

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO**

**FACULTAD DE QUÍMICA  
MAESTRIA EN CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS**

**“EFECTOS *IN VITRO* DE LA HORMONA DE CRECIMIENTO EN  
LA DIFERENCIACIÓN DE ADIPOCITOS BEIGE”**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

**MAESTRO EN CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS**

**PRESENTA**

**BIOTECNÓLOGA ANDREA HERNÁNDEZ MENDOZA**

**DIRIGIDA POR**

**Dra. LAURA CRISTINA BERUMEN SEGURA  
Dra. MARICELA LUNA MUÑOZ**

**SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, 2016.**



Universidad Autónoma de Querétaro  
Facultad de Química

Maestría en Ciencias Químico Biológicas

**TESIS**

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de:

**Maestra en Ciencias Químico Biológicas**

**Presenta:**

**Biotecnóloga Andrea Hernández Mendoza**

**Dirigido por:**

**Dra. Laura Cristina Berumen Segura**

**Dra. Maricela Luna Muñoz**

**Con tema de tesis:**

**“EFECTOS *IN VITRO* DE LA HORMONA DE CRECIMIENTO EN LA  
DIFERENCIACIÓN DE ADIPOCITOS BEIGE”**

**SINODALES**

**Dra. LAURA CRISTINA BERUMEN SEGURA**  
PRESIDENTE

**Dra. MARICELA LUNA MUÑOZ**  
SECRETARIO

**Dra. GUADALUPE GARCÍA ALCOCER**  
VOCAL

**Dra. JESICA E. ESCOBAR CABRERA**  
SUPLENTE

**M. en C. MARTHA E. CARRANZA SALAS**  
SUPLENTE

**M.S.P. Sergio Pacheco Hernández**  
Director de la Facultad de Química

**Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña**  
Directora de investigación y Posgrado

## RESUMEN

Los adipocitos son las células principales del tejido adiposo. Una de sus funciones es el almacén de energía en forma de triglicéridos. Existen tres tipos de adipocitos diferenciados por sus características y marcadores particulares, el blanco, marrón y beige, de los cuales, los dos últimos tienen la capacidad de liberar energía en forma de calor debido a un proceso llamado termogénesis. Como alternativa a la patología de obesidad se buscan factores importantes que promuevan el aumento en número y actividad de estos últimos, por su capacidad termogénica, siendo de mayor relevancia el beige por compartir depósitos con el tejido adiposo blanco. Estudios previos han mostrado los diversos efectos de la hormona de crecimiento (somatotropina) en el tejido adiposo como: la lipólisis, la diferenciación de preadipocitos y la expresión de la proteína UCP-1 para aumentar la termogénesis en el tejido adiposo marrón. Por lo tanto, el objetivo del presente trabajo fue determinar el efecto de la hormona de crecimiento en la diferenciación de preadipocitos a adipocitos beige mediante la determinación de uno de los marcadores principales de los adipocitos beige, CD137. Se trabajó con tres grupos de células 3T3-L1: uno con inducción a adipocito blanco y otro con inducción a adipocito beige, como controles, y un tercer grupo con inducción a adipocito beige suplementado con hormona de crecimiento. Se observaron los cambios en la forma y complejidad de las células mediante microscopía de luz a lo largo de todo el proceso al igual que el grado de diferenciación mediante la técnica de rojo oleoso. De igual forma se evaluó la expresión proteica de CD137 mediante citometría de flujo, al igual que los marcadores CITED1, en adipocitos beige, y TCF21, en adipocitos blancos, mediante western blot y PCR punto final. Los resultados mostraron que no existe diferencia estadística significativa en la acumulación de lípidos entre los grupos de células diferenciadas, sin embargo, sí existe diferencia en la forma de las gotas lipídicas así como su organización en la célula. De igual forma, se corrobora la diferenciación a adipocito blanco con la expresión de TCF21 y la diferenciación a adipocito beige con la expresión de CITED1, sin embargo, al comparar entre todos los grupos mediante citometría de flujo para el marcador CD137, el grupo de células con el estímulo de diferenciación a adipocitos beige con y sin hormona de crecimiento presentaron menor expresión del marcador respecto a los demás grupos, contrario a lo esperado. De acuerdo a los resultados, y bajo las condiciones de exposición y tratamiento, la hormona de crecimiento no tiene efecto sobre la expresión del marcador CD137 en el proceso de diferenciación a adipocito beige.

**Palabras clave.** Adipocito beige, CD137, termogénesis, somatotropina diferenciación.

## **SUMMARY**

Adipocytes are the main cells of adipose tissue, having as one of its main functions the storage of energy in the form of triglycerides. There are three types of adipocytes differentiated by their characteristics: white, brown and beige. The brown and beige adipocytes have the ability to release energy as heat through a process called thermogenesis. As an alternative to the pathology of obesity, it is important to develop factors that promote the increase in number and activity of the brown and beige adipocytes, being more important for us, the adipocyte beige because it shares deposits with white adipose tissue. Previous studies have shown the different effects of growth hormone (somatotropin) in adipose tissue as lipolysis, preadipocyte differentiation and expression of UCP-1 protein to increase thermogenesis in brown adipose tissue. Therefore, the objective of this work was to determine the effect of growth hormone in the differentiation of preadipocytes cell line 3T3-L1 to beige adipocytes by the measure of one of the markers of beige adipocytes, CD137. We used three groups of cell culture, one was worked with white induction and the second with beige induction. The third group was the beige induction with growth hormone. The adipocyte morphology and differentiation was determined by the oil red procedure and light microscope observation. Finally, the protein expression of CD137 was evaluated as one of the specific markers of beige adipocytes. We evaluated changes in the shape and complexity of the cells by light microscopy throughout the whole process as well as the degree of differentiation by the oily red technique. In the same way, CD137 protein expression was evaluated by flow cytometry, as well as CITED1 marker in beige adipocytes and TCF21 in white adipocytes by western blot and end point PCR. The results showed that there is no significant statistical difference in lipid accumulation between groups of differentiated cells, however, we showed differences in the form of lipid droplets as well as their organization in the cell. We corroborated the differentiation to white adipocyte with the expression of TCF21 and the differentiation to adipocyte beige with the expression of CITED1. However, when comparing all groups by flow cytometry for the marker CD137, the group of cells with the stimulus of differentiation to beige adipocytes with and without growth hormone showed lower expression of the marker with respect to the other groups, contrary to what was expected. According to the results, and under the conditions of exposure and treatment, the growth hormone has no effect on the expression of the marker CD137 in the process of differentiation to beige adipocyte.

**Keywords:** Beige adipocyte, CD137, thermogenesis, somatotropin, differentiation

## DEDICATORIAS

A mis padres, María y José Luis. Porque sin su esfuerzo y apoyo yo no estaría logrando esta meta. Gracias por siempre estar, por ser mi impulso, por su amor, comprensión y enseñarme que si me esfuerzo puedo lograr lo que me proponga. Porque mi mejor ejemplo siempre han sido ustedes, que me inculcaron el valor del trabajo y dedicación. Son mi mejor motivación y todo lo que hago es por y para ustedes. Los amo y los admiro.

A mis hermanas, Adriana y Daniela. Gracias por ayudarme en todo momento. Por creer en mí y motivarme. Porque sé que siempre podré contar con ustedes. Me han guiado en el camino y motivado. Son mi orgullo. Las amo, siempre juntas.

A mis dos hermosas sobrinas Miranda y Valeria. Porque con su alegría han aliviado esos días difíciles y me han recordado que tengo dos grandes razones para ser mejor día a día. Porque quiero ser un buen ejemplo para ustedes y mostrarles que puede que el camino no sea sencillo, pero para eso estamos su familia, y yo siempre las apoyaré. Las amo mis chusiras.

A mis abuelitos, Uva y Papá Nino, porque siempre me han apoyado. No importa lo que elija, me han enseñado que si es lo que yo quiero y disfruto, entonces es lo correcto. Por su amor y preocupación. Porque siempre que estoy junto a ellos me siento protegida y motivada. Gracias por siempre estar. Los amo.

A la Dra. Laura. Gracias por apoyarme a lo largo de estos dos años en todo el proceso. Por creer en mí y mi proyecto, y poner todo su esfuerzo para sacarlo adelante. Por preocuparse por mí en todo momento, no sólo a nivel profesional, también personal. Por guiarme y enseñarme como ser investigadora. Espero un día poder ser excelente como usted. Mi cariño, agradecimiento y admiración siempre.

## **AGRADECIMIENTOS**

Este trabajo se realizó en la Universidad Autónoma de Querétaro y en el Instituto de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México, Campus Juriquilla; se agradece los apoyos por parte del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) con beca nacional, FOMIX M0016-2014-03 250289 y DGAPA -PAPIIT UNAM IN206115.

A la Dra. Laura Cristina Berumen Segura por su incomparable conocimiento y darme la oportunidad de aprender en su laboratorio. Gracias también por su valiosa amistad y apoyo a lo largo de todo el proceso. Por preocuparse por mí y motivarme en cada paso durante estos dos años. Gracias por ser mi mentora, tuve la gran oportunidad de formarme con la mejor, no sólo como investigadora, también como ser humano.

A mi comite tutorial, la Dra. Maricela Luna Muñoz, Dra. Guadalupe García Alcocer, Dra. Jesica E. Escobar Cabrera y M. en C. Martha E. Carranza Salas por abrirme las puertas en sus laboratorios y brindarme el apoyo tanto técnico como intelectual a lo largo de mi formación. Gracias infinitas por compartir conmigo su conocimiento.

A todas las personas que compartieron conmigo el camino, amigos en el laboratorio y compañeros de generación, por sus palabras de aliento y apoyo. Por todos los gratos momentos compartidos que hicieron de este viaje uno de los mejores en mi vida. Gracias por el cariño, paciencia, conocimiento. De todos me llevo un aprendizaje y un valor para aplicar en mi vida como profesionista y ser humano.

## ÍNDICE GENERAL

	Página
Contenido	
RESUMEN	i
SUMMARY	ii
DEDICATORIAS	iii
AGRADECIMIENTOS	iv
ÍNDICE GENERAL	v
ÍNDICE DE CUADROS	viii
ÍNDICE DE FIGURAS	ix
ANEXO I	xi
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	3
II.1 Componentes del tejido adiposo	3
II.1.1 Adipocito	4
II.1.2 Tipos de adipocitos	5
II.1.2.1 Adipocito blanco	5
II.1.2.1.1 Distribución del tejido adiposo blanco	5
II.1.2.2 Adipocito marrón	7
II.1.2.2.1 Distribución del tejido adiposo marrón	8
II.1.2.3 Adipocito beige	9
II.1.2.3.1 Localización del adipocito beige: diferencias entre el adipocito beige humano y murino	10
II.2 Origen del adipocito: diferenciación	12
II.2.1 Modelos de estudio: células 3T3-L1	13
II.2.2 Factores de transcripción involucrados en la diferenciación	14
II.2.3 Factores de transcripción involucrados en la diferenciación marrón y beige	15
II.2.4 Origen del adipocito blanco y marrón	16
II.2.5 Origen del adipocito beige	17

II.3 Marcadores específicos de cada tipo de adipocito	19
II.4 Adipocito beige y su actividad termogénica: alternativa contra la Obesidad	22
II.4.1 Terapias actuales contra la obesidad	24
II.4.2 Problemática de las terapias actuales contra obesidad	25
II.4.3 Alternativas terapéuticas	26
II.5 Acción de factores endócrinos en el tejido adiposo	27
II.5.1 Hormona Tiroidea	27
II.5.2 Glucocorticoides	28
II.5.3 Factor de crecimiento de fibroblastos (FGF21)	29
II.5.4 Proteína morfogénica de hueso (BMP)	30
II.5.5 Ácido Retinoíco	31
II.5.6 Hormona de crecimiento (GH): Funciones	32
II.5.6.1 Receptor de la hormona de crecimiento	33
II.5.6.2 Hormona de crecimiento y obesidad	34
II.6 Hormona de crecimiento y su efecto en el adipocito	35
II.6.1 Vías de señalización de la hormona de crecimiento en el adipocito	36
II.6.1.1 Vía JAK-STAT	36
II.6.1.2 Vía Ras-MAPK	37
II.6.1.3 Vía PI3K	37
II.6.2 Hormona de crecimiento y adipocito beige	37
III. JUSTIFICACIÓN	39
IV. HIPÓTESIS	40
V. OBJETIVOS	41
V.1 General	41
V.2 Específicos	41
VI. MATERIALES Y MÉTODOS	42
VI.1 Estrategia Experimental	42

VI.2 Materiales	43
VI.2.1 Material Biológico: Cultivo celular	43
VI.2.2 Diferenciación de las células 3T3-L1: Controles y efecto de la hormona de crecimiento (GH).	43
VI.3 Métodos	46
VI.3.1 Microscopia: Observación del progreso de diferenciación	46
VI.3.2 Rojo Oleoso: Determinación del grado de diferenciación	47
VI.3.3 Determinación de la expresión proteica de CD137 mediante citometría de flujo	47
VII. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	48
VIII.RESULTADOS Y DISCUSIONES	49
VIII.1 Evaluación de los cambios durante la diferenciación de las células 3T3-L1 mediante microscopía de luz.	49
VIII.2 Evaluación de la diferenciación mediante la técnica de rojo oleoso	54
VIII.3 Evaluación de la expresión del marcador de adipocitos beige cd137	59
IX. BIBLIOGRAFÍA	66
X. ANEXO I	79

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Diferencias entre adipocito marrón y beige.	10
2	Marcadores específicos expresados en cada tipo de adipocito.	20
3	Medicamentos utilizados para el tratamiento de la obesidad.	25

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Diferentes componentes celulares del tejido adiposo.	3
2	Los diferentes tipos de adipocitos.	4
3	Depósitos de tejido adiposo blanco en humanos.	6
4	Localización del tejido adiposo marrón en infantes y adultos.	8
5	Diferencias en la localización del adipocito beige entre murinos y humanos.	12
6	Diferenciación de célula progenitora en cada tipo de adipocito maduro.	18
8	Vías de señalización de la hormona de crecimiento.	33
9	Representación esquemática de la estrategia experimental.	42
10	Esquema que muestra los días de tratamiento y las concentraciones utilizadas para la diferenciación a adipocito blanco	44
11	Esquema que muestra los días de tratamiento y las concentraciones utilizadas para la diferenciación a adipocito beige	45
12	Esquema que muestra los días de tratamiento y las concentraciones utilizadas para la diferenciación a adipocito beige suplementado con hormona de crecimiento	46
13	Ensayo de diferenciación en células 3T3-L1 al inicio del tratamiento	50
14	Progreso del ensayo de diferenciación en células 3T3-L1.	51

Figura		Página
15	Progreso del ensayo de diferenciación en células 3T3-L1 durante el día 5 de tratamiento.	53
16	Fin del ensayo de diferenciación en células 3T3-L1.	54
17	Ensayo de rojo oleoso en células 3T3-L1 diferenciadas.	55
18	Contenido lipídico determinado mediante la técnica de rojo oleoso en células 3T3-L1 diferenciadas.	58
19	Expresión del marcador CD137 en los diferentes grupos de diferenciación.	61
20	Gráficas del análisis de tamaño (FSC-A) y complejidad (SSC-A) de los diferentes grupos de tratamiento.	62
21	Expresión de marcadores específicos en los grupos de adipocitos diferenciados blancos y beige.	81

## ANEXO I

	Página
VI.3.1' Determinación de la expresión génica de marcadores de adipocitos blancos Y beige mediante PCR punto final	78
VI.3.2' Determinación de la expresión proteica mediante Western Blot	78
Cuadro 4 Oligonucleótidos de los genes marcadores de adipocitos blancos y beige.	78
Figura 21 Expresión de marcadores específicos en los grupos de Adipocitos diferenciados a blancos y beige	80



## I. INTRODUCCIÓN

El tejido adiposo es un tejido que almacena triglicéridos y funciona de manera endocrina secretando hormonas. Un desequilibrio en la acumulación de triglicéridos genera obesidad, y con ello patologías secundarias como enfermedades cardiovasculares, daño renal y diabetes tipo II, entre otras, por lo cual en los últimos años se ha generado especial enfoque en su estudio, ya que, el incremento en los índices de obesidad en la población mundial es alarmante, de acuerdo a reportes publicados por la Organización Mundial de la Salud.

El tejido adiposo se clasifica normalmente en tejido adiposo blanco y marrón, ambos diferenciados entre sí por sus características de localización anatómica general, ya que se ubican de manera independiente, sin embargo, se ha encontrado que no están aislados el uno del otro, con el reciente descubrimiento de adipocitos marrones en sitios característicos del tejido adiposo blanco. Estos adipocitos reciben el nombre de beige (o *brite*, del inglés “*brown in white*”).

El origen de los adipocitos beige no está del todo claro, lo que ha originado el inicio de varias investigaciones, encontrando dos teorías acerca de cómo surge este adipocito en particular. Una de ellas señala que existe transdiferenciación de adipocito blanco a tipo beige y la segunda que se genera a partir de un mismo progenitor en tejido adiposo blanco.

El efecto de agentes terapéuticos endócrinos se ha estudiado en la diferenciación y proliferación de ambos tipos de tejido adiposo. Se conoce el efecto de la hormona de crecimiento (GH) en el control de la diferenciación y proliferación de preadipocitos del tejido adiposo blanco, al igual que su efecto

en lipólisis. Otro mecanismo observado ha sido la inhibición en la diferenciación de preadipocitos de tejido adiposo blanco en cultivo primario, lo cual no se refleja en la estimulación de su proliferación, obteniendo un resultado contrario. De igual forma se ha encontrado efecto de la hormona de crecimiento (GH) en el aumento de la masa de tejido adiposo marrón bajo la administración de dosis altas en ratones. Los resultados observados para la hormona del crecimiento varían de acuerdo a la metodología utilizada, sin embargo, no se tiene claro aún su efecto en los adipocitos beige.

## II. ANTECEDENTES

### II.1. Componentes del tejido adiposo

La principal célula que compone al tejido adiposo es el adipocito, un tipo de células encargadas de almacenar el exceso de energía en forma de triglicéridos para movilizar así los ácidos grasos libres cuando éstos se requieren; sin embargo, no es el único componente celular que se encuentra en el tejido. Otros tipos celulares contribuyen a su crecimiento y función, dentro de los cuales encontramos a los preadipocitos (llamadas también progenitoras, que estarán ya comprometidas y se encuentran en la fracción del estroma vascular del tejido adiposo), linfocitos o células T, fibroblastos y células vasculares (Figura 1). En un estado de obesidad, se presentan cambios en todos los tipos celulares que conforman al tejido adiposo, tanto en su morfología como en número (Ouchi y col., 2011; Lee y col., 2014c).

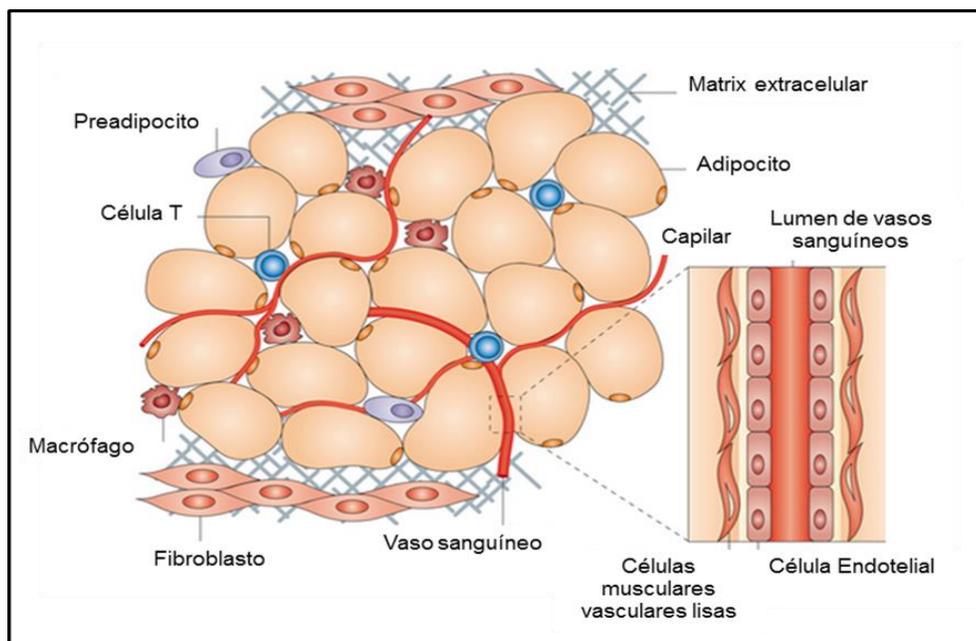


Figura 1. Diferentes componentes celulares del tejido adiposo (Modificado de Ouchi y col., 2011)

### II.1.1. Adipocito

Los adipocitos son las células principales del tejido adiposo cuya principal función es almacenar triglicéridos en respuesta al exceso en el consumo de alimentos, sin embargo, no es la única, ya que también tiene la habilidad de liberarlos ante una deficiencia de energía, al igual que producir y secretar hormonas específicas del tejido adiposo llamadas adipocinas, cuya función es regular la homeostasis de energía en otros tejidos, aunado a que son células sensibles a la insulina, con lo cual se podrían englobar éstas como sus principales funciones. Cuando se presentan deficiencias en cualquiera de dichas funciones, como en estados de obesidad, se rompe la homeostasis (Sarjeant y Stephens, 2012).

Existen diferentes tipos de adipocitos (Figura 2), clasificados con base en su coloración particular, dada por la cantidad de lípidos contenidos en la célula así como de un tipo de organelo, la mitocondria. Estas características pueden ser diferenciadas mediante microscopía y con ellos denominar a los adipocitos blancos, marrones y beige (Rutkowski y col., 2015).

