoto K, Nagasawa A, Mizunoya W, Kishida K, Inoue K, Kuriyama H, Nakamura T, Fushiki T, Kihara S, Shimomura I. 2005. Aquaporin 7 deficiency is associated with development of obesity through activation of adipose glycerol kinase. *Proc Natl Acad Sci*. Aug 2;102(31):10993-8.

Himsworth HP. 1939. The mechanism of diabetes mellitus. *Lancet* ii,1,65,118,171.

Hirsch J, Batchelor B. 1976. Adipose tissue cellularity in human obesity. *Clin Endocrinol Metab* 5:299–311

I

Ira-Fox S. 2003. *Fisiología Humana. Séptima Edición*. McGrawHill Internacional. México, DF.

J

Jaworski K, Sarkadi-Nagy E, Duncan RE, Ahmadian M, Sul HS (2007) Regulation of triglyceride metabolism. IV. Hormonal regulation of lipolysis in adipose tissue. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 293:G1–G4.

Jessen y Stevens. 2002. Expression profiling during adipocyte differentiation of 3T3-L1 fibroblasts. *Gene* 299: 95–100.

K

Kim J, Temple KA, Jones SA, Meredith KN, Basko JL, Brady MJ. 2007. Differential Modulation of 3T3-L1 Adipogenesis Mediated by 11-Hydroxysteroid Dehydrogenase-1 Levels. *The journal of biological chemistry*. Vol. 282, No. 15, pp. 11038–11046.

Kishida K, Kuriyama H, Funahashi T, Shimomura I, Kihara S, Ouc N, Nishida M, Nishizawa H, Matsuda M, Takahashi M, Hotta K, Nakamura T, Yamashita S, Tochino Y, Matsuzawa Y. 2000. Aquaporin adipose, a putative glycerol channel in adipocytes. *J Biol Chem.*; 275(27):20896-902.

Kishida K. 2010. Aquaporins and Adipose Tissue: Lesson from Discovery to Physiopathology and to the Clinic of Aquaporin Adipose (AQP7). *Adipose Tissue In*

Health and Disease. Capítulo 8. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany.

Kong CS, Kim JA, Bak SS, Byun HG, Kim SK. 2011. Anti-obesity effect of carboxymethyl chitin by AMPK and aquaporin-7 pathways in 3T3-L1 adipocytes. *J Nutr Biochem*; (3):276-81.

Kuriyama H, Kawamoto S, Ishida N et al (1997) Molecular cloning and expression of a novel human aquaporin from adipose tissue with glycerol permeability. *Biochem Biophys Res Commun* 241:53–58

L

Life Science. 2009. 3T3 –L1 Adipocyte Differentiation Protocol. <<http://biotechprotocols.blogspot.com/2009/07/3t3-l1-adipocyte-differentiation.html>>.

Liu Y, Sun Y, Zhu T, Xie Y, Yu J, Sun W, Ding G, Hu G. 2007. 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 promotes differentiation of 3T3-L1 preadipocyte. *Acta Pharmacol Sin*; 28 (8): 1198–1204.

M

MacDougald OA, Burant CF. 2005. Obesity and metabolic perturbations after loss of aquaporin 7, the adipose glycerol transporter. *Proc Natl Acad Sci U S A*;102(31):10759-60.

Maeda K, Okubo K, Shimomura I, Mizuno K, Matsuzawa Y, Matsubara K. 1997. Analysis of an expression profile of genes in the human adipose tissue. *Gene* 190:227–235.

Maeda N, Funahashi T, Hibuse T, Nagasawa A, Kishida K, Kuriyama H, Nakamura T, Kihara S, Shimomura I, Matsuzawa Y. 2004. Adaptation to fasting by glycerol transport through aquaporin 7 in adipose tissue. *Proc Natl Acad Sci U S A*;101(51):17801-6.

Maeda N, Funahashi T, Shimomura I. 2008. Metabolic impact of adipose and hepatic glycerol channels aquaporin 7 and aquaporin 9. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab*; 4(11):627-34.

Maeda N, Hibuse T, Funahashi T. 2009. Role of aquaporin-7 and aquaporin-9 in glycerol metabolism; involvement in obesity. *Handb Exp Pharmacol*;(190):233-49.

