



EFFECTO DE LA DIETA ALTA EN GRASA SOBRE LA EXPRESIÓN
GÉNICA DEPÓSITO GRASO-ESPECÍFICA DURANTE LA DIFE-
RENCIACIÓN IN VITRO DE PREADIPOCITOS MURINOS

TESIS INDIVIDUAL

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de

Licenciada en Nutrición

Presenta

Lucía Martínez de la Escalera Clapp

Dirigido por:

Yazmín Macotela Guzmán

SINODALES

Dra. Yazmín Macotela Guzmán
Presidente

Firma

Dra. Teresa García Gasca
Secretario

Firma

Dra. Isabel Cristina Méndez Hernández
Vocal

Firma

M. en C. Rocío Arellano Jiménez
Suplente

Firma

Facultad de Ciencias Naturales

Querétaro, Qro.

Mayo 2013

México

La presente obra está bajo la licencia:
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/deed.es>



CC BY-NC-ND 4.0 DEED

Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0 Internacional

Usted es libre de:

Compartir — copiar y redistribuir el material en cualquier medio o formato

La licenciante no puede revocar estas libertades en tanto usted siga los términos de la licencia

Bajo los siguientes términos:



Atribución — Usted debe dar [crédito de manera adecuada](#), brindar un enlace a la licencia, e [indicar si se han realizado cambios](#). Puede hacerlo en cualquier forma razonable, pero no de forma tal que sugiera que usted o su uso tienen el apoyo de la licenciante.



NoComercial — Usted no puede hacer uso del material con [propósitos comerciales](#).



SinDerivadas — Si [remezcla, transforma o crea a partir](#) del material, no podrá distribuir el material modificado.

No hay restricciones adicionales — No puede aplicar términos legales ni [medidas tecnológicas](#) que restrinjan legalmente a otras a hacer cualquier uso permitido por la licencia.

Avisos:

No tiene que cumplir con la licencia para elementos del material en el dominio público o cuando su uso esté permitido por una [excepción o limitación](#) aplicable.

No se dan garantías. La licencia podría no darle todos los permisos que necesita para el uso que tenga previsto. Por ejemplo, otros derechos como [publicidad, privacidad, o derechos morales](#) pueden limitar la forma en que utilice el material.

Resumen

El síndrome metabólico se asocia con la disfunción del tejido adiposo durante la obesidad que resulta en la inhibición de la capacidad de células precursoras de adipocitos (CPAs) de diferenciarse a adipocitos que manejen de manera funcional el exceso de grasa. Las CPAs viscerales tienen mayores requerimientos para la diferenciación *in vitro* que las subcutáneas y ésta característica se ha relacionado con el hecho de que el exceso de grasa visceral pero no subcutánea, se correlaciona estrechamente con enfermedades metabólicas. Todos los tipos de tejido adiposo son intrínsecamente distintos por lo que el estudio de sus características podría generar nuevo conocimiento en la fisiopatología y tratamiento de la obesidad y sus co-morbilidades. En el presente trabajo se compararon nueve genes con expresión diferencial en CPAs viscerales y subcutáneas obtenidas de ratones macho alimentados por 8 semanas con dieta alta en grasa (DAG) o dieta control (DC) y sometidas a un protocolo de diferenciación *in vitro*. La separación de CPAs se realizó mediante anticuerpos acoplados a partículas magnéticas (tecnología MACS). Dos días antes de alcanzar el 100% de confluencia (día -2) las células se trataron con el factor de compromiso de preadipocitos, la proteína morfogenética de hueso 4 (BMP4); al día 0 con un coctel de diferenciación (IBMX, dexametasona, insulina y rosiglitazona) y al día 3 únicamente con insulina. Se colectaron las células todos los días de tratamiento o cambio de medio (días -2, 0, 3, 5 y 7). El análisis de expresión génica se realizó mediante qRT-PCR. De los nueve genes analizados, cuatro (haptoglobina, angiotensinógeno, caderina-9 y factor de crecimiento vascular endotelial c) mostraron un incremento marcado en su expresión la cual fue diferencialmente afectada por la DAG en asociación con el depósito de origen. En CPAs subcutáneas, la DAG atenuó el incremento de haptoglobina y angiotensinógeno observado con DC, pero aumentó la expresión de factor de crecimiento vascular endotelial c. La DAG no causó un cambio aparente en la expresión de agt en CPAs viscerales, pero sí atenuó el incremento de haptoglobina y factor de crecimiento vascular endotelial c. Finalmente, en CPAs tanto viscerales como subcutáneas, la DAG aumentó la expresión de caderina-9 al día -2, bloqueando el incremento esperado al final de la diferenciación. Los cambios inducidos por la DAG sobre la expresión génica (que podrían tener una función compensatoria) fueron más marcados en CPAs subcutáneas, sugiriendo que las viscerales exhiben menor capacidad adaptativa ante el estrés de la DAG.