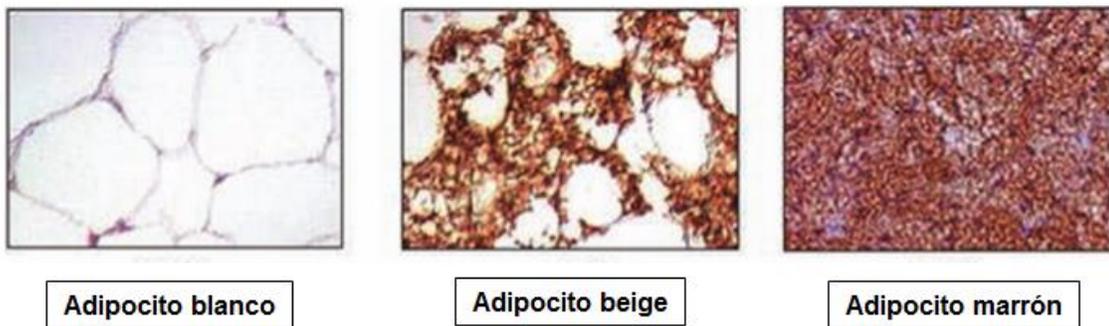


Figura 2. Los diferentes tipos de adipocitos (Modificado de Feng y col., 2013).

## **II.1.2. Tipos de adipocitos**

### **II.1.2.1. Adipocito blanco**

Los adipocitos blancos son células generalmente esféricas con sus organelos reacomodados en los extremos debido a la presencia de una gota lipídica única que ocupa el citosol en su mayoría. El núcleo está localizado entre ésta y la membrana plasmática. Los demás organelos como mitocondrias, aparato de Golgi y retículo endoplasmático están distribuidos alrededor (Sarjeant y Stephens, 2012).

Dentro de la gota lipídica, los adipocitos blancos, almacenan lípidos en forma de triglicéridos mediante un proceso denominado esterificación, la cual se lleva a cabo como respuesta positiva ante la alimentación evitando así la citotoxicidad de éstos en otros tipos celulares (Rutkowski y col., 2015).

De igual forma, así como se lleva a cabo el almacén de triglicéridos ante el incremento en el consumo de alimentos, también se puede llevar a cabo su degradación ante la necesidad de energía, proceso que recibe el nombre de lipólisis la cual es activada en respuesta al estímulo de diferentes hormonas (Brasaemle y col., 2004).

#### **II.1.2.1.1. Distribución del tejido adiposo blanco**

El tejido adiposo blanco se encuentra distribuido a lo largo del cuerpo humano, identificando dos grandes clasificaciones, el tejido adiposo subcutáneo y el tejido adiposo visceral (Figura 3). El primero se encuentra localizado debajo de la piel, diferenciando entre subtipos y distribución, el cual incluye al inter-escapular y axilar localizado en la región escapular, y el inguinal localizado

adjunto dorsalmente a lo largo de la pelvis hacia el muslo de la extremidad posterior (Sánchez-Gurmaches y Guertin, 2014).

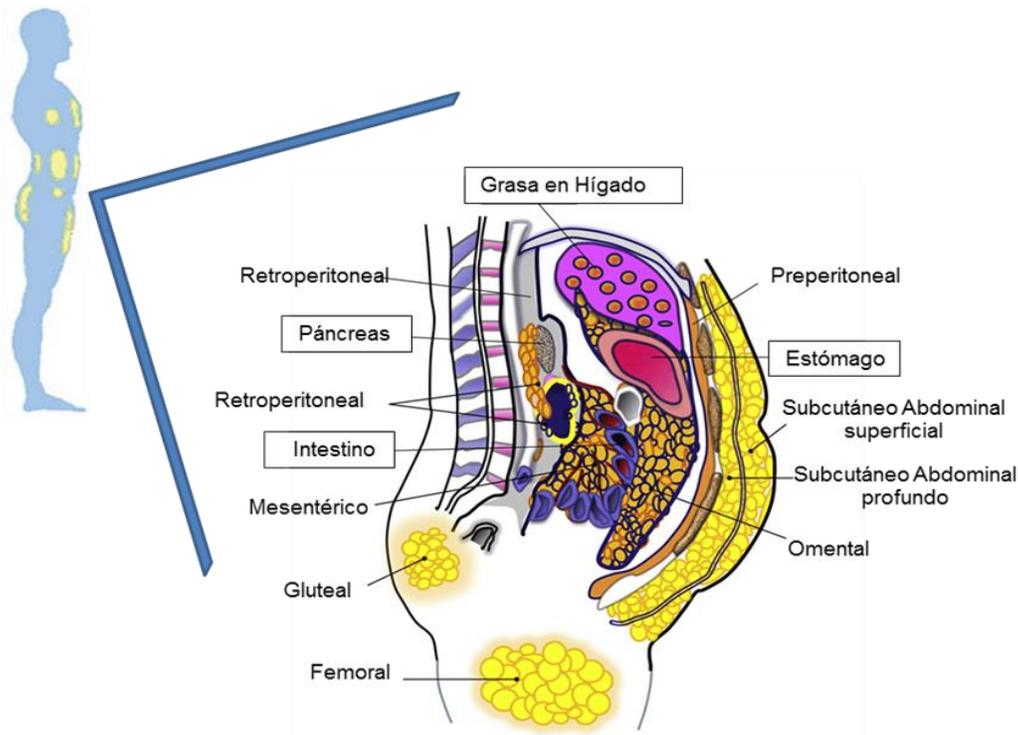


Figura 3. Depósitos de tejido adiposo blanco en humanos (Modificado de Lee y col., 2013; Park y col., 2014).

El tejido adiposo visceral, se encuentra localizado dentro del peritoneo y está distribuido alrededor de los órganos internos. Al igual que el tejido adiposo subcutáneo, tendrá clasificaciones que dependerán de su localización, tal como mesentérico, el cual es parte del soporte de los intestinos recubriendo su superficie; retroperitoneal que se encuentra dentro de la cavidad abdominal a lo largo de la parte dorsal del abdomen encontrándose detrás del riñón pero no conectado a éste o mezclado con la grasa marrón peri-renal; peri-gonadal que, como su nombre lo indica, está relacionado con el útero y los ovarios en mujeres, mientras que en hombre está unido a epidídimo y testículos; y finalmente el tejido adiposo visceral omental se refiere al localizado alrededor

del estómago y el bazo (Sánchez-Gurmaches y Guertin, 2014; Park y col., 2014).

### **II.1.2.2. Adipocito marrón**

Los adipocitos marrones son células más pequeñas que los adipocitos blancos, y contienen como característica distintiva particular, gotas lipídicas y mitocondrias múltiples; éstas últimas expresan la proteína UCP-1 responsable del proceso de termogénesis en los adipocitos marrones. Además, su núcleo está relativamente centrado (Sarjeant y Stephens, 2012).

El adipocito marrón constituye al tejido adiposo marrón el cual es considerado un órgano termogénico, por su función en mantener la temperatura promedio bajo control ante una exposición al frío, siendo muy abundante en recién nacidos y, recientemente, se ha descubierto que está presente y activo en menor proporción en adultos. La importancia que tienen los adipocitos marrones es su actividad termogénica la cual está inversamente relacionada con el índice de masa corporal y la edad (Feng y col., 2013).

Con base en lo mencionado, la función principal del adipocito marrón es la producción de calor, acción en la cual está involucrada la proteína UCP-1 (del inglés *Uncoupling Protein*) que se encuentra en la membrana mitocondrial interna de manera basal y es nombrada de este modo porque es capaz de disipar el gradiente de protones generado por la cadena respiratoria, desacoplando de este modo la fosforilación oxidativa (Justo y col., 2005).

### II.1.2.2.1. Distribución del tejido adiposo marrón.

En roedores, el tejido adiposo marrón se clasifica en interescapular, subescapular y cervical. Estas regiones se encuentran en la parte anterior y superior del tronco y el cuello, aunque también se desarrolla tejido adiposo marrón alrededor de la aorta y riñones. Todas estas regiones se denominan clásicas para distinguirlas de los adipocitos marrones que se localizan en el tejido adiposo blanco y que aquí denominaremos como beige (Sánchez-Gurmaches y Guertin, 2014).

La distribución del tejido adiposo marrón en humanos difiere entre adultos y recién nacidos, así como entre ratones y ratas. A diferencia de los roedores, los humanos no poseen un depósito de tejido adiposo marrón interescapular abundante a lo largo de todo su desarrollo (Figura 4), ya que en el caso de adultos y adolescentes, el depósito que se identifica como mayoritario es el encontrado en el área supraclavicular (Enerbäck, 2010; Richard y col., 2012).

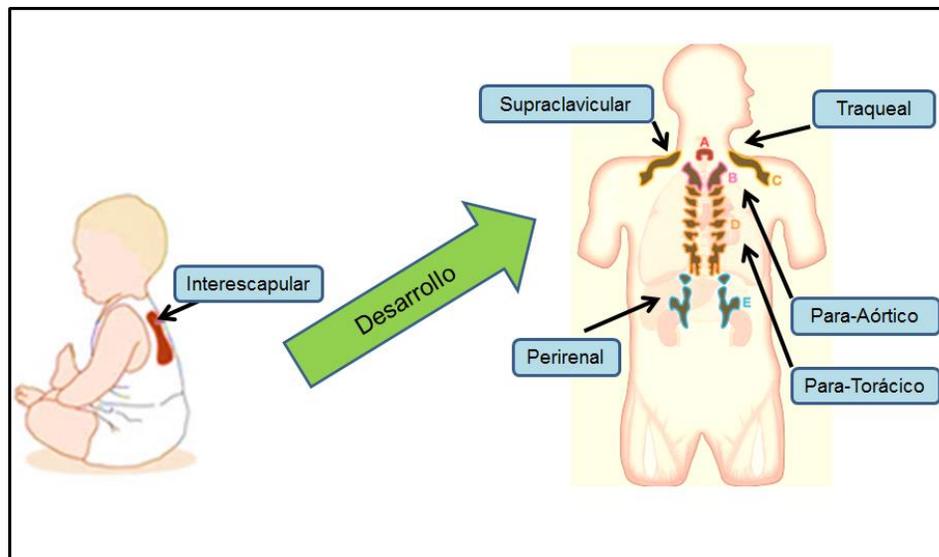


Figura 4. Localización del tejido adiposo marrón en infantes y adultos (Modificado de Enerbäck y col., 2010; Peirce y col., 2014).

### **II.1.2.3. Adipocito beige**

En los últimos años se ha reportado la existencia de otro tipo similar al adipocito marrón que se encuentra distribuido en el tejido adiposo blanco, al cual, por esta particular característica particular, se ha denominado beige o brite (del inglés *brown in white*); en el caso de modelos murinos, las zonas de tejido adiposo que contienen estos adipocitos en específico, adquieren una coloración beige (Wu y col., 2012).

Estas células en particular fueron reportadas por primera ocasión por Young y col. en tejido adiposo blanco después de aclimatación con frío en hembras de la cepa de ratones BALB/c, denominándose células positivas a UCP-1 (Young y col., 1984; Irving y col., 2014).

Así, los adipocitos beige son adipocitos marrones o células positivas a UCP-1 en el tejido adiposo blanco, identificándolas como un segundo tipo de adipocito marrón diferente al adipocito marrón clásico encontrado en su mayoría en la región interescapular de ratón (Wu y col., 2012; Carobbio y col., 2013; Lidell y col., 2014).

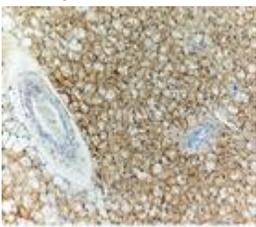
La razón por la cual este adipocito beige es considerado un tercer tipo de célula adiposa, es que a pesar de compartir características morfológicas con el adipocito marrón clásico como el alto contenido mitocondrial y múltiples gotas lipídicas, los adipocitos beige tienen expresión de genes diferentes y derivan de un precursor diferente al de los adipocitos marrones (Okamatsu-Ogura y col., 2013).

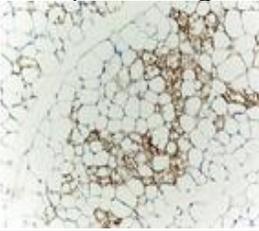
### II.1.2.3.1. Localización del adipocito beige: diferencias entre el adipocito beige humano y murino.

La definición de adipocito beige que se explicó con anterioridad es respecto al tipo celular que se ha encontrado en modelos murinos; sin embargo, en humanos, las células del tejido adiposo marrón se asemejan más a las denominadas células beige encontradas en ratón que a las células del tejido adiposo marrón del mismo (Wu y col., 2012).

Lo mencionado anteriormente se basa en estudios realizados recientemente, en los cuales se sugiere que el tejido adiposo marrón encontrado en el área supraclavicular de adultos humanos es más del tipo beige que marrón (Cuadro 1), resultados que dejaban en cuestionamiento de si existía la posibilidad que el tejido adiposo marrón hasta ahora identificado en adultos humanos fuera realmente de este tipo o en realidad solo beige (Cannon y Nedergaard, 2012; Sharp y col., 2012; Lidell y col., 2014).

Cuadro 1. Diferencias entre adipocito marrón y beige (Modificado de Harms y Seale, 2013)

<b>Inmunohistoquímica con anti-Ucp-1</b>	<b>Ubicación en Humanos</b>	<b>Ubicación en Ratón</b>	<b>Origen</b>
Adipocito marrón 	Interescapular	Interescapular	Células Myf5 <sup>+</sup>

<p>Adipocito beige</p> 	<p>Supraclavicular</p>	<p>Intercalado dentro del tejido adiposo blanco</p>	<p>Células Myf5<sup>-</sup></p>
--	------------------------	---	---------------------------------

Lidell y col., trataron de encontrar respuesta al cuestionamiento planteado de la existencia real de tejido adiposo marrón en humanos o solamente beige. Para su estudio, realizaron análisis en tejido adiposo marrón de la región interescapular, considerado como tejido adiposo marrón clásico, en infantes, al igual que en tejido adiposo marrón supraclavicular de adultos. El estudio fue realizado bajo aprobación del comité de ética regional de Linköping, Suecia. Los resultados mostraron una mayor expresión de Zic1, un gen encontrado de manera específica en tejido adiposo marrón. Por el contrario, en el caso de la muestra de tejido adiposo marrón supraclavicular, predominó la expresión de Tbx1, un gen específico en este caso para adipocitos beige. Con base en estos resultados (Figura 5), se sugiere que el tejido adiposo interescapular en humanos es marrón y el supraclavicular beige (Lidell y col., 2013).

Estos resultados dejan la pregunta de qué es lo que sucede respecto al tejido adiposo blanco y la presencia de adipocitos beige en éste, tal como sucede en modelos murinos, lo cual es una línea abierta a la investigación, ya que la estimulación de adipocitos beige en tejido adiposo visceral se podría considerar benéfico por las funciones que éste desempeña.

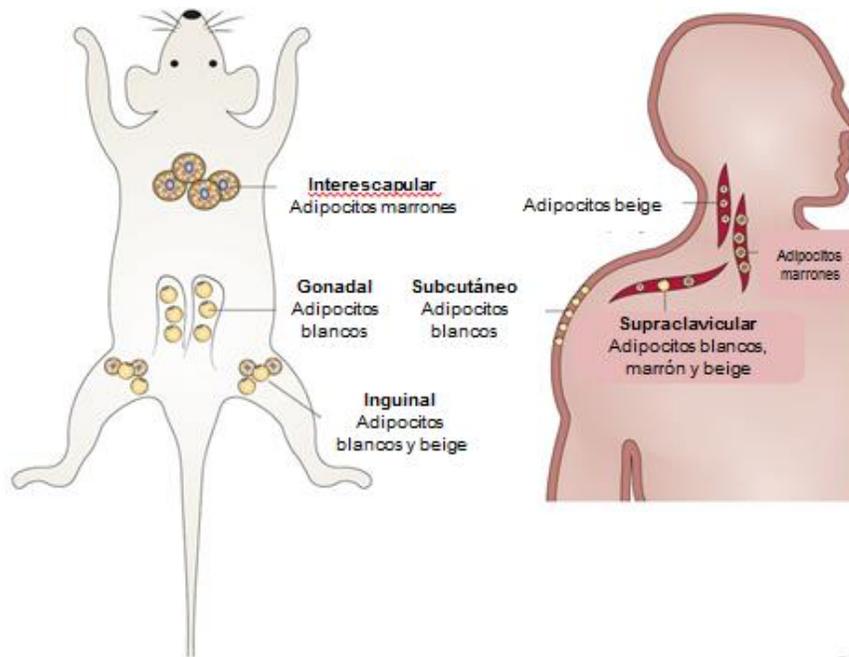


Figura 5. Diferencias en la localización anatómica del adipocito beige entre murinos y humanos (Modificado de Bartelt y Heren, 2014).

## II.2. Origen del adipocito: Diferenciación

El proceso que refiere al origen de las células del tejido adiposo, se denomina adipogénesis, el cual es la diferenciación de las células madre o mesenquimales hasta células del tejido adiposo maduras. Durante éste ocurren diferentes cambios morfológicos desencadenados por la expresión de genes y proteínas específicas así como por la sensibilidad a hormonas (Moseti y col., 2016).

### **II.2.1. Modelos de estudio: Células 3T3-L1**

Las líneas celulares establecidas, como las células 3T3-L1, una línea celular de preadipocitos, son utilizadas ampliamente para estudiar mecanismos moleculares relacionados con la diferenciación de adipocitos, conocida también como adipogénesis (Green y Kehinde 1975; Farmer 2006).

Una vez que los preadipocitos 3T3-L1 alcanzan la confluencia, se detiene su crecimiento por contacto, conocido como inhibición por contacto. En un estado fisiológico, el proceso de diferenciación requiere de un estímulo endócrino en el que en su mayoría involucra la insulina, IGF-1 (del inglés *insulin growth factor-like 1*), la hormona de crecimiento y glucocorticoides, entre otros. De igual forma, para que se lleve a cabo el proceso de diferenciación o adipogénesis, en las células 3T3-L1, se requiere de factores adipogénicos que promuevan la diferenciación como suero fetal bovino (SFB), dexametasona (como glucocorticoide), isobutilmetilxantina (IBMX) e insulina. Las células estimuladas vuelven a entrar inmediatamente en el ciclo celular, requiriendo previamente uno o dos ciclos de división celular, conocido como expansión clonal mitótica, durante las primeras 48 horas. Durante este tiempo, las células expresan factores de transcripción adipogénicos específicos, así como reguladores del ciclo celular. Después de este evento, las células comprometidas se someten a la diferenciación terminal que se caracteriza por la producción de gotas lipídicas, así como la expresión de múltiples programas metabólicos característicos de las células adiposas maduras. Dentro de las características particulares que esta línea celular adquiere cuando se diferencia, es el cambio en su morfología del tipo fibroblasto a una esférica con acumulación de gotas lipídicas (Farmer, 2006).

## II.2.2. Factores de transcripción involucrados en la diferenciación

Durante el proceso de diferenciación, diferentes factores nucleares de transcripción se ven involucrados. Dos familias de estos factores tienen principal relevancia en la adipogénesis, C/EBP (de inglés, *CCAAT/enhancer binding protein*) y PPAR (del inglés, *peroxisome proliferator activated receptor*) (Guo y col., 2014).

La familia C/EBP, se encuentra altamente expresada en adipocitos. La estimulación de la expresión de C/EBP  $\beta$  y  $\delta$  resulta de la fosforilación de CREB (del inglés *cyclic AMP response element-binding protein*) mediada por la isobutilmetilxantina, que inhibe a la fosfodiesterasa e incrementa los niveles de AMPc promoviendo con ello la diferenciación. La dexametasona también está involucrada en la expresión de C/EBP  $\delta$  en etapas tempranas de la diferenciación y su principal función es activar a C/EBP $\alpha$ , el cual será responsable de la activación de genes específicos de cada tipo de adipocito ya que es un importante factor de transcripción en el control de la homeostasis energética. De igual manera C/EBP  $\beta$  activa la expresión de PPAR $\gamma$  (correspondiente a la familia de PPAR), el cual se considera el principal inductor de la expresión de genes que promueven la adipogénesis, en conjunto con C/EBP $\alpha$  (Guo y col., 2014).

La insulina es otro de los inductores involucrados en la diferenciación; ésta tiene la función de estimular la entrada de glucosa a las células para que sea almacenada en forma de triglicéridos y con ellos promover la diferenciación al tipo de adipocito en particular. Por lo tanto, el estímulo dado a las células en cultivo para promover la diferenciación genera dos estadios particulares, la etapa temprana en la cual encontraremos una alta expresión de C/EBP $\delta$  y C/EBP $\beta$  y la etapa tardía en la cual se encuentran mayoritariamente PPAR $\gamma$  y C/EBP $\alpha$  (Mosefi y col., 2016).

PPAR $\gamma$  es, por lo tanto, un regulador clave del desarrollo de los adipocitos *in vitro* e *in vivo*. Es necesario para que se lleve a cabo la diferenciación de adipocitos y en muchos casos es también suficiente para convertir a los precursores en células adiposas. Se encuentra en dos isoformas diferentes denominadas, PPAR $\gamma$ 1 y PPAR $\gamma$ 2, de las cuales, PPAR $\gamma$ 2 se expresa en su mayoría en el tejido adiposo. Este importante factor de transcripción, pertenece a los PPARs, que en general, son miembros de la superfamilia de receptores nucleares y tienen la característica de ser activados por una variedad de coactivadores. Esta familia de receptores está conformada por tres subtipos diferentes, PPAR $\alpha$ ,  $\beta/\delta$ ,  $\gamma$ , todos los cuales son importantes reguladores del metabolismo de lípidos y carbohidratos en diferentes tejidos, no solamente el adiposo, incluyendo el músculo esquelético y el hígado (Sierbaek y col., 2010).