Maeda N. 2012. Implications of aquaglyceroporins 7 and 9 in glycerol metabolism and metabolic syndrome. *Mol Aspects Med*;33(5-6):665-75.

Marrades MP, Milagro FI, Martínez JA, Moreno-Aliaga MJ. 2006. Differential expression of aquaporin 7 in adipose tissue of lean and obese high fat consumers. *Biochem Biophys Res Commun*. Jan 20;339(3):785-9.

Masuzaki H, Paterson J, Shinyama H, Morton NM, Mullins JJ, Seckl JR, Flier JS. 2001. A transgenic model of visceral obesity and the metabolic syndrome. *Science*;294(5549):2166-70.

Miranda M, Escoté X, Ceperuelo-Mallafré V, Alcaide MJ, Simón I, Vilarrasa N, Wabitsch M, Vendrell J. 2010. Paired subcutaneous and visceral adipose tissue aquaporin-7 expression in human obesity and type 2 diabetes: differences and similarities between depots. *J Clin Endocrinol Metab*;95(7):3470-9.

Moon C, King LS, Agre P. 1997. Aqp1 expression in erythroleukemia cells: genetic regulation of glucocorticoid and chemical induction. *Am J Physiol*;273: 1562-70.

Montero JC. 2000. *Obesidad en el adulto: etiopatogenia, fisiopatología, clínica y tratamiento*. D&P. Buenos Aires, Argentina.

Morales-Villegas E. 2006. Síndrome X vs síndrome metabólico: Entendiendo sus coincidencias y sus diferencias hacia una “nueva cardiología”. *Archivos de Cardiología de México*. 76: 173-188.

Moreno-Navarrete JM , Fernández-Real JM. 2012. *Adipocyte Differentiation. Adipose Tissue Biology*. Springer. New York, NY.

Muñoz Calvo, MT. 2007 Síndrome metabólico. *Pediatr Integral XI (7)*: pp. 615-622.

N

Nicholls DG, Locke RM. 1984. Thermogenic mechanisms in brown fat. *Physiol Rev* 64:1–64

O

Oficina Española de Patentes y Marcas. 2006. Una combinación de inhibidores de FBPasa y sensibilizantes de insulina para el tratamiento de la diabetes. España.

Olaiz-Fernández G, Rivera-Dommarco J, Shamah-Levy T, Rojas R, Villalpando-Hernández S, Hernández-Avila M, Sepúlveda-Amor J. *Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2006*. Cuernavaca, México: Instituto Nacional de Salud Pública.

P

Park JS, Rhee SD, Kang NS, Jung WH, Kim HY, Kim JH, Kang SK, Cheon GH, Jin, Ahn JH, Kim KY. 2011. Anti-diabetic and anti-adipogenic effects of a novel selective 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 inhibitor, 2-(3-benzoyl)-4-hydroxy-1,1-dioxo-2H-1, 2-benzothiazine-2-yl-1-phenylethanone (KR-66344). *Biochemical Pharmacology* 81: 1028–1035.

Peckett AJ, Wright DC, Riddell MC. 2011. The effects of glucocorticoids on adipose tissue lipid metabolism. *Metabolism*. 60(11):1500-10.

Pereira CD, Azevedo I, Monteiro R, Martins MJ. 2012. 11 β -Hydroxysteroid dehydrogenase type 1: relevance of its modulation in the pathophysiology of obesity, the metabolic syndrome and type 2 diabetes mellitus. *Diabetes, Obesity and Metabolism* 14: 869–881.

Pérez Miguelsanz MJ, Cabrera Parra W, Varela Moreiras G, Garaulet M. 2010. Distribución regional de la grasa corporal. Uso de técnicas de imagen como herramienta de diagnóstico nutricional. *Nutr Hops*; 25(2): 207-223.

Pocock G, Richards CD. 2005. *Fisiología Humana, la base de la Medicina*. Segunda Edición. Maason. Barcelona.

Portois L, Zhang Y, Perret J, Louchami K, Gaspard N, Hupkens E, Bolaky N, Delforge V, Beauwens R, Malaisse WJ, Sener A, Carpentier YA, Delporte C. 2012. Glycerol metabolism alteration in adipocytes from n3-PUFA-depleted rats, an animal model for metabolic syndrome. *Horm Metab Res* (1):28-32.