### **II.2.3. Factores involucrados en la diferenciación del adipocito marrón y beige.**

PPAR $\gamma$  es el factor de transcripción principal durante la diferenciación de los adipocitos en general, tanto adipocito blanco, marrón como beige. Sin embargo, a pesar de ser clave durante la adipogénesis, necesita de coactivadores específicos los cuales sí difieren en cada caso. Por ejemplo, el coactivador TIF2 conduce a un adipocito blanco, mientras que los factores de transcripción PPAR $\alpha$  y FOXC2, SRC1, PGC - 1 $\alpha$  y PRDM16 promueven la adipogénesis a un fenotipo marrón (Peirce y col., 2014).

En el caso específico del adipocito marrón y beige, PGC-1 $\alpha$  (del inglés *PPAR $\gamma$ -Coactivador 1*) y PRDM16 son los principales factores reguladores. PGC1 es una familia de coactivadores que está conformada por tres miembros: PGC-1 $\alpha$ , PGC-1 $\beta$  and PGC-1. Son coactivadores, principalmente, del factor de transcripción PPAR $\gamma$  y del receptor a la hormona tiroidea los cuales son

inducidos en el tejido adiposo marrón y el músculo esquelético en respuesta a la exposición al frío, con lo cual se consideran importantes en la regulación de la termogénesis adaptativa, regulando la biogénesis mitocondrial y el metabolismo energético. También pueden interactuar con otros factores de transcripción importantes en la regulación de la diferenciación de los adipocitos como PPAR $\alpha$  y SREBP (del inglés *sterol regulatory element binding protein*) siendo por tal motivo reguladores importantes del metabolismo de lípidos y la homeostasis energética (Puigserver y col., 1998; Lin y col., 2005).

PRDM16 (del inglés *PRD1-BF-1-RIZ1 homologous domain containing protein-16*), es otra proteína involucrada en el proceso, del tipo dedos de zinc de 140 kDa, la cual se encuentra altamente expresada en el tejido adiposo marrón en comparación con el tejido adiposo blanco. Está relacionada en su función con PGC-1 $\alpha$ , ya que no solamente induce el aumento en la expresión de éste, también se puede unir a él al igual que a PGC-1 $\beta$  para aumentar la actividad de ambos. De igual forma PRDM16 puede unirse a los otros factores de transcripción ya mencionados como PPAR $\gamma$ , PPAR $\alpha$  y a los miembros de la familia C/EBP (Kajimura y col., 2010).

Es así como PPAR $\alpha$ , es otro factor altamente involucrado en la diferenciación de los adipocitos marrones y beige ya que activa la expresión de UCP-1, PRDM16 y PGC1 $\alpha$ . Este factor de transcripción se encuentra expresado también en los adipocitos marrones y está involucrado en el paso de un fenotipo blanco a marrón, siendo activado por diferentes tipos de agonistas. De sus funciones principales se encuentra el regular la  $\beta$ -oxidación (Seale, 2015).

#### **II.2.4. Origen del adipocito blanco y marrón**

Los adipocitos beige y marrón tienen diferencias en función, morfología y depósito en el cual se encuentran. La misma diferencia existe en cuanto a su origen, ya que el precursor común para el tejido adiposo marrón es del linaje Myf5 positivo, pero no exclusivo, siendo también precursor para los adipocitos del tejido blanco subcutáneo y visceral, mientras que para los depósitos de tejido adiposo blanco inguinal y perigonadal su precursor es el linaje Myf5 negativo (Figura 6). Por esta razón por la cual no puede generalizarse al tejido adiposo marrón como linaje positivo y al blanco como negativo (Sánchez-Gurmaches y Guertin, 2014).

El origen de los adipocitos marrones y blancos mencionado, se refiere al caso de los modelos animales murinos, ya que hablando de la especie humana, no se tiene claro si comparten esta particularidad.

#### **II.2.5. Origen del adipocito beige**

El origen de los adipocitos beige aún no está claro del todo, sin embargo, se tienen diferentes modelos que proponen el origen de éstos (Figura 6). La primera propuesta es que los adipocitos beige se originan por transdiferenciación de los adipocitos blancos existentes, mientras que la segunda, propone que existe un precursor diferente al del adipocito blanco del cual se origina (Sánchez-Gurmaches y Guertin, 2014). La última está fundamentada en la observación de que los adipocitos beige se encuentran en conjunto dentro del tejido adiposo blanco y no aislados, razón por la cual se cree deben tener un origen clonal derivado de un precursor (Nedergaard y Cannon, 2014).

Los modelos descritos presentan complejidad. En el caso de la propuesta de transdiferenciación, se tienen resultados diferentes de acuerdo al tipo de depósito de tejido adiposo en cuestión, ya que en algunos casos cuando se estimula el tejido adiposo blanco con un agonista que estimula proliferación de los adipocitos beige, se observa que surgen de un precursor, mientras que bajo el mismo estímulo, los beige encontrados en el tejido adiposo blanco inguinal surgen por transdiferenciación (Cinti, 2009; Lee y col., 2012a).

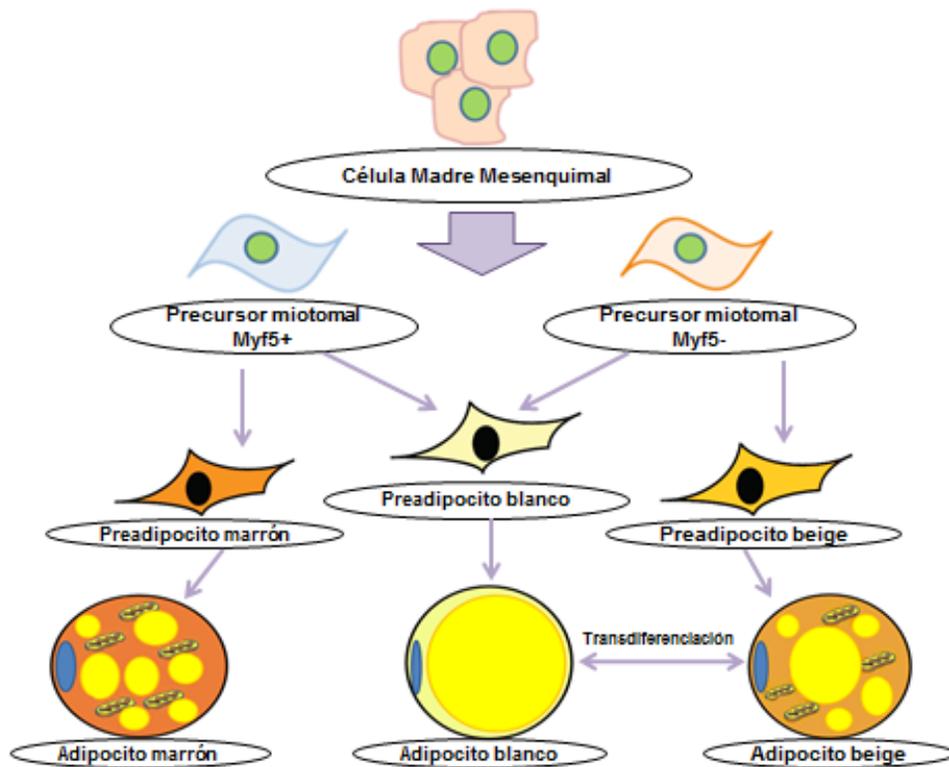


Figura 6.- Diferenciación de célula progenitora en cada tipo de adipocito maduro.

Si se analiza la segunda propuesta del origen de los adipocitos beige, el precursor para los adipocitos del cual provengan dependerá del tejido adiposo blanco donde estén, ya que como se mencionó anteriormente, es diferente para cada depósito. Por lo tanto, los adipocitos beige que se localizan en el tejido

adiposo blanco peri-gonadal e inguinal son del linaje Myf5 negativo, mientras que los originarios del tejido adiposo blanco subcutáneo y visceral serán Myf5 positivo. En este caso se repite la excepción ya que no todos los adipocitos beige son de origen Myf5 negativo, teniendo como conclusión que los adipocitos beige de diferentes depósitos, tendrán diferentes orígenes (Sánchez-Gurmaches y col., 2012; Seale y col., 2008).

### **II.3. Marcadores específicos de cada tipo de adipocito**

Para poder identificar o caracterizar los diferentes tipos de adipocitos que se han descrito no es suficiente con la observación y análisis de su morfología y función, sobre todo en el caso específico del adipocito beige, el cual comparte particularidades de los adipocitos marrones y está localizado dentro del tejido adiposo blanco (en el caso de modelos murinos) (Wu y col., 2012; Schulz y col., 2013).

Por tal razón, es necesario identificar características particulares. En el caso de los adipocitos beige, éstos son multiloculares, con mayor densidad de mitocondrias. Además, tienen expresión de genes similares a los adipocitos marrones como UCP-1, PPARGC1A, y CIDEA, pero carecen de otros marcadores específicos de los mismos como Zic1 (factor de transcripción de dedos de zinc 1), Lhx8 (homeobox de la proteína LIM 8), Meox3, y PRDM16, lo que los diferencia entre sí. De igual forma carecen de la expresión del marcador específico de adipocitos blancos, TCF 21, pero comparten la expresión de Hoxc9. Sin embargo, a pesar de compartir similitudes y marcadores con los adipocitos marrones y blancos, los adipocitos beige presentan la expresión de marcadores específicos como, CD137 (miembro 9 de la superfamilia de receptores TNF), Cited1 (Transactivador asociado CBP/p300), Tbx1 (factor de transcripción asociado a T-box) y Tmem26 (transmembrana 26) (Cuadro 2), lo

que marca que sea un tipo celular diferente (Petrovic y col., 2010; Walden y col., 2012; Wu y col., 2012).

Cuadro 2. Marcadores específicos expresados en cada tipo de adipocito.

<b>Adipocito</b>	<b>Marcadores</b>	<b>Factores de Transcripción</b>	<b>Activadores</b>
Marrón	Zic1 Lhx8 Eva1 Meox3 Pdk4 Epstil1	Cebp/ $\beta$ Pdrm16 Pgc-1 $\alpha$ Ppar- $\alpha$ Ebf2	Frio Tiazolidinedionas Péptidos Natriuréticos Hormona Tiroidea FGF21 BMP7 Orexina
Beige	Cd137 Cited1 Tmem26 Tbx1 Shox2	Cebp/ $\beta$ Pdrm16 Pgc-1 $\alpha$	Frío Tiazolidinedionas Péptidos Natriuréticos FGF21 Irisina

Algunos artículos sugieren que el tejido adiposo marrón en humanos tiene una composición celular más similar a los adipocitos beige murinos ya que algunos marcadores que se han designado específicos de los adipocitos beige como, CD137, TMEM 26 y TBX1, se han encontrado expresados en adipocitos

marrones humanos, aunado a que ciertos análisis histológicos de tejido adiposo marrón muestran que los adipocitos marrones humanos comparten el mismo depósito con adipocitos blancos formando agrupaciones características de los adipocitos beige murinos (Sharp y col., 2012; Wu y col., 2012).

Respecto a la función y características de los marcadores que se han designado como específicos del adipocito beige se sabe que CD137 (también conocido como 4-1BB ó TNFRSF9) es miembro de la familia de los receptores a TNF (factor de necrosis tumoral). Se conoce por su función en los linfocitos T activados (CD4+ Y CD8+) como molécula coestimuladora siendo por lo tanto un regulador importante del sistema inmune. Se le ha denominado como marcador de los adipocitos beige, ya que se ha encontrado de manera específica en estas células comparado con los adipocitos blancos o marrones. Se sugiere, que la función de esta molécula en los adipocitos beige podría estar relacionada con la expresión de la molécula UCP-1, ya que en un estudio realizado por Kiskinis y col. se observó que al reprimir la expresión de CD137 en adipocitos beige, se inhibe también la expresión de UCP-1 (Kiskinis y col., 2007; Chu-Dinh y Chu, 2014).

El otro marcador importante mencionado, considerado también específico de los adipocitos beige es CITED1 (del inglés *CBP/p300-interacting transactivators with glutamic acid [E]/aspartic acid [D]-rich C-terminal domain*) que es una proteína nuclear de unión a CBP/p300 y es considerada factor de transcripción corregulador, ya que no se une directamente al ADN. Una de sus funciones reportadas es como factor de transcripción coactivador del receptor a estrógenos. Dentro de las funciones de CITED1 se encuentran el aumentar la transcripción mediada por el factor de transcripción SMAD de manera dependiente a CBP/p300 (Yahata y col., 2001). Se considera que CITED1 es un marcador de adipocitos beige en humanos y murinos ya que bajo un estímulo crónico  $\beta$ 3 adrenérgico es expresado en células positivas a UCP-1 en el tejido

adiposo inguinal, consideradas beige en ratones, contrario al control y siendo también expresado en células del tejido adiposo marrón en humanos que se asemejan más a los adipocitos beige en ratones (Sharp y col., 2012).

#### **II.4. Adipocitos beige y su actividad termogénica: alternativa contra la obesidad**

La proteína UCP-1, que es altamente expresada en adipocitos marrones (y de especial relevancia en su expresión en adipocitos beige), es la encargada de mediar la producción de calor llevada a cabo por éstos. UCP-1 está localizada en la membrana interna de la mitocondria. Puede ser activada por estímulos como el frío y la norepinefrina, involucrando receptores acoplados a proteínas G que activan a la adenilato ciclasa e incrementan los niveles de AMPc. Este segundo mensajero activará la señalización mediada por la proteína cinasa A (PKA) activando la lipólisis y teniendo liberación de ácidos grasos libres a partir de triglicéridos. Estos ácidos grasos son el sustrato de la termogénesis, resultando un gradiente de protones a través de la membrana mitocondrial por acción de su combustión. Es aquí donde la proteína UCP-1 reduce el gradiente de protones a través de la membrana (Figura 4), facilitando el flujo de éstos desde el espacio intermembranal a la matriz mitocondrial, generando producción de calor (Sarjeant y Stephens, 2012; Kajimura y Saito, 2013).

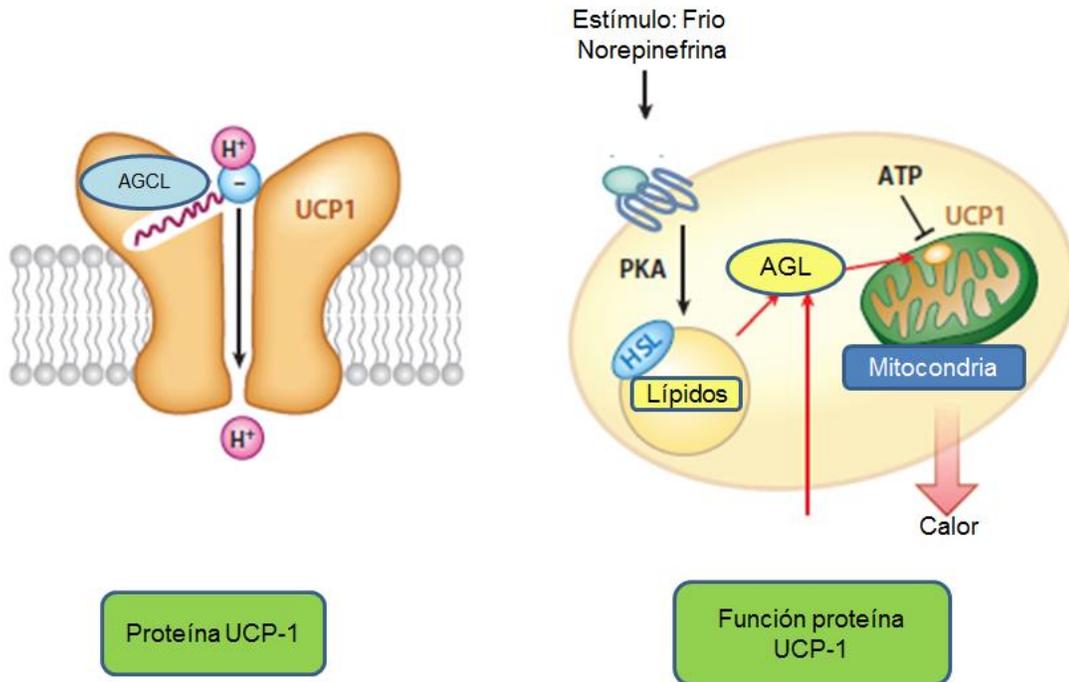


Figura 7. Localización y función de la proteína UCP-1 en adipocitos marrones (Modificado de Kajimura y Saito, 2013).

La importancia de los adipocitos beige, es debida a la similitud que comparten con los adipocitos marrón en su capacidad termogénica gracias a la presencia de la proteína UCP-1, siendo de vital importancia si tienen la capacidad de estar presentes dentro del tejido adiposo blanco. Se ha mostrado que la expresión de esta proteína en tejido adiposo blanco, por efecto de los adipocitos beige, aumenta la capacidad anorexigénica de la leptina y la adiponectina, lo cual reduce el consumo de alimento e incrementa el gasto de energía, lo que muestra un mecanismo importante de resistencia a la obesidad (Okamatsu-Ogura y col., 2013).

Aunado a lo anterior, se ha observado una característica particular en modelos de ratones transgénicos o *knockout* que desarrollan adipocitos beige en tejido

adiposo blanco. Esta característica es la resistencia a la obesidad por factor genético o dieta. Lo anterior se confirma en estudios de evaluación de la capacidad termogénica de los adipocitos beige *in vitro*, donde se lleva a cabo la diferenciación de adipocitos beige a partir de preadipocitos de ratón o humano, los cuales muestran su capacidad termogénica ante estimulación adrenérgica (Seale y col., 2011; Aufret y col., 2012; Okamatsu-Ogura y col., 2013; Lee y col., 2014b).

#### **II.4.1. Terapias actuales contra la obesidad**

Los terapias actuales contra la obesidad van dirigidas a tres blancos estratégicos: supresión del apetito, inhibición de la absorción de la grasa e incremento en el consumo de energía y termogénesis (Cheung y col., 2013).

El principal objetivo de los tratamientos contra la obesidad es la pérdida de peso en los pacientes y lograr que esta pérdida se pueda mantener, para así ayudar a la mejora de otras consecuencias generadas por la obesidad mencionadas anteriormente, sin perder de vista que al igual que otras patologías, los medicamentos contra la obesidad requieren de un uso prolongado, punto que debe ser considerado al ser evaluados en su seguridad y eficacia (Yanovski y Yanovski, 2014).

Respecto a lo anterior, se puede mencionar el caso del medicamento combinado de anfetaminas: fenfluramina y fentermina, efectivo en la pérdida de peso pero con severos efectos adversos como hipertensión pulmonar y enfermedad cardíaca valvular lo que originó que tuviera que ser retirado del mercado; por esta razón, las problemáticas secundarias de las terapias contra la obesidad deben ser un factor importante a considerar (Kim y col., 2014).

#### II.4.2. Problemática de las terapias actuales contra obesidad

Los medicamentos desarrollados hoy en día como terapia contra la obesidad tienen eficacia limitada y efectos adversos considerables que provocan poca tolerancia y seguridad de éstos (Cuadro 3). Es por esta razón que investigar nuevas alternativas seguras para una patología como la obesidad son necesarias (Cheung y col., 2013).

Cuadro 3. Medicamentos utilizados para el tratamiento de la obesidad.  
(Modificado de Cheung y col., 2013; Kim y col., 2014; Yanovski y Yanovski, 2014).

<b>MEDICAMENTO</b>	<b>MECANISMO DE ACCIÓN</b>	<b>EFECTOS ADVERSOS</b>	<b>ESTATUS ACTUAL</b>
Fentermina	Noradrenérgico Causa supresión del apetito	- Insomnio - Alteración del ritmo cardiaco - Dolor de cabeza - Ansiedad - Diarrea	Aprobado
Orlistat	Inhibidor de la Lipasa	- Flatulencias - Incontinencia fecal - Riesgo a insuficiencia renal	Aprobado
Lorcaserina	Agonista del receptor serotoninérgico 5HT <sub>2C</sub> , causando supresión del apetito	- Dolor de cabeza - Náuseas - Fatiga - Dolor de espalda - Depresión - Ansiedad	Aprobado

Sibutramina	Inhibe la recaptación de serotonina y norepinefrina	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Insomnio</li> <li>- Dolor de cabeza</li> <li>- Limitada eficacia en la pérdida de peso</li> <li>- Riesgos cardiovasculares y cerebrovasculares</li> </ul>	Retirado en 2010
Fentermina/ Topiramato	<p>Activador de receptor noradrenérgico y GABA, promueve señal anorexigénica. Suprime apetito y causa pérdida de peso</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Insomnio</li> <li>- Mareos</li> <li>- Elevación en el ritmo cardiaco</li> <li>- Cansancio</li> <li>- Pérdida de coordinación</li> <li>- Confusión</li> <li>- Nerviosismo</li> <li>- Pérdida de memoria</li> </ul>	Aprobado recientemente (2012)

### II.4.3. Alternativas terapéuticas

Una de las alternativas que se estudian hoy en día y tomando en consideración las funciones mencionadas de cada tipo de adipocito, es lograr un incremento en la cantidad de adipocitos del tipo marrón, aumentando con ello el volumen de tejido adiposo del mismo. Esta vía ha sido tema de estudio en los últimos años, ya que ésto podría significar una alternativa terapéutica contra la obesidad, gracias a la actividad termogénica del tejido adiposo marrón mencionada con anterioridad. Aunado a la función de los adipocitos marrones, se encuentran los adipocitos beige, los cuales posiblemente contribuyen en esta actividad del tejido adiposo marrón, con lo cual son un blanco importante a

estudiar, diseñando estrategias para estimular su proliferación en tejido adiposo blanco donde se encuentran localizados, o propiciar la diferenciación de sus precursores encontrados en el mismo (Carey y col., 2014).

## **II.5. Acción de factores endócrinos en el tejido adiposo**

Actualmente sabemos que el tejido adiposo no es un simple depósito de grasa, este concepto cambió desde el hallazgo hace más de dos décadas de la leptina, con lo cual se estableció su participación como un órgano endócrino de gran importancia. Varias moléculas liberadas por los adipocitos tienen actividad endócrina, pero también parácrina y autócrina, y la homeostasis de este órgano/tejido se encuentra bajo la influencia de diversos factores (Villarroya y col., 2013) que se aprovechan en el laboratorio para el control de su funcionamiento y a continuación se describen.

### **II.5.1. Hormona Tiroidea**

La hormona tiroidea conocida como triyodotironina (T3), es una hormona que afecta a varios procesos fisiológicos del cuerpo. Esta hormona actúa a través de receptores nucleares tiroideos que interactúan con elementos responsivos a tiroideas. Estos receptores son codificados por dos genes y tienen múltiples isoformas (T $\alpha$  y T $\beta$ ) (Bianco y Kim, 2006).

La hormona tiroidea estimula procesos de lipólisis y lipogénesis en tejido adiposo. En el caso de la lipogénesis, ocurre por acción directa sobre los genes involucrados en dicho proceso, aumentando su expresión. También tiene un efecto regulando la diferenciación de los adipocitos, ya que el tejido adiposo

blanco expresa todas las isoformas de los receptores nucleares para la hormona tiroidea (Obregón, 2008).

En el tejido adiposo marrón, se sabe que la hormona tiroidea induce también la diferenciación de los preadipocitos marrones y es un suplemento utilizado de manera común en el medio de diferenciación para el desarrollo de adipocitos marrones en cultivo (Sarjeant y Stephens, 2012). La hormona tiroidea también induce un incremento en la expresión de UCP-1 mediante la acción a través del receptor con isoforma TR $\beta$ , cuando hay un estímulo como el frío, siendo requerida para una acción termogénica completa (Ribeiro y col., 2010).

Para el caso de los adipocitos beige, estudios recientes sugieren que el tratamiento con T3, puede inducir el desarrollo de estos adipocitos en el tejido adiposo blanco debido al incremento en la expresión de UCP-1 que genera pero también a un aumento en la biogénesis mitocondrial (Lee y col., 2012b).

### **II.5.2. Glucocorticoides**

Los glucocorticoides (cortisol en humanos y corticosterona en los roedores) son las hormonas endógenas del estrés que afectan a casi todos los órganos y tejidos en el cuerpo, la regulación de diversos procesos fisiológicos, incluida la energía, homeostasis (metabolismo), la respuesta inmune, crecimiento, la reproducción, el comportamiento, la proliferación celular y la supervivencia. En la fisiología normal, la activación desencadenada por el estrés del eje hipotalámico- pituitario- adrenal (HPA) induce la síntesis y secreción de glucocorticoides en la corteza suprarrenal, que está estrechamente regulada por la inhibición en retroalimentación del eje HPA. El papel esencial de los glucocorticoides es suministrar suficiente glucosa en la circulación para el

cerebro y asegurar la supervivencia del organismo en las condiciones de estrés de o la ingesta reducida de alimentos (Patel y col., 2014).

Además de alterar la ingesta de alimentos, los glucocorticoides también pueden afectar el metabolismo y promover el almacenamiento ácidos grasos en exceso. Hay dos vías a través de las cuales el tejido adiposo podrá incrementar en masa en el desarrollo de la obesidad. Los adipocitos pueden hipertrofiarse debido al aumento de la síntesis y el almacenamiento de los lípidos, o puede ocurrir hiperplasia debido al aumento de la diferenciación de los preadipocitos adipocitos maduros (adipogénesis). La lipogénesis y la adipogénesis, pueden ocurrir como resultado de la exposición a glucocorticoides. Los preadipocitos, son estimulados para diferenciarse en adipocitos maduros por cortisol y dexametasona en una manera dosis dependiente. De hecho, los glucocorticoides son requeridos para inducir la diferenciación de células estromales, así como de los preadipocitos 3T3-L1 (Peckett y col., 2011).

En el tejido adiposo marrón, los glucocorticoides tienen un efecto inhibitorio sobre la actividad del tejido adiposo marrón en modelos de roedores. Los glucocorticoides aumentan el apetito al estimular la lipólisis y suprimir la termogénesis (en su mayoría la inducida por norepinefrina que da la activación de UCP-1). Los glucocorticoides también inhiben la expresión y función de los receptores  $\beta 1$  y  $\beta 3$  adrenérgicos dentro de tejido adiposo marrón (Reddy y col., 2014).

### **II.5.3. El factor de crecimiento de fibroblastos (FGF21)**

Los factores de crecimiento de fibroblastos (FGFs), son un grupo de hormonas endócrinas que tienen diferentes efectos en el metabolismo. Se ha observado que la administración tanto *in vitro* como en *in vivo*, incrementa la expresión de

la proteína UCP-1 al igual que la expresión de otros genes relacionados con el tejido adiposo marrón. Su función es dependiente de PGC-1 $\alpha$ , otro gen que se expresa en adipocitos marrones o beige, ya que en estudios con cultivo de adipocitos primarios extraídos de ratones *knockout* para PGC-1 $\alpha$ , el efecto de FGF-21 se ve disminuido. Esto sugiere la relación de FGF21 en el proceso de adipogénesis del tejido adiposo marrón y de la homeostasis de la energía (Fisher y col., 2012).

De igual forma, el tratamiento a preadipocitos humanos con FGF21 activa genes específicos de los adipocitos beige e involucrados en el proceso de conversión a tejido adiposo marrón también. Estos resultados sugieren que FGF21 puede ser un factor endócrino para controlar la aparición y actividad de los adipocitos beige (Lee y col., 2014a).

#### **II.5.4. Proteína morfogénica de hueso (BMP)**

La proteína morfogénica de hueso (BMP), está involucrada en la adipogénesis del tejido adiposo marrón al igual que con la regulación y el gasto energético.

Existen varios tipos de BMPs, las involucradas en tejido adiposo que se han observado son: BMP4, que lleva a células mesenquimales a un linaje de adipocitos blancos, y BMP7, que participa en la formación de adipocitos marrones. Sin embargo, existen estudios realizados con células pluripotenciales, las cuales recibieron tratamiento con BMP4 y BMP7 para observar las diferencias en inducción, observando que ambas activan adipogénesis de los adipocitos marrones e inducen la expresión de la proteína UCP-1, al igual que de otros reguladores del tejido adiposo marrón como la proteína PRDM16 y la inducción de la biogénesis de mitocondrias. De igual forma se observó que BMP4 indujo adipocitos del tipo marrón en ambos tipos

de preadipocitos, tanto blanco como marrones, incrementando la expresión de la proteína TMEM26, que se encuentra tanto en adipocitos marrones como en adipocitos beige. Esto muestra un potencial de las BMPs para generar adipocitos marrones y su posible aplicación terapéutica en obesidad (Xue y col., 2014).

### **II.5.5. Ácido Retinoico**

El ácido retinoico, es un derivado de la vitamina A (en su forma de ácido carboxílico), que tiene funciones como crecimiento celular, diferenciación y apoptosis en diferentes tejidos. De igual forma tiene actividad de agonista en receptores nucleares hormonales, incluyendo los receptores a ácido retinoico (RAR) y los receptores nucleares PPAR $\gamma$  (Murholm y col., 2013).

El ácido retinoico tiene relevancia en tejido adiposo marrón porque estimula la expresión de la proteína UCP-1, actuando de manera directa sobre el gen de UCP-1 que contiene elementos responsivos a RAR en la región promotora del gen, lo cual promueve la expresión de la proteína en adipocitos murinos en cultivo (Mercader y col., 2010).

En modelos *in vivo*, se ha observado un aumento en la expresión de UCP-1 por efecto del ácido retinoico, tanto en tejido adiposo marrón como en el tejido adiposo blanco (Mercader y col., 2006; Mercader y col., 2010).

## **II.5.6. Hormona de Crecimiento: Funciones**

La hormona del crecimiento (GH por sus siglas en inglés), regula diferentes funciones en el organismo, como el crecimiento, la homeostasis metabólica y la adiposidad, siendo de especial relevancia ésta última (Stout y col., 2014).

La GH es una proteína de 191 aminoácidos, con un peso molecular de 22 kDa. Se secreta en la glándula pituitaria anterior, la cual está regulada por el hipotálamo. El área del hipotálamo encargada de controlar la hormona de crecimiento involucra el núcleo paraventricular anterior y el área anterior. La liberación de la GH está regulada por dos hormonas, una que estimula su liberación denominada hormona liberadora de hormona de crecimiento (GHRH) y otra denominada somatostatina que inhibe la liberación de la GH (Brazeau y col., 1973).

La secreción de la GH también puede ser regulada por otras hormonas diferentes como el factor de crecimiento tipo insulínico 1 (IGF-1). GH induce la síntesis y secreción de IGF-1 en el hígado, que a su vez inhibirá la secreción de GH directamente o mediante la estimulación de somatostatina. La grelina es una hormona encontrada en el tracto gastrointestinal y en el sistema nervioso central y su efecto es estimular la producción de GH (Kamegai y col., 2004).

Las funciones de la GH son el crecimiento, la diferenciación y el metabolismo celular en los diferentes órganos en los que tiene efecto como el hígado, el músculo esquelético, el tejido óseo y el tejido adiposo (Chia, 2014).

Uno de los efectos de la GH se da en el hígado, en donde actúa sobre el metabolismo general. La GH incrementa los niveles de glucosa al incrementar la producción hepática de glucosa activando vías como glucogenólisis y gluconeogénesis. Respecto al músculo esquelético, el efecto de GH es en conjunto con IGF-1, promoviendo el crecimiento en dicho tejido al igual que su

reparación y regeneración, procesos que controlan mediante el incremento de la síntesis de proteínas (Stout y col., 2014).

### II.5.6.1. Receptor de la hormona de crecimiento

La GH ejerce su acción vía su receptor el cual es una proteína transmembranal con 246 aminoácidos correspondientes al dominio de unión a la hormona, una parte transmembranal de 24 aminoácidos y finalmente 350 en el dominio intracelular. Este receptor es de la familia de los receptores de citocina cuya particularidad es que forma homodímeros sin actividad cinasa intrínseca. Cada homodímero del receptor está asociado de manera no covalente a una molécula Tirosin Cinasa de la familia Janus 2 (JAK2 por sus siglas en inglés) (Figura 7). Una vez que la GH se une a su receptor y genera cambios conformacionales, estas moléculas llevarán a cabo transfosforilación, iniciando así, la señalización de la hormona (Rosenfeld y col., 2007).

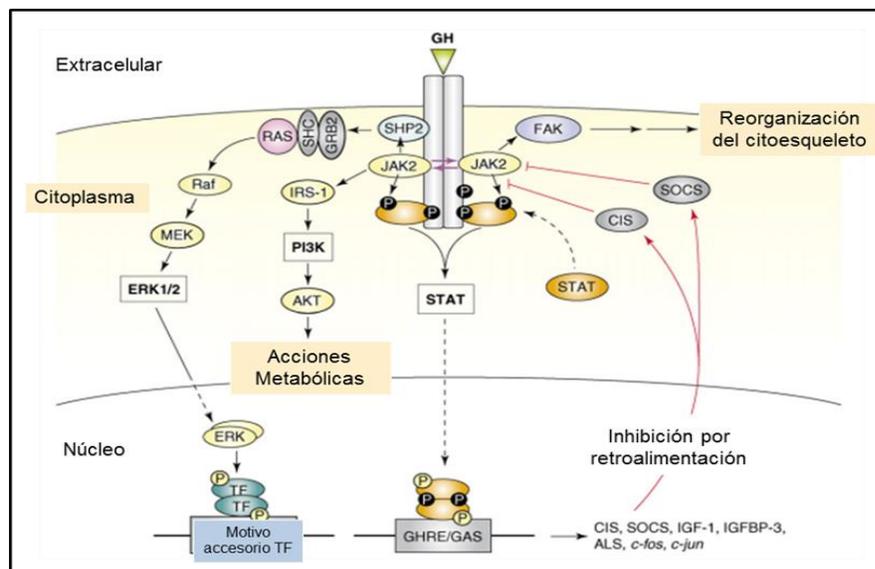


Figura 8. Vías de señalización de la hormona de crecimiento (GH) (Modificado de Rosenfeld y col., 2007).

### **II.5.6.2. Hormona de crecimiento y obesidad**

Durante un estado de obesidad, se presenta una disminución en la producción de la hormona de crecimiento, porque existe una relación negativa entre la cantidad de tejido adiposo visceral y la secreción de la hormona (Berryman y col., 2013), lo cual se ve reflejado en una disminución de su vida media. De acuerdo a los efectos anteriormente mencionados de la hormona sobre el tejido adiposo, resulta congruente que se encuentren niveles bajos de ésta en obesidad, ya que al ser una hormona con actividad lipolítica se sugiere que los niveles bajos encontrados de ésta en obesidad pueden contribuir a la progresión de la enfermedad. El mecanismo mediante el cual se reduce la concentración sérica de esta hormona no es del todo claro, sin embargo, varios estudios sugieren que otra hormona puede estar implicada, la insulina, porque la concentración sérica de ésta se encuentra correlacionada negativamente cuando se compara entre pacientes obesos y sanos. La acción inhibitoria que tiene la insulina en la producción de GH puede ser a nivel de alteraciones en el funcionamiento del hipotálamo, aunado a que podría estar contribuyendo al suprimir directamente la función de la glándula pituitaria, observando reducción en la síntesis y liberación de la GH en cultivos primarios de hipófisis (Gahete y col., 2013).

Estos efectos observados a causa de la disminución de la GH en obesidad, pueden ser originados porque el receptor se ve modificado durante este estado de obesidad (Berryman y col., 2013). La expresión del receptor de GH (GHR) se ve disminuida bajo diferentes circunstancias, por ejemplo, en un estudio que se realizó comparando a mujeres con un grado de obesidad contra mujeres delgadas, la expresión de ARNm del GHR está disminuida en el tejido adiposo blanco visceral y subcutáneo proveniente de mujeres con obesidad (Erman y col., 2011).

El conocimiento sobre los efectos de la GH en la estimulación de la lipólisis y adipogénesis, han permitido realizar estudios clínicos de su administración, no encontrando resultados significativos en la pérdida de peso (Chaves y col., 2013).

## **II.6. Hormona de crecimiento y su efecto en el adipocito**

La relación que existe entre la GH y el tejido adiposo es directa ya que tanto adipocitos maduros como preadipocitos expresan el receptor a la hormona en su forma funcional (Schäffler y col., 2006) lo que le permite ejercer su efecto, además de que este receptor está ampliamente expresado en todos los tipos celulares que componen al tejido adiposo blanco (Berryman y col., 2013).

Dentro de las funciones encontradas en tejido adiposo, se puede mencionar la capacidad de la GH de estimular diferenciación de preadipocitos (List y col., 2011); sin embargo, existen discrepancias en cuanto a la función precisa de esta hormona sobre la diferenciación de preadipocitos en el tejido adiposo, ya que esta función se deduce de lo observado en preadipocitos extraídos de ratones que tienen poco desarrollo del tejido adiposo visceral, y al tratar a estas células con hormona del crecimiento, no hay un efecto en la proliferación y diferenciación (Schäffler y col., 2006).

Contrario a estos resultados, en cultivos primarios de tejido adiposo de rata y humano se ha observado que la GH estimula proliferación pero inhibe diferenciación, sin embargo, es necesaria para la diferenciación de células mesenquimales y clonas de líneas celulares de tejido adiposo (Nam y Lobie, 2000).

En algunas líneas celulares, la GH tiene un efecto dual, ya que en preadipocitos 3T3-F442A tiene un efecto directo inicial para promover la adipogénesis, para

después de manera indirecta inducir el IGF-1 (factor de crecimiento tipo insulina 1) y así estimular el crecimiento de las células ya comprometidas (Sarjeant y Stephens, 2012).

En estudios *in vivo*, observaron pérdida de grasa corporal en pacientes tratados con GH (0.5 mg/día), así como también se observaron cambios en el número y volumen de las células adiposas, teniendo un aumento y disminución de estos parámetros respectivamente, en pacientes con deficiencia de GH que tienen menor número de adipocitos pero con mayor volumen, mostrando así actividad adipogénica (Chaves y col., 2013).

## **II.6.1. Vías de señalización de la hormona de crecimiento en adipocitos**

### **II.6.1.1. Vía JAK-STAT**

Una de las vías de señalización principales que activa la GH, es la vía JAK-STAT, por la cual se explican sus efectos en adipocitos. Dentro de la señalización que genera, la GH activa a STAT-5, que está involucrada en adipogénesis *in vitro* e *in vivo*, promoviendo el desarrollo de los adipocitos (Sarjeant y Stephens, 2012). Estudios realizados en la línea celular de adipocitos 3T3-L1 lo demuestran, al observar que las proteínas STAT-5 activadas por la GH inducen la expresión de PPAR $\gamma$ , sugiriendo que éste podría ser el mecanismo mediante el cual promueve la diferenciación en adipocitos (Kawai y col., 2007).

### **II.6.1.2. Vía RAS/MAPK**

La vía de señalización RAS/MAPK es otra de las vías que puede ser activada por la GH, la cual estimula la unión de la proteína adaptadora Shc (Proteína homóloga a Src) al complejo del receptor unido a la enzima JAK (Cinasa de GHR-JAK). Esta acción genera fosforilación de la proteína adaptadora Shc y su unión a Grb2 y al factor intercambiador de nucleótidos de guanina SOS, para dar la subsecuente activación de Ras, Raf, MEK y ERK1/2. ERK 1/2, a su vez, fosforilará al factor de transcripción CEBP $\beta$ , resultando en su translocación al núcleo para la transcripción de genes relacionados con la diferenciación de preadipocitos en adipocitos maduros (Kajimura y col., 2001).

### **II.6.1.3 Vía PI3K**

Además de activar las vías de JAK-STAT y RAS/MAPK, la GH también puede activar la vía de PI3K, a través de la fosforilación de la tirosina de las proteínas adaptadoras denominadas sustratos del receptor a la insulina (IRS). GH puede estimular la fosforilación de IRS-1, IRS-2 e IRS-3, lo cual permitirá que se asocien con moléculas como p85 que es una subunidad de la cinasa PI3K. En esta vía se ha asociado a la GH con la inhibición de la translocación del transportador de glucosa así como la fosforilación de Akt, una cinasa antiapoptótica, lo que implica que la GH está relacionada con la supervivencia celular (Moller and Jorgensen, 2009).

## **II.6.2. Hormona de crecimiento y adipocito beige**

Tanto los adipocitos marrones como los beige, generan calor gracias a la acción de la proteína mitocondrial de desacoplamiento, UCP-1, contrario a lo que

realizan los adipocitos blancos, por lo cual son un blanco terapéutico, ya que se tiene el potencial de generar protección contra la obesidad al incrementar el número de estas células (Villarroya y col., 2013).

Como alternativa para lograr este objetivo, se puede plantear utilizar a la GH, para inducir una transdiferenciación de los adipocitos blancos o aumentar la proporción de los adipocitos beige en el tejido adiposo blanco, ya que existen algunas evidencias que lo sugieren, lo cual dependerá del origen del modelo (Lin y col., 2011).

Uno de los posibles mecanismos que se llevan a cabo para aumentar el número de adipocitos beige en el tejido adiposo blanco regulado por la GH es mediante la ablación del receptor a la grelina. La grelina es identificada como uno de los péptidos liberadores de GH o llamado actualmente secretagogo de GH, del cual dependerá en algunas ocasiones la secreción y acción de la hormona (Veldhuis y Bowers, 2010).

Para estudiar el efecto biológico que puede tener la grelina, se han realizado estudios en los cuales se suprime la actividad de ésta o su receptor (GHS-R1), observando en modelos animales, una disminución en la masa corporal y un aumento en el gasto energético (Pfluger y col., 2008).

En este trabajo, se revisará el efecto de la hormona de crecimiento en la diferenciación de adipocitos beige, con el antecedente del estímulo de UCP-1 en adipocitos marrón y su actividad directa sobre adipocitos blancos.

### III. JUSTIFICACIÓN

La obesidad se ha convertido en una patología de relevancia a nivel mundial, en particular, México ocupa el primer lugar en obesidad infantil y el segundo en adultos mayores de veinte años. Las consecuencias que puede desencadenar son patologías secundarias como diabetes mellitus tipo 2, cardiopatías y algunos tipos de cáncer. Para atender y mejorar las condiciones generadas en esta patología se han desarrollado diferentes fármacos, sin embargo, la problemática crece cuando éstos generan daños a la salud como efectos secundarios. Por tal razón, el diseño de nuevas estrategias es necesario para tratar la obesidad. Una perspectiva en la cual se ha generado interés en los últimos años como vía para tratar la obesidad ha sido poder incrementar el gasto de energía en las personas afectadas con ésta patología. Este proceso, denominado termogénesis, está regulado por el tejido adiposo marrón. Los depósitos de tejido adiposo marrón están localizados en regiones diferentes al tejido adiposo blanco involucrado en la acumulación de triglicéridos durante la obesidad, sin embargo, se ha observado la presencia de adipocitos marrones dentro de depósitos de tejido adiposo blanco los cuales se han denominado como adipocitos beige, que en respuesta a ciertos estímulos, adquieren características tipo adipocito marrón como la expresión de UCP1. La alternativa de poder aprovechar esta particularidad de los adipocitos beige e incrementar la liberación de energía mediante la proliferación y diferenciación de progenitores en tejido adiposo blanco (estimular proliferación y diferenciación de los adipocitos beige), podría funcionar como terapia contra la acumulación excesiva de triglicéridos en un estado de obesidad, disminuyendo con ello las complicaciones secundarias que causa. Este objetivo puede lograrse con la ayuda de algunos agentes hormonales como la GH la cual está involucrada en el incremento de termogénesis en tejido adiposo marrón así como el aumento de UCP-1 en adipocitos beige, razón por la cual se propone su uso como una estrategia de diferenciación de adipocitos beige.