Prudente S, Flex E, Morini E, Turchi F, Capponi D, De Cosmo S, Tassi V, Guida V, Avogaro A, Folli F, Maiani F, Frittitta L, Dallapiccola B, Trischitta V. 2007. A functional variant of the adipocyte glycerol channel aquaporin 7 gene is associated with obesity and related metabolic abnormalities. *Diabetes*;56(5):1468-74.

Pulido Toledano MR. 2010. *Mecanismos moleculares y celulares de la acción de Rab18 en adipocitos*. Tesis Doctoral. Universidad de Córdoba.

Q

R

Ramji DP, Foka P. 2002. CCAAT/enhancer-binding proteins: structure, function and regulation. *Biochem J* 365:561–575.

Rodríguez de la Concepción ML. 2004. *Diferenciación Adipocitaria y Factores Reguladores de la Biogénesis Mitocondrial. Efectos de los Fármacos Antiretrovirales*. Tesis de Doctorado en Biología. Departament de Bioquímica i Biologia Molecular. Uniersitat de Barcelona.

Rojas D. 2009. Efecto de la restricción clorídico-proteico sobre la adipogénesis. Tesis de Licenciatura en quimicofarmacobiología. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

Rosen ED, Spiegelman BM. 2000. Molecular regulation of adipogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 16:145–171

S

Sanhueza CJ, Valenzuela AB. 2006. Receptores nucleares y regulación de la expresión génica por ácidos grasos poliinsaturados: algo más que producción de energía y esencialidad. *Rev Chil Nutr Vol.* 33, N°2: 150-161.

Sepúlveda J. 2006. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2006 (ENSANUT 2006). México: Instituto Nacional de Salud Pública.

Shen FX, Gu X, Pan W, Li WP, Li W, Ye J, Yang LJ, Gu XJ, Ni LS. 2012. Over-expression of AQP7 contributes to improve insulin resistance in adipocytes. *Exp Cell Res*;318(18):2377-84.

Spalding KL, Arner E, Westermark PO, Bernard S, Buchholz BA, Bergmann O, Blomqvist L, Hoffstedt J, Naslund E, Britton T, Concha H, Hassan M, Ryden M, Frisen J, Arner P. 2008. Dynamics of fat cell turnover in humans. *Nature* 453:783–787.

Srivastava RAK. 2009. Fenofibrate ameliorates diabetic and dyslipidemic profiles in KKAY mice partly via down-regulation of 11 β -HSD1, PEPCK and DGAT2. Comparison of PPAR α , PPAR γ , and liver x receptor agonists. *European Journal of Pharmacology* 607: 258–263.

Staab y Maser. 2010. 11-Hydroxysteroid dehydrogenase type 1 is an important regulator at the interface of obesity and inflammation. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology* 119. 56–72.

Stewart P. 2003. Tissue-specific Cushing's syndrome, 11 β -hydroxysteroid dehydrogenases and the redefinition of corticosteroid hormone action. *European Journal of Endocrinology Eur J Endocrinol.* 149(3):163-8.

T

Tang QQ, Grønborg M, Huang H, Kim JW, Otto TC, Pandey A, Lane MD. 2005. Sequential phosphorylation of C/EBP β by MAPK and GSK3 β is required for adipogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:9766–9771.

Tomilinson J y Stewart P. 2002. The Functional consequences of 11 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase Expression in Adipose Tissue. *Horm Metab Res*; 34: 746-751.

Tomilinson JW, Moore J, Cooper MS, Bujalska , Shahmanesh M, Burt C, Strain A, Hewison M, Stewart PM. 2001. Regulation of Expression of 11 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 1 in Adipose Tissue: Tissue-Specific Induction by Cytokines. *Endocrinology*. Vol. 142. No. 5: 1982-1989.

Tomlinson J., Walker E., Bujalska I., Draper N., Lavery G., Cooper M., Hewison M., Stewart P. 2004. 11 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 1: A Tissue-Specific Regulator of Glucocorticoid Response. *Endocrine Reviews* 25 (5): 831-866.

Tomilinson JW, Finney J, Hughes BA, Hughes SV, Stewart PM. 2008. Reduced Glucocorticoid Production Rate, Decreased 5-Reductase Activity, and Adipose Tissue Insulin Sensitization After Weight Loss. *Diabetes* 57: 1536–1543.