#### **IV. HIPÓTESIS**

La administración de hormona de crecimiento en conjunto con factores adipogénicos en la línea celular de preadipocitos 3T3-L1, estimulará su diferenciación en adipocitos beige.

## V. OBJETIVOS

### V.1 General

Evaluar en preadipocitos en cultivo *in vitro*, el efecto de la administración de la hormona de crecimiento, en conjunto con otros factores adipogénicos sobre la diferenciación a adipocitos beige.

### V.2 Específicos

- Evaluar el efecto en la diferenciación de preadipocitos a adipocitos beige causado por la combinación de hormona de crecimiento (GH) con diferentes factores de inducción.
- Evaluar el efecto de la hormona de crecimiento en los cambios en forma y acumulación de gotas lipídicas, mediante microscopía de luz, en adipocitos beige diferenciados.
- Evaluar el efecto de la administración de la hormona de crecimiento (GH) sobre el grado de diferenciación, mediante rojo oleoso, en adipocitos beige diferenciados.
- Evaluar el efecto de la administración de la hormona de crecimiento sobre la expresión del marcador específico cd137, mediante citometría de flujo, en adipocitos beige diferenciados.

## VI. MATERIALES Y MÉTODOS

### VI.1 Estrategia Experimental

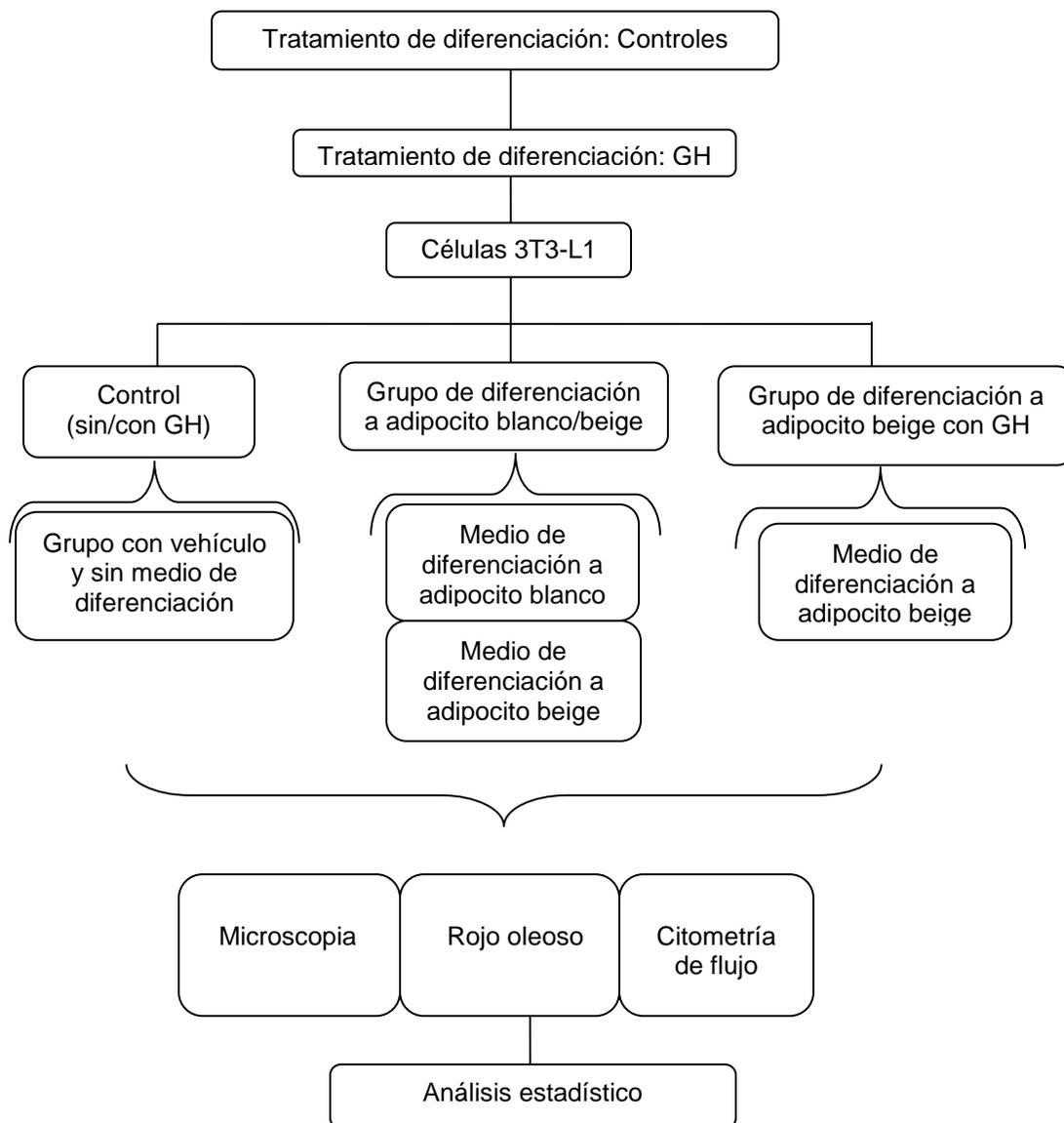


Figura 9. Representación esquemática de la estrategia experimental.

## VI.2 Materiales

### VI.2.1 Material biológico: Cultivo celular

Se utilizó la línea celular establecida de fibroblastos 3T3-L1 (ATCC No.CL-173). Las células se cultivaron en medio DMEM (Dubelco's Modified Eagle Medium, Gibco) con 10% de SFB (Suero fetal bovino, Gibco) y 2% de antibiótico-antimicótico (penicilina-estreptomomicina-fungizona, Gibco) en una incubadora con las siguientes condiciones a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> y 80% de humedad. Cuando el cultivo alcanzó el 80% de confluencia, las células se disgregaron mediante acción enzimática con tripsina para su propagación y conteo para subsecuente experimentación.

## VI.3 Métodos

### VI.3.1 Cultivo celular. Diferenciación de células 3T3-L1

Las células 3T3-L1 se incubaron con medio de diferenciación para la inducción a adipocito blanco y adipocito beige como controles positivos. Se cultivaron en medio DMEM con 10% SFB (suero fetal bovino) y 2% de penicilina-estreptomomicina-fungizona. Una vez que alcanzaron el 80% de confluencia se disgregaron por acción enzimática con tripsina y se realizó el conteo para sembrar 70,00 células por pozo en una placa de 24 pozos. Dos días después, alcanzada la confluencia del 80% (denominado día 0), se cambió el medio por el medio de diferenciación respectivo para la diferenciación a adipocito blanco utilizado como control (figura 10). Dos días después (denominado día 2) se cambió al medio de mantenimiento con las concentraciones indicadas en la figura 10. Tres días después (denominado día 5) se cambió el medio por nuevo

medio de mantenimiento para cada tratamiento hasta el último día de tratamiento, el día 7.

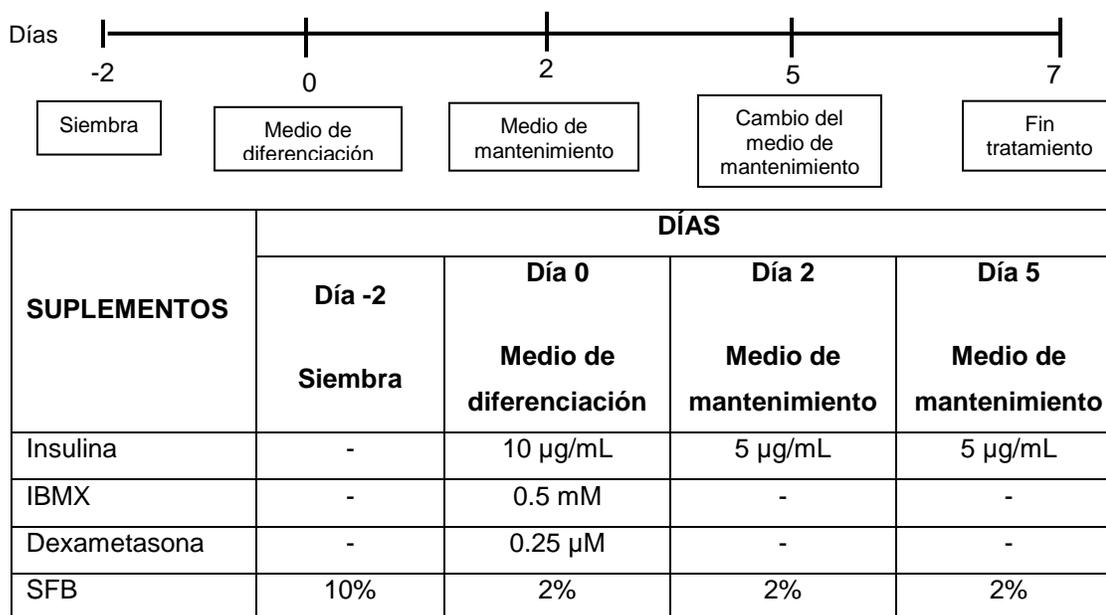


Figura10. Esquema que muestra los días de tratamiento y las concentraciones utilizadas para la diferenciación a adipocito blanco.

Para el caso del grupo control a diferenciación de adipocito beige se mantuvo el mismo procedimiento con cambios en los componentes del medio de diferenciación. Una vez que las células alcanzaron el 80% de confluencia se disgregaron por acción enzimática con tripsina y se realizó el conteo para sembrar 70,00 células por pozo en una placa de 24 pozos. Dos días después (denominado día 0) alcanzada la confluencia del 80%, se cambió el medio por el medio de diferenciación respectivo para la diferenciación a adipocito beige utilizado como control (figura 11). Dos días después (denominado día 2) se cambió al medio de mantenimiento con las concentraciones indicadas en la figura 11. Tres días después (denominado día 5) se cambió el medio por nuevo medio de mantenimiento para cada tratamiento hasta el último día de tratamiento, el día 7.

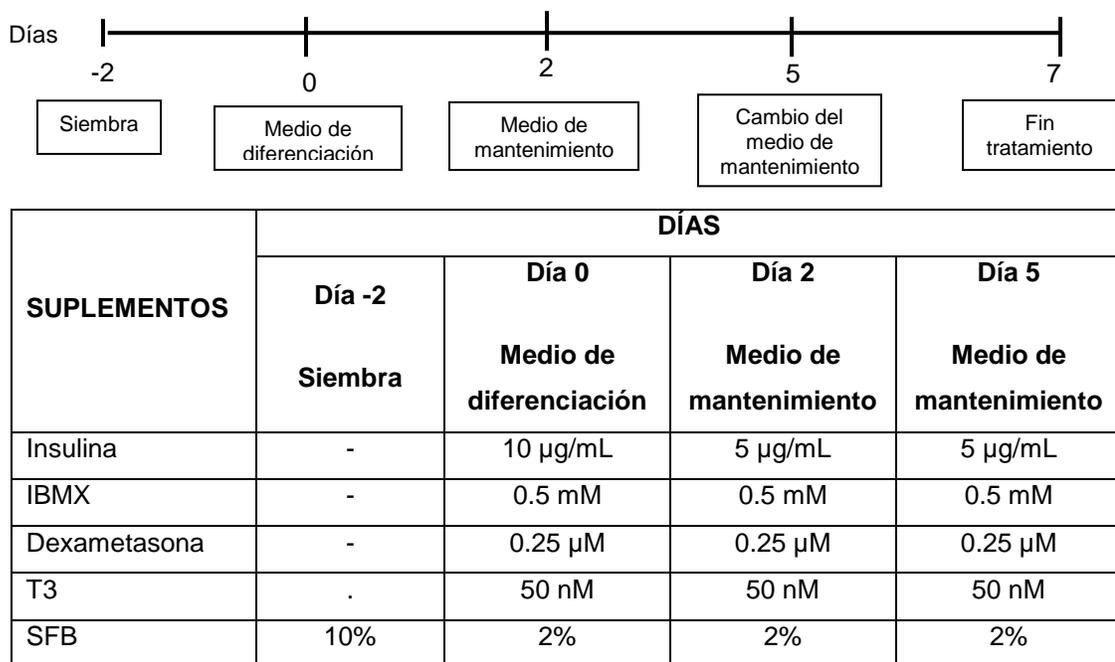


Figura 11. Esquema que muestra los días de tratamiento y las concentraciones utilizadas para la diferenciación a adipocito beige.

Para el grupo al cual se le administró la hormona de crecimiento, se manejaron las mismas condiciones de inducción a adipocito beige, siendo suplementado el medio de diferenciación y el de mantenimiento (figura 12) con 50 ng/mL de hormona de crecimiento, desde el día cero hasta el día 7 (Kawai y col., 2007).

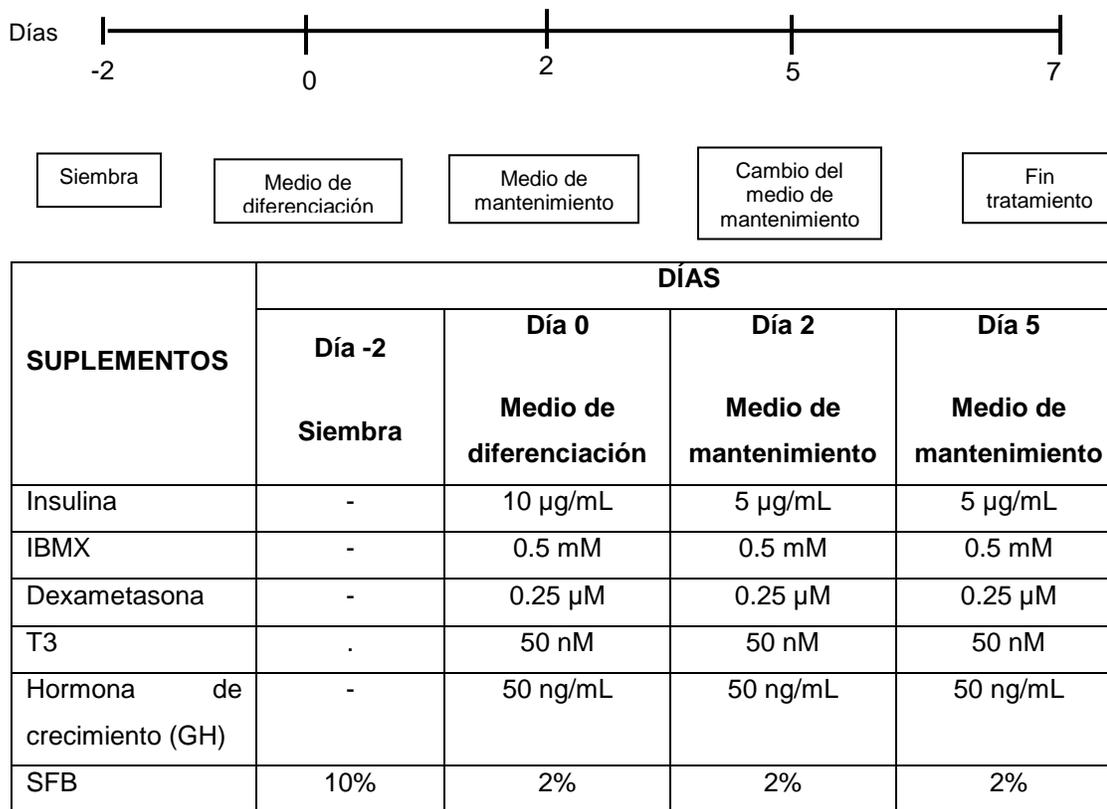


Figura 12.- Esquema que muestra los días de tratamiento y las concentraciones utilizadas para la diferenciación a adipocito beige suplementado con hormona de crecimiento.

### VI.3.2 Microscopía: Observación del proceso de diferenciación

Se realizaron las observaciones mediante microscopía de luz, del progreso de la diferenciación en los diferentes grupos de trabajo. Se tomaron micrografías como evidencia del avance en el proceso y de los cambios característicos que se llevaron a cabo en las células durante el día 0, 2, 5 y 7 de tratamiento.

### VI.3.3 Rojo Oleoso: Determinación del grado de diferenciación

Después de la diferenciación, las células se lavaron con PBS 1X y se fijaron con paraformaldehído al 4% a temperatura ambiente durante 10 minutos. Después se permeabilizaron con isopropanol al 3% durante 10 minutos, para ser teñidas después con solución de Rojo Oleoso (6 partes de solución de Rojo Oleoso en 4 partes de agua; la solución madre es al 0.5% de Rojo Oleoso en isopropanol) lavadas con agua destilada tres veces y visualizadas mediante microscopia de luz para examinar las gotas lipídicas como indicadores de adipogénesis (Ramírez-Zacarías y col., 1992).

VI.3.3 Determinación de la expresión proteica de CD137 mediante citometría de flujo.

Las células se sembraron en cajas de 24 pozos, con triplicado por tratamiento. Después de los siete días de diferenciación, se retiró el medio y se despegaron de manera mecánica en FACS flow para no afectar la integridad del marcador de membrana a medir en el ensayo. Las células se centrifugaron a 2,500 rpm durante 6 minutos, se retiró el sobrenadante y se resuspendieron en 50  $\mu$ L de FACS flow. Las células se incubaron por 30 min con 20  $\mu$ L de anti-cd137-PE (BD). Después se centrifugaron a 2,500 rpm durante 6 min, se retiró el sobrenadante y después del tercer lavado, las células se resuspendieron en 500  $\mu$ L de FACS flow para proceder a realizar la lectura de las muestras.

## VII.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el análisis estadístico, los experimentos se realizaron triplicados de tres experimentos independientes. Los datos para los experimentos representativos se presentan como la media  $\pm$  error estándar seguidos de la comparación entre grupos por ANOVA y prueba *post hoc* de Tukey. Para el análisis estadístico se utilizó el programa JMP 12.0.

## VIII. RESULTADOS Y DISCUSIONES

### VIII.1 Evaluación de los cambios durante la diferenciación de las células 3T3-L1 mediante microscopía de luz.

La línea celular 3T3-L1 murina es un modelo utilizado preferentemente para la diferenciación de adipocitos siendo establecido como un modelo viable para la acumulación de vesículas de triglicéridos en su citoplasma, desde hace algunas décadas (Green y Kehinde, 1975; Cornelius y col., 1994).

La morfología inicial de la línea celular es del tipo fibroblástico, la cual puede adquirir la morfología redonda y con gotas lipídicas en su interior como un adipocito después de ser inducida bajo una combinación hormonal establecida, utilizando insulina, isobutylmetilxantina y dexametasona (Cornelius y col., 1994; Reicher y Eick, 1999).

Con el conocimiento de los antecedentes previos, la inducción se realizó bajo las condiciones establecidas en nuestra metodología y modificado de Asano y col., (2014), ya que en nuestro proyecto implementamos el tratamiento de inducción a adipocito beige suplementado con 50 ng/mL de hormona de crecimiento recombinante humana.

Con base en el conocimiento del cambio que tienen las células ante una inducción de diferenciación a adipocitos, primero, se evaluó el progreso en la diferenciación de las células en tratamiento, así como los cambios que éstas presentaban a lo largo de los días establecidos durante el ensayo, tomando como referencia el día en que inició el tratamiento (día 0) y los días en que se realizaron cambio de medio y tratamiento de inducción a los diferentes grupos (día 2 y día 5) así como el día final de inducción (día 7).

En la figura 13, podemos observar a las células 3T3-L1 antes de colocar el medio de inducción en los diferentes grupos, en el día 0, en el cual inicia el tratamiento. Se puede observar que las células aún presentan la forma celular del tipo fibroblástico, sin embargo, con algunos ligeros cambios en su forma celular debido a que se encuentran en confluencia, punto en el cual las células están bajo las condiciones ideales para comenzar el proceso de diferenciación. Podemos observar que todos los grupos de tratamiento parten del mismo punto en referencia a características como la forma celular y confluencia.

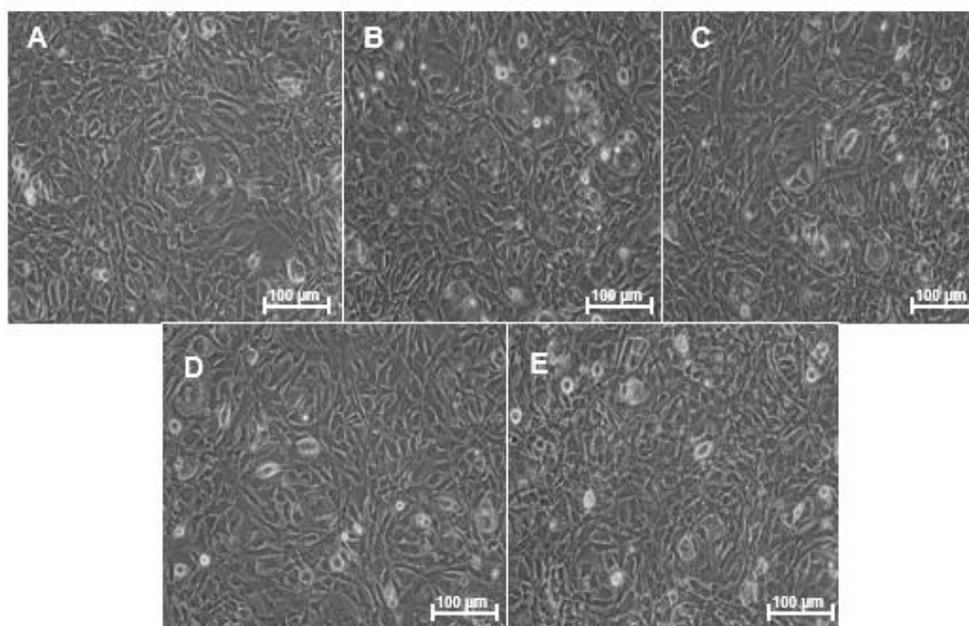


Figura 13. Ensayo de diferenciación en células 3T3-L1 al inicio del tratamiento. Las fotografías muestran a las células 3T3-L1 en el día 0 que inicia el ensayo de inducción, bajo diferentes estímulos. A: células control, B: Células con inducción a adipocito blanco, C: células con inducción a adipocito beige D: células con inducción a adipocito beige suplementado con 50 ng/mL de hormona de crecimiento, E: células con sólo 50 ng/mL de hormona de crecimiento.

Se sabe que las células presentan cambios en su estructura celular y nuclear, como el tamaño y la forma, cuando están bajo un proceso de diferenciación (Kamada y col., 2016), el cual no es importante identificar y analizar bajo un proceso de observación, que en el caso de los adipocitos, el proceso más importante a identificar es la formación de las gotas lipídicas en su interior.

En el progreso de diferenciación, las células presentaron cambios característicos a los dos días que ésta se lleva a cabo, donde podemos observar que las células de los grupos con diferenciación a adipocito blanco, beige y beige suplementado con hormona de crecimiento, comienzan a presentar formas esféricas, características de la inducción.

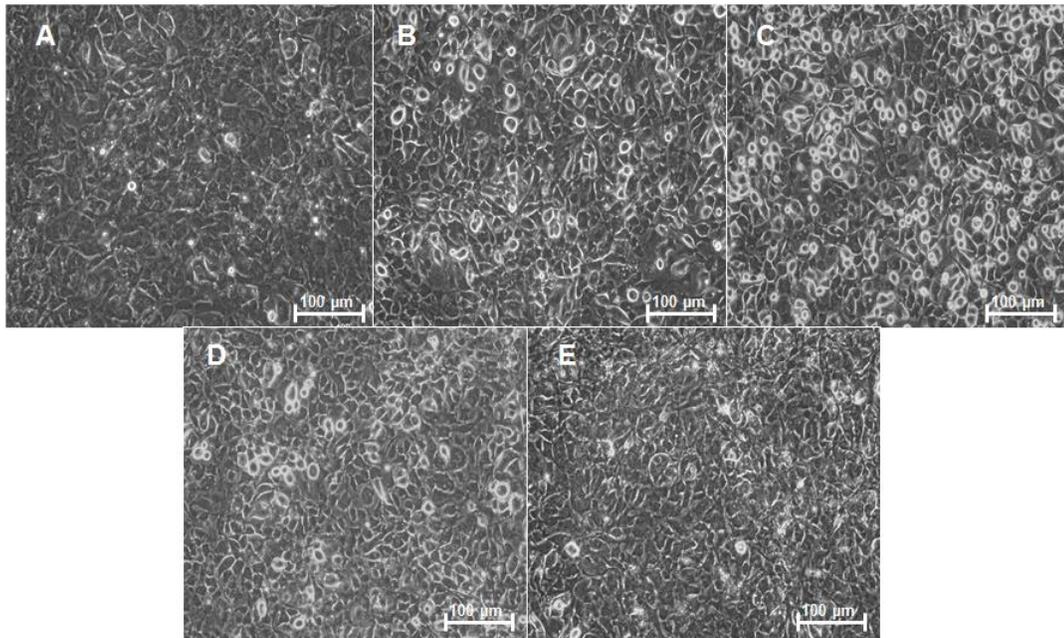


Figura 14. Progreso del ensayo de diferenciación en células 3T3-L1. Las fotografías muestran a las células 3T3-L1 en el día 2 del ensayo de inducción. A: células control, B: Células con inducción a adipocito blanco, C: células con inducción a adipocito beige D: células con inducción a adipocito beige suplementado con 50 ng/mL de hormona de crecimiento, E: células con sólo 50 ng/mL de hormona de crecimiento.

Al día cinco de la diferenciación (Figura 15), podemos observar cambios característicos en la forma de las células de cada grupo, encontrando que los grupos de diferenciación a adipocitos beige (con y sin suplemento de hormona de crecimiento) presentan una agrupación celular distinta al grupo de diferenciación a blanco. De igual forma es visible la acumulación de gotas lipídicas al interior de la célula de los grupos en estímulo de diferenciación (Figura 15: B, C Y D). Se puede observar la presencia de más gotas lipídicas en el grupo de diferenciación a adipocitos blancos, respecto a los demás grupos de tratamiento, al igual que respecto al día 2 de diferenciación, con lo cual podemos sugerir, bajo las condiciones de nuestro experimento, que el día 5 de diferenciación, en uno de los días básicos para encontrar diferencias en el tamaño y forma de las células que indiquen el progreso de un proceso de diferenciación.

Nuestros resultados se pueden comparar con los obtenidos por Rizzatti y col., (2013), quienes utilizan un protocolo de diferenciación de 5 días, ya que se considera que éstos días, bajo el estímulo constante, son suficientes para inducir la acumulación de triglicéridos en forma de gotas lipídicas y con ellos el fenotipo de adipocito deseado.

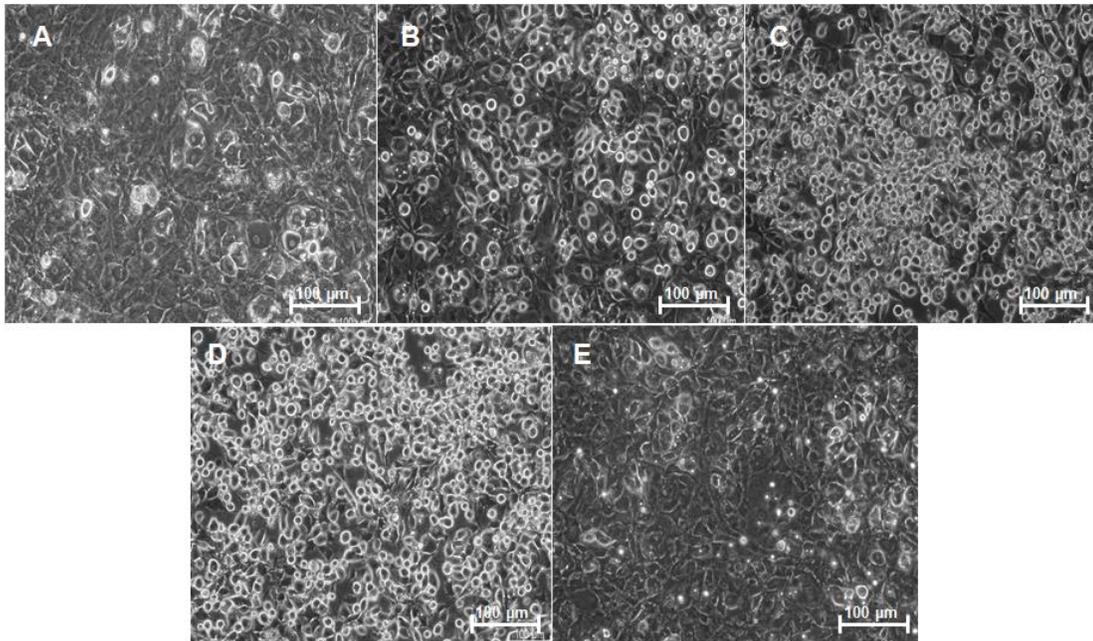


Figura 15. Progreso del ensayo de diferenciación en células 3T3-L1 durante el día 5 de tratamiento. Las fotografías muestran a las células 3T3-L1 en el día 5 del ensayo de inducción, bajo diferentes estímulos. A: células control, B: Células con inducción a adipocito blanco, C: células con inducción a adipocito beige D: células con inducción a adipocito beige suplementado con 50 ng/mL de hormona de crecimiento, E: células con sólo 50 ng/mL de hormona de crecimiento.

Finalmente, al día 7 se tomaron las micrografías finales (figura 16) previas a los ensayos de rojo oleoso, que muestran el cambio de los diferentes grupos de inducción respecto al control. Podemos observar el grado de diferenciación por campo observado, con la característica particular, de los grupos con diferenciación a adipocito beige y beige suplementado con hormona, de la formación de grupos de células con formas esféricas y menos contenido de gotas lipídicas visibles en comparación a los adipocitos blancos.

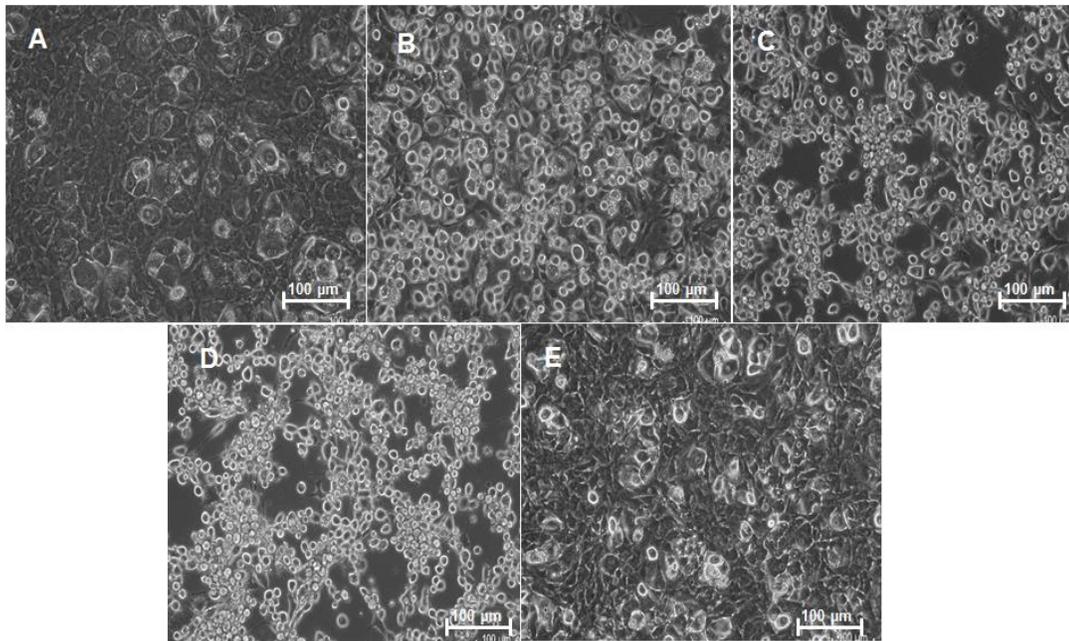


Figura 16. Fin del ensayo de diferenciación en células 3T3-L1. Las fotografías muestran a las células 3T3-L1 en el día 7 del ensayo de inducción, bajo diferentes estímulos. A: células control, B: células con inducción a adipocito blanco, C: células con inducción a adipocito beige D: células con inducción a adipocito beige suplementado con 50 ng/mL de hormona de crecimiento, E: células con sólo 50 ng/mL de hormona de crecimiento.

#### VIII.2 Evaluación de la diferenciación mediante la técnica de rojo oleoso

Para corroborar lo observado en el seguimiento mediante microscopía de luz a los diferentes grupos de diferenciación, se evaluó el contenido lipídico en nuestras células, para realizar una comparación respecto al control del grado de diferenciación entre los diferentes grupos. Se realizó la técnica de rojo oleoso donde se llevó a cabo una semi-cuantificación del contenido lipídico en las células de cada tratamiento.

En la Figura 17 se puede observar la tinción de las gotas lipídicas de los adipocitos diferenciados en los tres grupos de inducción, adipocito blanco (A.

blanco), adipocito beige (A. Beige) y adipocito beige suplementado con hormona de crecimiento (A.Beige + GH) .

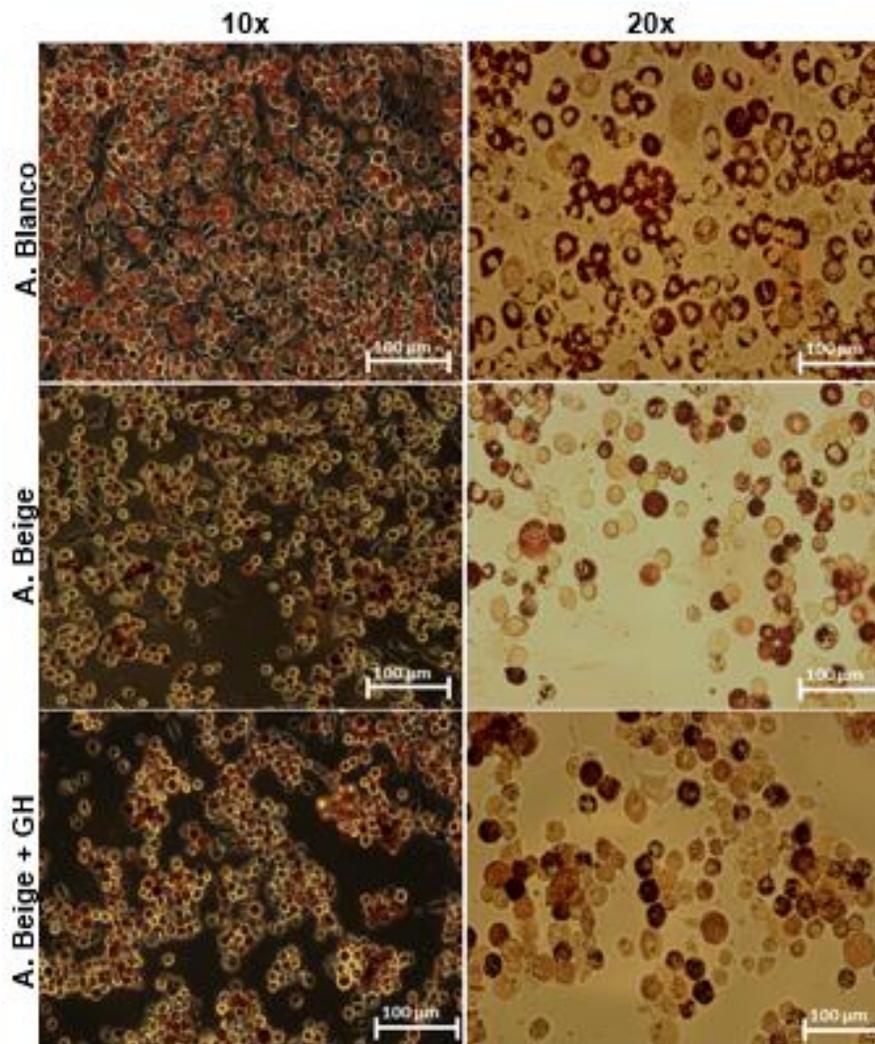


Figura 17. Ensayo de rojo oleoso a células 3T3-L1 diferenciadas. Las fotografías muestran la tinción de las gotas lipídicas de las células diferenciadas, llevada a cabo con la técnica de Rojo Oleoso en el día 7 del ensayo de inducción, bajo diferentes estímulos. Adipocito blanco (A. Blanco), Adipocito beige (A. Beige), Adipocito beige suplementado con 50 ng/mL de hormona de crecimiento (A. Beige +GH).

De acuerdo a los resultados observados en el ensayo de rojo oleoso, se puede distinguir el patrón en la formación de gotas lipídicas que se obtuvo en cada uno de los grupos de diferenciación. En el caso de las células que recibieron la inducción a adipocito blanco, las gotas lipídicas son más grandes aunque de tamaños diversos alrededor del citoplasma de la célula. De acuerdo a Blouin y col., en el 2010, esta forma irregular de gotas lipídicas, con un patrón alrededor del núcleo y en todo el citoplasma, es particular de los adipocitos blancos diferenciados a partir de la línea celular 3T3-L1 las cuales se ven afectadas por diferentes factores, como ciertas proteínas en particular, para presentar el patrón estructural que las conforma.

Por el contrario, las células diferenciadas a adipocitos beige, tanto las que recibieron la inducción a adipocito beige como las suplementadas con hormona de crecimiento, presentan un patrón de gotas lipídicas más pequeñas respecto al grupo de adipocitos blanco, y con un patrón de aparición diferente, cubriendo en su totalidad el área observada de la célula, lo cual se puede observar con mayor detalle en el aumento 20x correspondiente a cada grupo en la figura 17. Cabe mencionar que el estudio de la diferenciación de los adipocitos beige a partir de células 3T3-L1 es un campo en desarrollo, por lo cual no existen evidencias detalladas acerca de la forma y tamaño de éstas células diferenciadas *in vitro* a partir de la línea celular del tipo fibroblástica mencionada. Bajo ese conocimiento, es de especial interés, las imágenes mostradas en nuestro ensayo, ya que se sugiere una de las posibles características que se pueden observar y distinguir al utilizar la línea celular 3T3-L1 como modelo para la obtención de adipocitos beige.

Con la observación de los diferentes grupos a lo largo de los 7 días de tratamiento, y con el ensayo de rojo oleoso, se puede distinguir que se llevó a cabo el proceso de diferenciación de las células, considerando los cambios en su forma celular al igual que la acumulación de gotas lipídicas claramente

distinguibles en la técnica de rojo oleoso. Se realizó la extracción del colorante en las gotas lipídicas para poder realizar una semi-cuantificación del grado de diferenciación de nuestras células respecto al grupo control.

De acuerdo a Ramírez-Zacarías y col. (1992), el grupo de trabajo que estableció la técnica de rojo oleoso para el estudio del grado diferenciación y acumulación de lípidos en las células 3T3-L1, la acumulación de triglicéridos en dichas gotas lipídicas es proporcional al incremento de los valores de absorbancia que se realizan durante el ensayo. En nuestro estudio, se puede observar el cambio estadísticamente significativo respecto al control en la acumulación de triglicéridos en los tratamientos de diferenciación a adipocito blanco, adipocito beige y adipocito beige suplementado con hormona de crecimiento (figura 18), lo cual nos muestra una medida indirecta del grado de diferenciación en nuestras células la cual coincide con lo establecido por Ramírez-Zacarías y col., en 1992, ya que a mayor contenido o formación de gotas lipídicas mayor será la extracción del colorante de éstas. En la figura 17, podemos observar la tendencia de gotas lipídicas en nuestras células, en las cuales se distinguen más gotas teñidas en el grupo de adipocitos blancos, lo cual concuerda con la semi-cuantificación presentada en la figura 18.

Entre los grupos de inducción a adipocito beige respecto al suplementado con hormona de crecimiento, no se observa un efecto estadísticamente significativo de ésta sobre el aumento del contenido lipídico. De acuerdo a estos resultados, se observa que no hay un impacto claro en esta característica de diferenciación por parte de la hormona de crecimiento sobre las células 3T3-L1.

Los resultados obtenidos con la hormona de crecimiento concuerdan con lo reportado por Kawai y col. (2007) para adipocitos blancos, quienes utilizando el protocolo de inducción inicial de diferenciación de dos días y hormona de crecimiento tanto en el medio de diferenciación como en el de mantenimiento, no encuentran diferencia significativa entre el grupo que recibe la hormona de

crecimiento y el control, que sólo recibe la inducción con la combinación de isobutilmetilxantina, dexametasona e insulina, utilizada para la inducción a adipocito blanco en este caso. Ellos sugieren que el efecto real de la hormona de crecimiento bajo estas condiciones puede ser opacado por la combinación de estos agentes en la inducción.

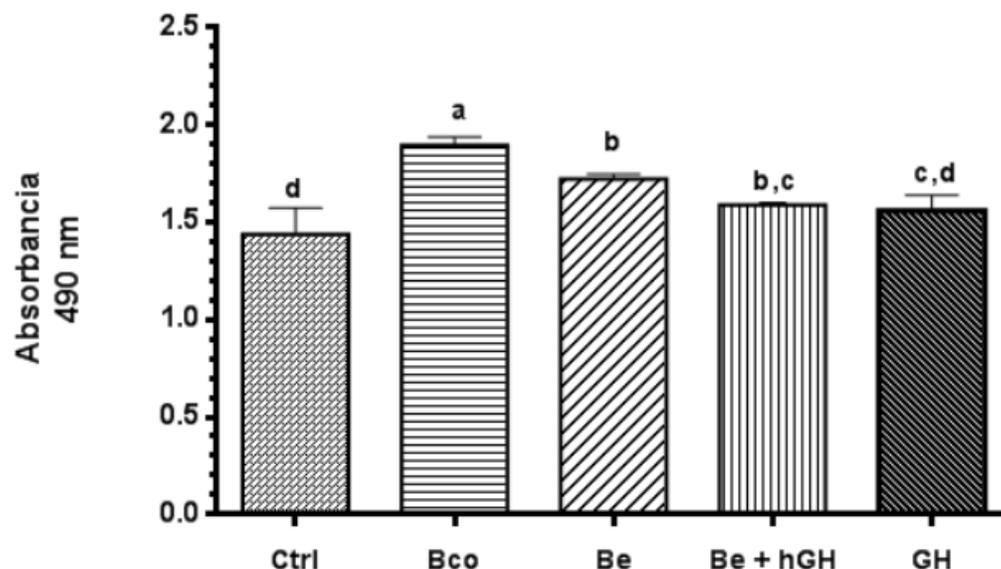


Figura 18. Contenido lipídico determinado mediante la técnica de rojo oleoso en células 3T3-L1 diferenciadas. Letras diferentes indican diferencia estadística significativa entre grupos ( $p < 0.05$ ), evaluado por la prueba de Tukey. Ctrl (Control), Bco (adipocitos blancos), Be (adipocitos beige), Be+GH (adipocito beige + hormona de crecimiento), GH (hormona de crecimiento).

Los resultados que se obtuvieron con rojo oleoso, fueron una manera cualitativa de medir el grado de diferenciación en nuestras células, sin embargo mediante esta metodología es complicado definir el contenido lipídico característico para cada grupo de adipocitos en específico, ya que para el grupo de adipocitos beige, no existen reportes previos a partir de células 3T3-L1. Sin embargo una manera de diferenciar entre ambos grupos es con marcadores específicos, que

en este estudio fueron la proteína Tcf21 (al igual que el gen *TCF21*) para los adipocitos blancos y el gen *CITED1* para los adipocitos beige. De acuerdo a lo mostrado en la figura 21 (ANEXO I), podemos observar la presencia de la proteína Tcf21 en el grupo de adipocitos blancos, al igual que la expresión del gen. Por su parte, el grupo de adipocitos beige, también presentó la expresión de su gen específico *CITED1*. Con lo cual podemos observar que pese al contenido lipídico en ambos grupos, la diferenciación al tipo específico de célula, se llevó a cabo.