Tontonoz P, Hu E, Spiegelman BM. 1994. Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR γ 2, a lipid- activated transcription factor [published erratum appears in *Cell* 1995 Mar 24;80(6):following 957]. *Cell* 79:1147–1156.

Tordjman J, Khazen W, Antoine B, Chauvet G, Quette J, Fouque F, Beale EG, Benelli C, Forest C. 2003. Regulation of glyceroneogenesis and phosphoenolpyruvate carboxykinase by fatty acids, retinoic acids and thiazolidinediones: potential relevance to type 2 diabetes. *Biochimie*;85(12):1213-8.

Torres-Ramírez Nayeli. 2009. Efecto de la Nicotinamida sobre la Expresión y Actividad de la Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa en células 3T3-L1 en condiciones de hiperglucemia. Tesis de Maestría en Ciencias en Biomedicina y Biotecnología Molecular. Instituto Politécnico Nacional.

U

UNICEF 2011. El doble reto de la malnutrición y la obesidad. Salud y Nutrición. Salud y Niñez. UNICEF, México.

V

Vázquez-Contreras E. 2003. Las hormonas esteroides. *Bioquímica y Biología Molecular* En Línea <<http://laguna.fmedic.unam.mx/~evazquez/0403/hormonas%20esteroides.html>>.

Velazquez. 2010. Corticoesteroides. Departamento de ciencias Fisiológicas. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá. <<http://med.javeriana.edu.co/fisiologia/Farmacoweb.htm>>.

Vera Ávila HR, Mejía Guadarrama CA, Zarco Quintero LA, Caballero Chacón S. 2010. Sistema Nervioso Endócrino. Fisiología Veterinaria e Introducción a la Fisiología de Procesos Productivos. UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO. México, DF.

Villalobos-Chaves G. 2003. Glucocorticoides. Centro Nacional de Información de Medicamentos. Instituto de Investigaciones Farmacéuticas. Facultad de Farmacia. Universidad de Costa Rica.

Veilleux A, Rhéaume C, Daris M, Luu-The V, Tchernof A. 2009. Omental Adipose Tissue Type 1 11-Hydroxysteroid Dehydrogenase Oxoreductase Activity, Body Fat Distribution, and Metabolic Alterations in Women. *J Clin Endocrinol Metab*, 94(9):3550–3557

W

Walker BR. 2006. Cortisol--cause and cure for metabolic syndrome? *Diabet Med*; 23(12):1281-8.

Walker CG, Holness MJ, Gibbons GF, Sugden MC. 2007. Fasting-induced increases in aquaporin 7 and adipose triglyceride lipase mRNA expression in adipose tissue are attenuated by peroxisome proliferator-activated receptor alpha deficiency. *Int J Obes*. (7):1165-71.

Wayne DW. 2008. Bioestadística: Base para el análisis de las ciencias de la salud. Cuarta Edición. Limusa Wiley. México.

West-Farrell ER, Xu M, Gomberg MA, Chow YH, Woodruff TK, Shea LD. 2008. The mouse follicle microenvironment regulates antrum formation and steroid production: alterations in gene expression profiles. *Biol Reprod*;80(3):432-9.

White PC, Rogoff D, McMillan DR, Lavery GG. 2007. Hexose 6-phosphate dehydrogenase (h6pd) and corticosteroid metabolism. *Mol Cell Endocrinol*; 265-266: 89–92.

X

Y

Z

Zardoya R. 2005. Phylogeny and evolution of the major intrinsic protein family. *Biol Cell* 97:397–414.

Zhang Y, Zhong X, Gjoka Z, Li Y, Stochaj W, Stahl M, Kriz R, Tobin JF, Erbe D, Suri V. 2009. H6PDH interacts directly with 11b-HSD1: Implications for determining the directionality of glucocorticoid catalysis. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 483: 45–54.

Zhao L, Gregoire F, Sook Sul H. 2000. Transient induction of ENC-1, a Kelch-related actinbinding protein, is required for adipocyte differentiation. *J Biol Chem* 275:16845–16850.

Zhou J, Cidlowski JA. The human glucocorticoid receptor: one gene, multiple proteins and diverse responses. *Steroids*;70:407-17.