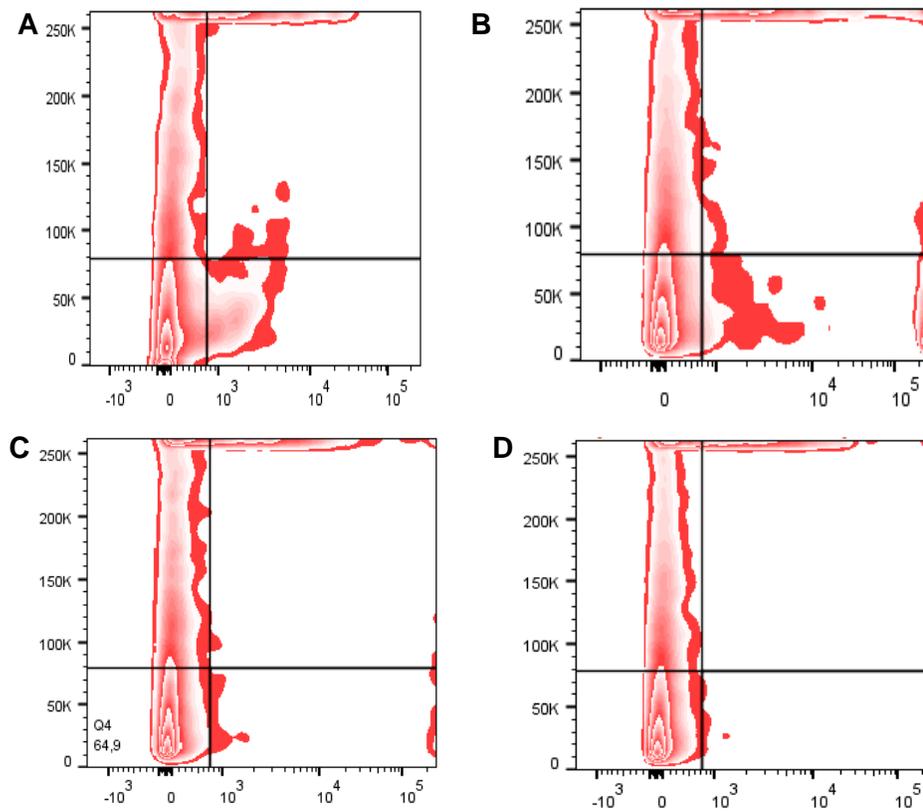
### VIII.3 Evaluación de la expresión del marcador de adipocitos beige cd137

Para determinar si la hormona de crecimiento tiene algún efecto final sobre el aumento en la diferenciación de los adipocitos beige, se llevó a cabo el análisis de la expresión del marcador cd137 mediante la técnica de citometría de flujo. Éste marcador en particular, está reportado como uno de los principales expresados en adipocitos beige, por lo cual se utiliza como molécula para su identificación (Walden y col., 2012; Wu y col., 2012).

Observamos, de acuerdo a lo mostrado en la figura 19, que no existe una expresión mayor del marcador en los adipocitos beige (figura 19-C) respecto al control (figura 19-A). Por el contrario, y de acuerdo a lo representado en los histogramas, la tendencia de los resultados sugieren que, los grupos de adipocitos blanco, al igual que las células que sólo recibieron hormona de crecimiento en el medio, mientras que las células control, presentan una mayor expresión del marcador cd137 respecto a los dos grupos de adipocitos beige, con y sin suplemento de hormona de crecimiento, presentando una media de porcentaje de expresión de  $4.68 \pm 0.83$  para el caso de los adipocitos blancos, contra un valor de  $1.94 \pm 0.68$  del grupo de adipocitos beige.

Comparando entre los grupos de diferenciación a adipocitos beige, el grupo que recibió el suplemento con hormona de crecimiento, presenta porcentajes de

expresión más bajos de cd137 respecto al grupo de diferenciación de adipocito beige sin suplemento, con una media de  $0.44 \pm 0.14$  (figura 19-F); sin embargo no es estadísticamente significativa. Con estos resultados podemos reportar, en lo que respecta a la acumulación de lípidos y la expresión de uno de los marcadores de adipocitos beige, que la hormona de crecimiento no tiene influencia en el aumento de la diferenciación de este tipo celular específico, a partir de células 3T3-L1.



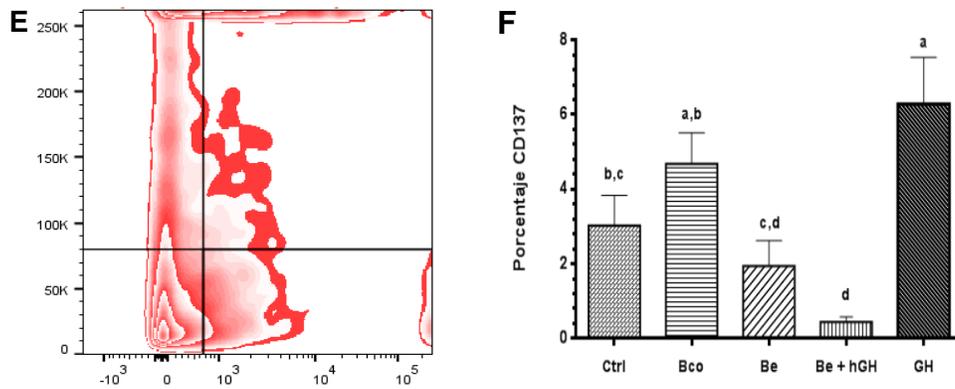


Figura 19. Expresión del marcador cd137 en los diferentes grupos de diferenciación. Representación mediante histogramas, ejes de las abscisas: cd137-PE, eje de las ordenadas: FSC-A. A) control, B) adipocitos blancos, C) adipocitos beige, D) adipocitos beige más hormona de crecimiento, E) grupo con sólo hormona de crecimiento. En la gráfica (F) las letras diferentes sobre las barras indican diferencia estadística significativa entre grupos ( $p < 0.05$ ), evaluado por ANOVA seguido de la prueba *post hoc* de Tukey. Ctrl (Control), Bco (adipocitos blancos), Be (adipocitos beige), Be+hGH (adipocito beige + hormona de crecimiento), GH (hormona de crecimiento). Los datos muestran los valores representativos de 3 experimentos de manera independiente.

Los resultados obtenidos al momento, nos podrían estar sugiriendo un mecanismo que no esperábamos por parte de la hormona de crecimiento, en el que no está involucrada en el aumento de la diferenciación de los adipocitos beige, pero si podría tener un efecto directo en la expresión de cd137. Sin embargo, no contamos con la evidencia previa reportada por otros trabajos de investigación, ya que cabe mencionar, el estudio del efecto de la hormona de crecimiento sobre la diferenciación de los adipocitos beige es un tema en desarrollo en el presente trabajo.

A pesar de encontrar una expresión promedio baja del marcador cd137 en las células diferenciadas a adipocitos beige, respecto a los demás grupos, la

proteína está presente. Sin embargo, se debe destacar que la comparación que se realiza entre grupos de células diferenciadas en una técnica como citometría de flujo se realiza en base al tamaño y complejidad de las células (figura 20), características claramente diferentes entre los grupos de células obtenidas, las cuales pudimos definir y observar en microscopia, en la técnica de rojo oleoso y con los resultados mostrados en citometría de flujo.

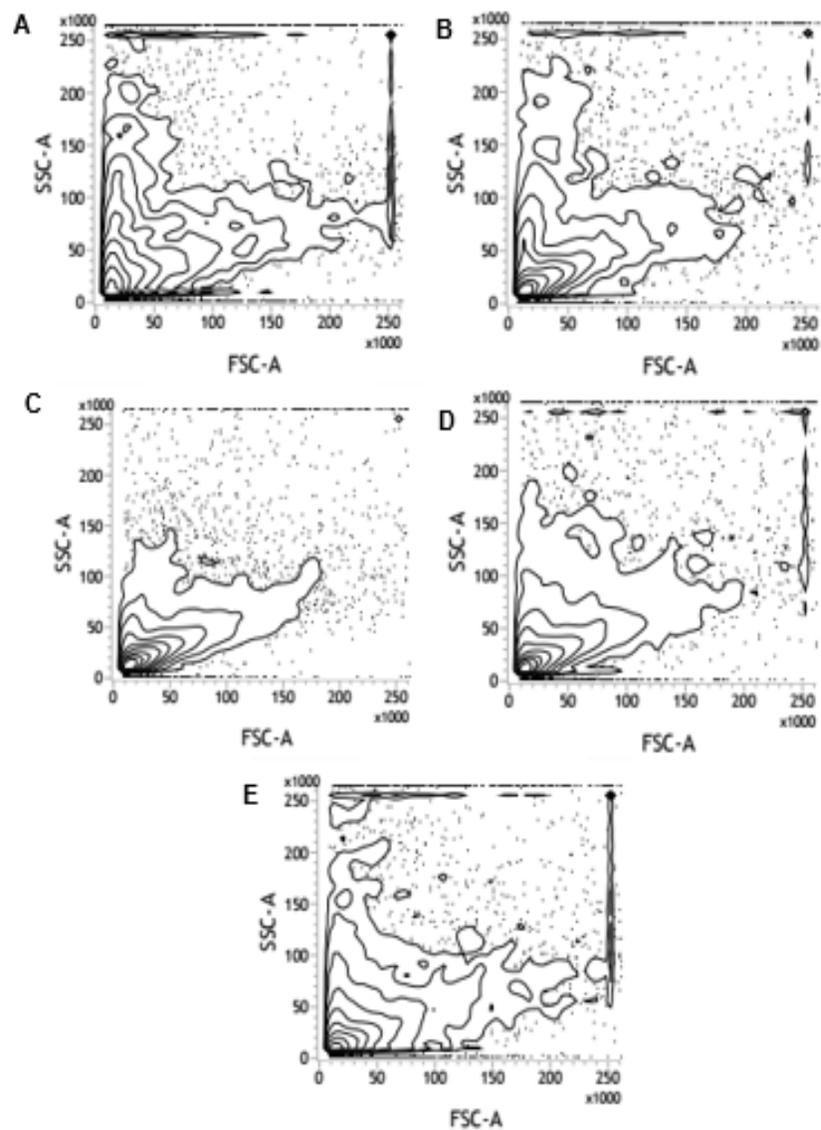


Figura 20. Gráficas del análisis de tamaño (FSC-A) y complejidad (SSC-A) de los diferentes grupos de tratamiento. A= control, B= adipocitos blancos, C= adipocitos beige, D= adipocitos beige más hormona de crecimiento, E= grupo con sólo hormona de crecimiento. Los datos muestran los valores representativos de 3 experimentos de manera independiente.

De acuerdo a los resultados, reflejados en las gráficas de tamaño (FSC-A) contra complejidad (SSC-A) mostradas en la figura 20, podemos observar como el grupo de diferenciación a adipocito blanco (figura 20-B), el grupo que sólo recibe hormona de crecimiento (figura 20-E) y el grupo control (figura 20-E), presentan valores más altos en el eje correspondiente a la complejidad de las células, al igual que en el eje correspondiente al tamaño. Por el contrario las células correspondientes al grupo de adipocitos beige (figura 20-C) y adipocitos beige con hormona de crecimiento (figura 20-D) presentan menor complejidad y tamaño.

El ajuste de lectura en el equipo de citometría se realiza en consideración a estos dos factores (características de tamaño y complejidad) para todos los grupos por igual, el cual al ser variable, podría ser la causa del resultado de observar niveles de expresión más bajos en el grupo de adipocitos beige.

Existen pocos estudios que muestran un análisis de los histogramas de tamaño comparado a complejidad mediante citometría de flujo de adipocitos, siendo en su mayoría enfocados en adipocitos blancos, ya que poco se ha estudiado acerca de éstas características en adipocitos beige, por ser células que se encuentran aún en caracterización. Sin embargo, de acuerdo a Majka y col. (2014), las características de complejidad (gotas lipídicas encontradas en nuestras células, así como la variabilidad en tamaño) tienen influencia los

valores de células detectadas como positivas ante una proteína específica durante un ensayo en citometría de flujo.

De acuerdo a nuestros resultados previos, existe una diferencia clara entre nuestros grupos de diferenciación. Los adipocitos blancos presentan gotas lipídicas más grandes en comparación a los adipocitos beige, con tamaños diversos e irregulares, y con un patrón de aparición diferente, características que, influyen en el deslizamiento sobre los ejes de nuestros histogramas mostrados. Con base en esto, se sugiere que los niveles encontrados en la expresión de cd137 en los adipocitos blancos, las células control y aquellas que sólo recibieron suplemento de hormona de crecimiento, podrían estar en el orden de aparición que se muestra en los histogramas, influenciados por el tamaño y complejidad de estas células, el cual es diferente a los adipocitos beige y beige suplementados con hormona de crecimiento, lo cual podría enmascarar un resultado más claro.

Esto coincide con lo mostrado por Kristóf y col. en 2015 donde analizan la complejidad de los adipocitos marrones en humanos (muy similares a los adipocitos beige) y diferencian el mismo patrón entre adipocitos blancos y adipocitos marrones.

Con tales antecedentes, se sabe también que puede observarse una diferencia en los resultados en citometría, del tipo que se muestra en el presente trabajo, debido a que la población de adipocitos diferenciados, es heterogénea, lo que significa que podemos encontrar células de diferentes tamaños en sus gotas lipídicas así como en su morfología dentro de un mismo grupo, lo cual conlleva un análisis más complejo difícil de regular en las condiciones de análisis en una hoja de trabajo durante un ensayo de citometría, ya que éstas deben ser reproducibles para todos los grupos (Loo y col., 2009).

## IX. CONCLUSIONES

- Existe un cambio característico y distintivo entre las células de los tratamientos de inducción al tipo específico de adipocito blanco y beige comparado a las células control.
- Las células diferenciadas en adipocitos blancos, presentan gotas lipídicas más grandes y con tamaños irregulares, respecto a los adipocitos beige.
- La semi-cuantificación del contenido lipídico, muestra que no existe diferencia significativa entre los grupos de diferenciación a adipocito beige y adipocitos beige suplementados con hormona de crecimiento, lo que sugiere que no existe un efecto de la hormona de crecimiento sobre dicho parámetro en este tipo celular específico y bajo estas condiciones de incubación.
- No existe un aumento en la expresión del marcador CD137 en las células diferenciadas a adipocitos beige con suplemento de hormona de crecimiento respecto a los adipocitos beige.
- La hormona de crecimiento no tiene un efecto en el aumento de la diferenciación a adipocitos beige bajo las condiciones de incubación utilizadas en este proyecto.

## **X.- BIBLIOGRAFÍA**

Asano, H., Knamori, Yanamori, Y., Higurashi, S. Nara, T., Kato, K., Matsui, T., y Funaba, M. 2014. Induction of beige-like adipocytes in 3T3-L1 cells. *Journal of veterinary medical science*, 76(1): 57-64.

Bartelt, A. y Heren, J. 2014. Adipose tissue browning and metabolic health. *Nature Reviews Endocrinology*, 10: 24-36.

Berryman, D.E., Glad, C.A.M., List E.O. y Johannsson, G. 2013. The GH/IGF-1 axis in obesity: pathophysiology and therapeutic considerations. *Nature Reviews Endocrinology*, 9: 1-8.

Bianco, A.C., y Kim, B.W. 2006. Deiodinases: Implications of the local control of thyroid hormone action. *Journal of Clinical Investigation*, 116:2571-2579.

Blouin, C.M., Le Lay, S., Eberl, A., Koefeler, H., Guerrera, I., Klein, C., Le Liepvre, X., Lasnier, F., Bourron, O., Gautier, J-F., Ferré, P., Hajdich, E. and Dugail. I. 2010. Lipid droplet analysis in caveolin-deficient adipocytes: alterations in surface phospholipid composition and maturations defects. *The Journal of Lipid Research*, 51: 945-956.

Brasaemle, D.L., Dolios, G., Shapiro, L., Wang, R. 2004. Proteomic analysis of proteins associated with lipid droplets of basal and lipolytically stimulated 3T3-L1 adipocytes. *The Journal of Biochemical Chemistry*, 279(45): 46835-46842.

Brazeau, P., Vale, W., Burgus, R., Ling, N., Butcher, M., Rivier, J. y Guillemin, R. 1973. Hypothalamic polypeptide that inhibits the secretion of immunoreactive pituitary growth hormone. *Science*, 179: 77-79.

Carey, A.L., Vorlander, C., Reddy-Luthmoodoo, M., Natoli, A.K., Formosa, M.F., Bertovic, D.A., Anderson, M.J., Duffy, S.J. y Kingwell, B.A. 2014. Reduced UCP-1 content in in vitro differentiated beige/brite adipocytes derived from preadipocytes of human subcutaneous white adipose tissues in obesity. *PLoS one*, 9(3): 1-6.

Carobbio, S., Rosen, B. y Vidal-Puig, A. 2013. Adipogenesis: new insights into brown adipose tissue differentiation. *Journal of Molecular Endocrinology*, 51 (3): 75-85.

Cannon, B. y Nedergaard, J. 2012. Cell biology: Neither brown or white. *Nature*, 488:286–287.

Chaves, V.E., Junior, F.M. y Bertolini, G.L. 2013. The metabolic effects of growth hormone in adipose tissue. *Endocrine*, 44: 293–302.

Cheung, B.M.Y., Cheung, T.T. y Samaranayake, N.R. 2013. Safety of antiobesity drugs. *Therapeutic Advances in Drug Safety*, 4 (4): 171-181.

Chia, D.J. 2014. Minireview: mechanisms of growth hormone-mediated gene regulation. *Molecular Endocrinology*, 28(7): 1012-1025.

Chu-Dinh, T. y Chu, D.-T. 2014. 4-1BB and the Epigenetic Regulations of This Medical Epigenetics, 2(3): 80-85.

Cinti, S. 2009. Transdifferentiation properties of adipocytes in the adipose organ. *American Journal of Physiology and Endocrinology Metabolism*, 297: E977–E986.

Cornelius, P., MacDougald, O.A., AND Lane, M. 1994. Regulation of adipocyte development. *Annuals Rveiews Nutrition*, 14: 99-129.

Enerbäck, S. 2010. Human Brown Adipose Tissue. *Cell*, 11 (4): 248-252.

Erman, A., Veilleux, A., Tcherno A. y Goodyer C.G. 2011. Human growth hormone receptor (GHR) expression in obesity: I. GHR mRNA expression in omental and subcutaneous adipose tissues of obese women. *International Journal of Obesity*: 1-9.

Farmer, S.R. 2006. Transcriptional control of adipocyte formation. *Cell Metabolism*, 4(4): 263-273.

Feng, B., Zhang, T. y Xu, H., 2013. Human adipose dynamics and metabolic health. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1281: 160–77.

Fisher, F.M., Kleiner, S., Douris, N., Fox, E.C., Mepani, R.J., Verdeguer, F., Wu, J., Kharitonov, A., Flier, J.S. y Maratos-Flier, E. 2012. FGF21 regulates PGC-1 $\alpha$  and browning of white adipose tissues in adaptive thermogenesis. *Genes Development*, 26:271–281.

Gahete, M.D., Córdoba-Chacón, J., Lin, Q., Brüning, J.C., Kahn, C.R., Castaño, J.P., Christian, H., Luque, R.M. y Kineman R.D. 2013. Insulin and IGF-I Inhibit GH Synthesis and Release in Vitro and in Vivo by Separate Mechanisms. *Endocrinology*, 154(7): 2410–2420.

Green, H. y Kehinde, O. 1975. An established preadipose cell line and its differentiation in culture. II Factors affecting the adipose conversion. *Cell*, 5: 19-27.

Guo, L., Li, X. y Qi-Qun, T. 2014. TRanscriptional Regulation of Adipocyte Differentiation: A Central Role for CCAAT/Enhancer-binding Protein(C/EBP) $\beta$ . *The Journal of Biological Chemistry*, 290: 755-761.

Harms, M. y Seale, P. 2013. Brown and beige fat: development, function and therapeutic potential. *Nature Medicine*, 19(10):1252–1263.

Irving, B.A., Still, C.D. y Argyropoulos, G. 2014. Does IRISIN Have a BRITE Future as a Therapeutic Agent for Humans?. *Current Obesity Reports*, 3(2): 235-241.

Justo, R., Frontera, M., Pujol, E., Rodríguez-Cuenca, S., Llado, I., García-Palmer, F., Roca, P., Gianotti, M. 2005. Gender-related differences in morphology and thermogenic capacity of brown adipose tissue mitochondrial subpopulations. *Life Sciences*, 76: 1147-1158.

Kajimura, S., y Saito, M. 2013. A New Era in Brown Adipose Tissue Biology: Molecular Control of Brown Fat Development and Energy Homeostasis. *Annual Review of Physiology*, 76: 225-249.

Kajimura, S., Seale, P. y Spiegelman, B. 2010. Transcriptional Control of Brown Fat Development. *Cell Metabolism*, 11(4): 257-262.

Kamada, R., Tano, F., Kudoh, F., Kimura N., Chuman, Y., Osawa, A., Namba, K., Tanino and Sakaguchi, K. 2016. Effective cellular morphology analysis for differentiation processes by a fluorescent 1,3a,6aLee-triazapentalene derivative probe in live cells.

Kamegai, J., Tamura, H., Shimizu, T., Ishii, S., Tatsuguchi, A., Sugihara, H., Oikawa, S., Kineman, R.D. 2004. The role of pituitary ghrelin in growth hormone (GH) secretion: GH-releasing hormone-dependent regulation of pituitary ghrelin gene expression and peptide content. *Endocrinology*, 145(8): 3731-3738.

Kawai, M., Namba, N., Mushiake, S., Etani, Y., Nishimura, R., Makishima, M. y Ozono, K. 2007. Growth hormone stimulates adipogenesis of 3T3-L1 cells through activation of the Stat 5A/5B-PPAR $\gamma$  pathway. *Journal of Molecular Endocrinology*, 38: 19-34.

Kim, G.W., Lin, J.E., Blomain, E.S. y Waldman S.A. 2014. Antiobesity Pharmacotherapy: New Drugs and Emerging Targets. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 95 (1): 53-64.

Kiskinis, E., Hallberg, M., Christian, M., Olofsson, M., Dilworth, S.M., White, R. y Parker, M.G. 2007. RIP140 directs histone and methylation to silence Ucp1 expression in white adipocytes. *EMBO Journals*, 26: 4831-4840.

Kristóf, E., Doan-Xuan, Q-M., Bai, P., Bacso, Z. y Fésüs L. 2015. Laser-scanning cytometry can quantify human adipocyte browning and proves effectiveness of irisin. *Scientific report, Nature*: 5 (12540).

Lee, Y.H., Petkova, A.P., Mottillo, E.P. y Granneman, J.G. 2012a. In vivo identification of bipotential adipocyte progenitors recruited by beta 3-adrenoceptor activation and high-fat feeding, *Cell Metabolism*, 15: 480–491.

Lee, J.Y., Takahashi, N., Yasubuchi, M., Kim, Y.I., Hashizaki, H., Kim, M.J., Sakamoto, T., Goto, T. y Kawada, T. 2012b. Triiodothyronine induces UCP-1 expression and mitochondrial biogenesis in human adipocytes. *American Journal of Physiology*, 302:C463-C472.

Lee, M.J., Wu, Y., Fried, S.K. 2013. Adipose tissue heterogeneity: Implication of depot differences in adipose tissue for obesity complications. *Molecular Aspects of Medicine*, 34: 1-11.

Lee, P., Linderman, J.D., Smith, S., Brychta, R.J., Wang, J., Idelson, C., Perron, R.M., Werner, C.D., Phan, G.Q., Kammula, U.S., Kebebew, E., Pacak, A., Chen, K.Y. y Celi, F.S. 2014a. Irisin and FGF21 are cold-induced endocrine activators of brown fat function in humans. *Cell Metabolism*, 19(2): 302-309.

Lee, P., Werner, C.D., Kebebew, E., Celi, F.S. 2014b. Functional thermogenic beige adipogenesis is inducible in human neck fat. *International Journal of Obesity (London)*, 38(2): 170-176.

Lee, Y.H., Thacker, R.I., Hall, B.E., Kong, R. y Granneman, G.J. 2014c. Exploring the activated adipogenic niche, Interactions of macrophages and adipocyte progenitors. *Cell Cycle*, 13 (2): 184-190.

Lidell, M.E., Betz, M.J., Dahlqvist Leinhard, O., Heglind, M., Elander, L., Slawik, M., Mussack, T., Nilsson, D., Romu, T., Nuutila, P., y col. 2013. Evidence for two types of brown adipose tissue in humans. *Nature Medicine*, 19:631–634.

Lin, J., Handschin, C., y Spiegelman, B.M. 2005. Metabolic control through the PGC-1 family of transcription coactivators. *Cell Metabolism*, 1(6): 361-70.

Lin, L., Saha, P.K., Ma, X., Henshaw, I.O., Shao, L., Chang, B.H.J., Buras, E.D, Tong, Q., Chan, L., McGuinness O.P. y Sun, Y. 2011. Ablation of ghrelin receptor reduces adiposity and improves insulin sensitivity during aging by regulating fat metabolism in white and brown adipose tissues. *Aging Cell*, 10: 996-1010.

List, E.O., Sackmann-Sala, L., Berryman, D.E., Funk, K., Kelder, B., Gosney, E.S., Okada, S., Ding, J., Cruz-Topete, D. y Kopchick, J.J. 2011. Endocrine Parameters and Phenotypes of the Growth Hormone Receptor Gene Disrupted (GHR<sup>-/-</sup>) Mouse. *Endocrine Reviews*, 32(3): 356-386.

Loo, L.H., Lin, H.J., Singh, D.K., Lyons, K.M., Altshuler, S.J. y Wu L.F. 2009. Heterogeneity on the physiological states and pharmacological responses of differentiating 3T3-L1 adipocytes. *The Journal of Cell Biology*, 187(3): 375.

López, S., Berumen L.C., Padilla, K., Miledi, R., Garcia, G. 2015. Expression of hippocampal serotonin receptors 5HT2C and 5HT5A in rat model of diet-

induced obesity supplemented with tryptophan, ELSEVIER. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 42: 80-85.

Majka, S., Miller, H.L., Helm, K.M., Acosta, A.S., Childs, C.R., Kong, R. y Klemm, D. 2014. Analysis and Isolation of Adipocytes by Flow Cytometry. *Methods Enzimology*, 537: 281-296.

Mercader, J., Ribot, J., Murano, I., Felipe, F., Cinti, S., Bonet, M.L., Palou, A. 2006. Remodeling of white adipose tissue after retinoic acid administration in mice. *Endocrinology*, 147(11):5325-5332.

Mercader, J., Palou, A., Bonet, M.L. 2010. Induction of uncoupling protein-1 in mouse embryonic fibroblast-derived adipocytes by retinoic acid. *Obesity*, 18(4):655-662.

Moller, N. y Jorgensen, J.L. 2009. Effects of growth hormone on glucose, lipid, and protein metabolism in human subjects. *Endocrinology Reviews*, 30: 152-177.

Moseti, D., Regassa, A., y Kim, W-K. 2016. Molecular Regulation of Adipogenesis and Potential Anti-Adipogenic Bioactive Molecules. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(124): 1-24.

Murholm, M., Isidor, M., Basse, A., Wijther, S., Serensen, C., Skovgaard-Petersen, J., Nielsen, M.M., Hansen, A.S., Quistorff, B. y Hansen J.B. 2013. Retinoic acid has different effects on UCP-1 expression in mouse and human adipocytes. *BMC Cell Biology*, 14(41):1-13.

Nam, S.Y. y Lobie P.E. 2000. The mechanism of effect of growth hormone on preadipocyte and adipocyte function. *The International Association for the Study of Obesity. Obesity reviews*, 1: 73–86.

Nedergaard, J. y Cannon, B. 2014. The Browning of White Adipose Tissue: Some Burning Issues. *Cell Metabolism*, 20 (2): 1-12.

Obregon, M.J. 2008. Thyroid hormone and adipocyte differentiation. *Thyroid*, 18:185-195.

Okamatsu-Ogura, Y., Fukano, K., Tsubota, A., Uozumi, A., Terao, A., Kimura, K. y Saito, M. 2013. Thermogenic Ability of Uncoupling Protein 1 in Beige Adipocytes in Mice. *Plos One*, 8 (12): 1-10.

Ouchi, N., Parker, J.L., Lugus, J.J. y Walsh, K. 2011. Adipokines in inflammation and metabolic disease. *Nature Reviews Immunology*, 11(2): 85-97.

Park A., Kim W.K. y Base K.H. 2014. Distinction of white, beige and brown adipocytes derives from mesenchymal stem cells. *World Journal of Stem Cells*, 6(1): 33-42.

Patel, R., Williams-Dautovich, J., y Cummins, C.L. 2014. Minireview: New Molecular Mediators of Glucocorticoid Receptor Activity in Metabolic Tissues. *Molecular Endocrinology*, 28(7): 999-1011.

Peckett, A.J., Wright, D.C. y Riddell, M.C. 2011. The effects of glucocorticoids on adipose tissue lipid metabolism. *Metabolism Clinical and Experimental*, 60: 1500-1510.

Peirce, V., Carobbio, S. y Vidal-Puig, A. 2014. The different shades of fat. *Nature*, 510: 76-83.

Petrovic, N., Walden, T.B., Shabalina, I.G., Timmons, J.A., Cannon, B., Nedergaard, J. 2010. Chronic peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) activation of epididymally derived white adipocyte cultures

reveals a population of thermogenically competent, UCP1-containing adipocytes molecularly distinct from classic brown adipocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 285(10): 7153–7164.

Pfluger, P.T, Kirchner H., Günzel, S., Schrott, B., Perez-Tilve, D., Fu, S., Benoit, S.C., Horvath, T., Joost, H.G., Wortley, K.E., Sleeman, M.W., Tschöp, M.H. 2008. Simultaneous deletion of ghrelin and its receptor increases motor activity and energy expenditure. *American Journal of Physiology*, 294(3): G610-G618.

Puigserver, P., Wu, Z., Park, C.W., Graves, R., Wright, M., y Spiegelman, B.M. 1998. A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis. *Cell*, 92(6): 829-39.

Ramírez-Zacarías, J.L., Castro-Mufiozledo, F., Kuri-Harcuch, W. 1992. Quantitation of adipose conversion and triglycerides by staining intracytoplasmic lipids with oil red O. *Histochemistry*. 97:493-7.

Reichert, M. and Eick, D. 1999. Analysis of cell cycle arrest in adipocyte differentiation. *Oncogene*, 18(2): 459-66.

Ribeiro, M.O., Bianco, S.D., Kaneshige, M., Schultz, J.J., Cheng, S.Y., Bianco, A.C. y Brent, G.A. 2010. Expression of uncoupling protein 1 in mouse brown adipose tissue is thyroid hormone receptor-beta isoform specific and required for adaptive thermogenesis. *Endocrinology*, 151:432-440.

Richard, D., Monge-Roffarello, B., Chechi, K., Labbé S.M. y Turcotte, E.E. Control and physiological determinants of sympathetically mediated brown adipose tissue thermogenesis. *Frontiers in Endocrinology*, 3(36): 1-8.

Reddy, N.L., TaN, B.K., Barber, T.M. y Randeve, H.S. 2014. Brown adipose tissue: endocrine determinants of function and therapeutic manipulation as a novel treatment strategy for obesity. *Biomed Central- Obesity*, 1(13): 1-12.

Rosenfeld, R.G., Belgorosky, A., Camacho-Hubner, C., Savage, M.O., Wit, J.M. y Hwa, V. 2007. Defects in growth hormone receptor signaling. *TRENDS in Endocrinology and Metabolism*, 18(4): 134-141.

Rutkowski, J.M., Stern, J.H. y Scherer, P.E. 2015. The cell biology of fat expansion. *The Journal of Cell Biology*, 208(5): 501-512.

Sánchez-Gurmaches, J., Hung, C.M., Sparks, C.A., Tang, Y., Li, H. y Guertin, D.A. 2012. PTEN loss in the Myf5 lineage redistributes body fat and reveals subsets of white adipocytes that arise from Myf5 precursors, *Cell Metabolism*, 16: 348–362.

Sánchez-Gurmaches, J. y Guertin, D.A. 2014. Adipocyte lineages: Tracing back the origins of fat. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1842: 340-351.

Sarjeant, K. y Stephens, J.M. 2012. Adipogenesis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 4(a008417): 1-19.

Schäffler, A., Schölmerich, J. y Buechler, C. 2006. The role of ‘adipotropins’ and the clinical importance of a potential hypothalamic–pituitary–adipose axis. *Nature Clinical Practice Endocrinology and Metabolism*, 2(7): 374-383.

Schulz, T.J., Huang, P., Huang, T.L., Xue, R., McDougall, L.E., Townsend, K.L., Cypess, A.M., Mishina, Y., Gussoni, E. y Tseng, Y.H. 2013. Brown-fat paucity due to impaired BMP signalling induces compensatory browning of white fat. *Nature*, 495: 379–383.

Seale, P., Bjork, B., Yang, W., Kajimura, S., Chin, S. Kuang, S., Scime, A., Devarakonda, S., Conroe, H.M., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Rudnicki, M.A., Beier, D.R. y Spiegelman, B.M. 2008. PRDM16 controls a brown fat/skeletal muscle switch. *Nature*, 454: 961–967.

Seale, P., Conroe, H.M., Estall, J., Kajimura, S., Frontini, A. 2011. Prdm16 determines the thermogenic program of subcutaneous white tissue in mice. *Journal Clinical of Investigation*, 121(1): 96-105.

Seale, P. 2015. Transcriptional regulatory circuits controlling brown fat development and activation. *Diabetes*, : 1-7.

Sharp, L.Z., Shinoda, K., Ohno, H., Scheel, D.W., Tomoda, E., Ruiz, L., Hu, H., Wang, L., Pavlova, Z., Gilsanz, V., Shingo, K. 2012. Human BAT possesses molecular signatures that resemble beige/brite cells. *PLoS One*, 7(11): 1-10.

Sierbaek, R., Nielsen, R. y Mandrup, S. 2010. PPAR $\gamma$  in adipocyte differentiation and metabolism- Novel insights from genome-wide studies. *FEBS letters*, 584: 3242-3249.

Stout, M.B., Tchkonina, T., Pirtskhalava, T., Palmer, A.K., List, E.O., Berryman, D.E., Lubbers, E.R., Escande, C., Spong, A., Masternak, M.M., Oberg, A.L., LeBrasseur, N.K., Miller, R.A., Kopchick, J.J., Bartke, A. y Kirkland, J.L. 2014. Growth hormone action predicts age-related white adipose tissue dysfunction and senescent cell burden in mice. *Aging*, 6(7): 575-586.

Veldhuis, J.D. y Bowers C.Y. 2010. Integrating GHS into the Ghrelin System. *International Journal of Peptides*, 879573: 1-118.

Villarroya, J., Cereijo, R. y Villarroya, F. 2013. An endocrine role for brown adipose tissue?. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, 305(5): E567-E572.

Walden, T.B, Hansen, I.R., Timmons, J.A., Cannon, B. y Nedergaard, J. 2012. Recruited vs. nonrecruited molecular signatures of brown, "brite", and white adipose tissues. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism* , 302: E19–E31.

Wu, J., Bostrom, P., Sparks, .LM., Ye, L., Choi, J.H., Giang, A.H., Khandekar, M., Virtanen, K.A., Nuutila, P., Schaart, G., Huang, K., Tu, H., Van Marken Lichtenbelt, W.D., Hoeks, J., Enerbäck, S., Schrauwen, P. y Spiegelman, B.M. 2012. Beige adipocytes are a distinct type of thermogenic fat cell in mouse and human. *Cell*, 150: 366–376.

Xue, R., Wan, Y., Zhang, S., Zhang, Q., Ye, H. y Li, Y. 2014. Role of bone morphogenetic protein 4 in the differentiation of brown fat-like adipocytes. *American Journal of Endocrinology and Metabolism*, 306(4): E363-E372.

Yahata, T., Shao, W., Endoh, H., Hur, J., Coser, K., Sun, Y., Ueda, Y., Kato, S., Isselbacher, K., Brown, M. y Shioda, T. 2001. Selective coactivation of estrogen-dependent transcription by CITED CBP/p300-binding protein. *Genes and Development*, 15(19): 2598-2612.

Yanovski, S.Z. y Yanovski, J.A. 2014. Long-term Drug Treatment for Obesity: A Systematic and Clinical Review. *The Journal of the American Medical Association*, 311 (1): 74-88.

Young, P., Arch, J.R. y Ashwell, M. 1984. Brown adipose tissue in the parametrial fat pad of the mouse. *Federation of European Biochemical Societies*, 167(1):10–14.

## ANEXO I

### VI.3.1' Determinación de la expresión génica de marcadores de adipocitos blancos Y beige mediante PCR punto final

El ARN total se extrajo de células en cultivo primario mediante el método de trizol. La contaminación con ADN se eliminó con 50 unidades DNAsa por cada 100 µg de RNA. Se realizó la síntesis de cDNA mediante el kit de síntesis de ThermoFisher de acuerdo a las especificaciones del proveedor (RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit). El ensayo de PCR punto final se llevó a cabo bajo condiciones estándar con el ajuste en la temperatura de amplificación para cada gen. Como control interno se utilizó  $\beta$ -actina.

Cuadro 4. Oligonucleótidos de los genes marcadores de adipocitos blancos y beige

Oligos	5' Oligo	3' Oligo
<i>CITED1</i>	5'-CGCTTCGTCCGTACCTCAGCT-3'	5'-CAGCTGGGCCTGTTGGTCTC-3'
<i>TCF21</i>	5'-ACTGCCACACCTCCAGTCATT-3'	5'-CTTTGCCTCACTCAGGATTGG-3'

### VI.3.2' Determinación de la expresión proteica mediante Western Blot

La determinación de proteína se llevó a cabo como describen anteriormente López y col., 2015. Las células fueron lavadas tres veces con PBS 1X. La extracción de proteína total se llevó a cabo usando buffer de lisis celular (50 mM Tris, pH 7.6, 150 mM NaCl, e inhibidores de proteasas de la marca Roche) adicionado justo antes de usarse. La extracción de las proteínas se llevó a cabo mediante agitación continua durante 1 hora a 4 °C. Posteriormente el lisado se

centrifugó por 15 minutos a 3000 rpm y 4 °C, se recuperó el sobrenadante. Después se centrifugó nuevamente el sobrenadante por 15 minutos a 12000 rpm y 4°C. Se recuperó el sobrenadante (proteínas) y se guardaron a -70 °C. Se llevó a cabo la cuantificación de proteína mediante el método de Bradford.

Los extractos citosólicos fueron separados mediante SDS-PAGE. Se realizaron los cálculos correspondientes para cargar en cada pozo la misma cantidad de proteína. Se mezclaron en relación 1:1 con el amortiguador de carga (H<sub>2</sub>O destilada, Tris-HCl 0.125 M, glicerol 20%, SDS 4%, Azul de bromofenol 0.02%, 2-mercaptoetanol 200 mM). Las muestras se calentaron por 5 min a 99 °C previo a ser separadas mediante la electroforesis para la cual se prepararon los geles de poliacrilamida donde se corrió. Después las muestras fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa (Amersham Biosciences). Para realizarla se humedecieron previamente los materiales en el amortiguador de transferencia (3.03 g Tris-base, 14.4 g glicina; 200 mL metanol; H<sub>2</sub>O destilada a 1 L) siguiendo el siguiente orden: Cátodo (lado claro), esponja, papel filtro Whatman, gel, membrana, papel filtro Whatman, esponja, ánodo (lado oscuro). Se transfirieron durante 1 hora a 200 mA (López y col., 2015).

Después de la transferencia, las membranas se lavaron durante 10 minutos en PBS 1X por tres ocasiones, para eliminar restos de poliacrilamida y se bloquearon con leche baja en grasa por 1 hora, para evitar la unión inespecífica a la superficie la membrana de los anticuerpos. Se lavaron tres veces en PBS 1X y se incubaron toda la noche a una temperatura ambiente y agitación constante con los anticuerpos primarios diluidos en leche baja en grasa al 1%, con anti-Tcf21 a la concentración de 1:500 (Abcam, ab32981). Se lavaron de las membranas en PBS 1X y se incubaron con un anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa de rabano (HRP) durante 2 horas a temperatura ambiente con agitación constante. Posteriormente se lavaron las membranas tres veces en PBS 1X y por último se visualizaron las bandas de proteína. Para control proteico se utilizó actina (López y col., 2015).

La detección se realizó a través del ensayo de quimioluminiscencia potenciada (ECL, Enhanced Chemiluminescence Kit). La membrana se colocó durante 1 minuto en el reactivo de detección (1:1 luminol y peróxido de hidrógeno) del kit ECL. Como resultado se obtuvo una oxidación catalizada por peroxidasa, que resultó en quimioluminiscencia del luminol. La luz obtenida fue detectada en la película de autoradiografía (López y col., 2015).

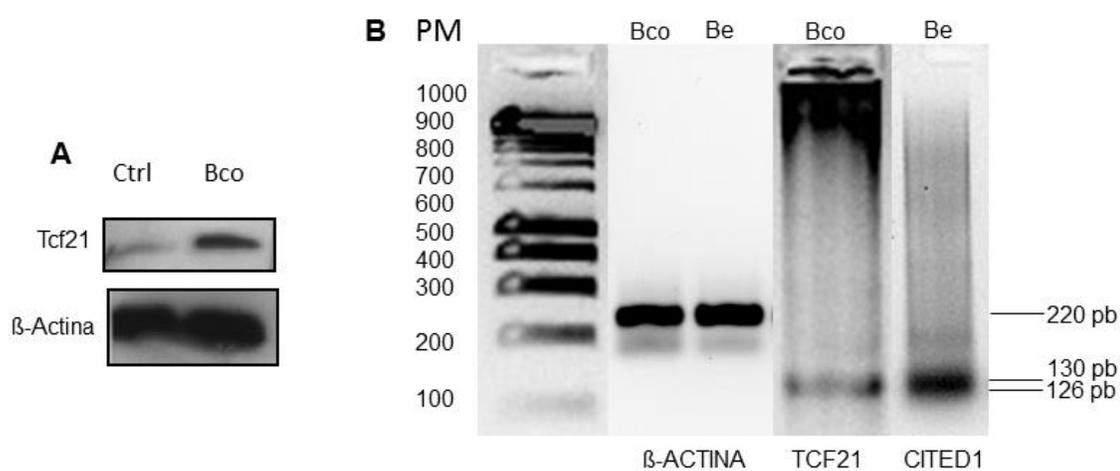


Figura 21. Expresión de marcadores específicos en los grupos de adipocitos diferenciados a blanco y beige. La figura A muestra la expresión de la proteína Tcf21 mediante western blot en el grupo de adipocitos blancos comparado contra el grupo control. En la figura B se muestra la expresión de los genes específicos para adipocito blanco (TCF21 con 126 pb) y adipocito beige (CITED1 con 130 pb) mediante PCR punto final.