Palabras clave: Adipocitos, dieta alta en grasa, expresión génica

Summary

The metabolic syndrome is associated with hypertrophic obesity and an inability of adipocyte precursor cells (APCs) to differentiate into new adipocytes capable of adequately managing the excess fat. Visceral APCs have higher requirements for differentiation *in vitro* than those from subcutaneous depots, and excess visceral but not subcutaneous fat is strongly associated with metabolic disease. All adipose tissue depots are intrinsically different, and understanding their characteristics may help explain the varying risk they pose. Thus, we compared nine preferentially expressed genes between visceral and subcutaneous APCs from mice fed a high-fat (HFD) or control-chow diet (CD) before and after induction of *in vitro* differentiation. APCs were isolated from male mice after 8 weeks on either diet using MACS separation technology. Two days before 100% confluence (day -2), cells were incubated with APC commitment factor bone morphogenetic protein 4 (BMP4); on day 0 they were treated with differentiation cocktail (IBMX, dexamethasone, insulin and rosiglitazone) and on day 3 with insulin alone. Cells were collected on each day of treatment or media change (days -2, 0, 3, 5, 7 and 9). Gene expression was analyzed using qRT-PCR. Of the ten genes analyzed, four [haptoglobin (hp), angiotensinogen (agt), cadherin-9 (cdh-9) and vascular endothelial growth factor-c (vegfc)] showed a marked rise in expression upon differentiation that was differentially affected by the HFD in association with their depot origin. In subcutaneous APCs, the HFD attenuated the rise of hp and agt observed with a CD but up-regulated vegfc. The HFD caused no apparent change in expression of agt in APCs from the visceral depot, but it attenuated the rise of hp and vegfc. Finally, in APCs from both depots, the HFD enhanced the expression of cdh-9 on day -2, blunting its up-regulation at the end of the differentiation protocol. The changes on gene expression induced by a HFD (which could serve as compensatory mechanisms) were more apparent in APCs from the subcutaneous depot, suggesting that under stress of the HFD visceral APCs have a worse adaptive capacity.

Key Words: Adipocytes, High-fat diet, gene expression.

Dedicatoria

A mi familia, que con su amor, apoyo y franqueza me llenan de felicidad todos los días del año.

Agradecimientos

A Xarubet Ruiz Herrera, por enseñarme con gran paciencia y desde cero los métodos, a Daniel Mondragón, Antonio Prado y Fernando López por su apoyo técnico y a mis sinodales Yazmín Macotella Guzmán, Isabel Méndez Hernández, Teresa García Gasca y Rocío Arellano Jiménez por la inspiración, consejos, apoyo y motivación.

Í N D I C E D E C O N T E N I D O

Resumen	i
Summary	ii
Dedicatoria	iii
Agradecimientos	iii
Índice de Contenido	iv
Índice de Tablas	vii
Índice de Figuras	viii
Lista de Abreviaciones	x
1.Introducción	1
2.Revisión de Literatura	2
El tejido adiposo y su clasificación	2
Fisiopatología de la disfunción adiposa	4
1.Los ácidos grasos libres y la disfunción metabólica	5
2.La adipogénesis	5
3.La teoría de la expansión adiposa deficiente	6
4.Otros factores relacionados con el desarrollo de enfermedades metabólicas	7
Diferencias genéticas intrínsecas entre tejidos adiposos	7
3.Justificación	9
4.Hipótesis y Objetivos	10
Hipótesis	10
Objetivo General	10
Objetivos Específicos	10
5.Metodología	11
Ratones	11
Extracción y Aislado de Preadipocitos	11
Sembrado y crecimiento de células	11

Protocolo de diferenciación	12
Extracción de ARN, síntesis de cDNA y PCR en tiempo real	13
Estadística	13
6.Resultados	14
1. Caracterización y validación del modelo de obesidad inducido por dieta alta en grasa	14
2. Caracterización de CPAs subcutáneas y viscerales en ambas dietas	15
1.Diferenciación por medio de la acumulación lipídica celular	15
2.Expresión génica antes y después del protocolo de diferenciación	17
3. Caracterización de CPAs por el tejido de origen	18
1.Valoración de la diferenciación entre tejidos por medio de la expresión del gen ppar γ	18
2.Diferencias en la expresión génica entre CPAs subcutáneas y viscerales	23
3. Caracterización de diferencias entre CPAs por efecto de la dieta	30
1.Valoración de la diferenciación entre dietas por medio de la expresión del gen ppar γ	30
2.Diferencias entre CPAs respecto a la expresión génica por efecto de la dieta	31
3.Discusión	39
Diferencias en la morfología y capacidad adipogénica por efecto del tejido de origen y la dieta	39
Diferencias en la expresión de genes diferenciales entre tejidos por efecto de la dieta	40
<i>Haptoglobina</i>	40
<i>Angiotensinógeno</i>	40
<i>Fibronectina 5 con dominio tipo III</i>	41
<i>LIM homeobox 8</i>	41
<i>Metaloproteasa de matriz 3</i>	42
<i>Proteína relacionada a dikkopf 2</i>	42
<i>Factor de transcripción 21</i>	42
<i>Caderina 9</i>	43

Factor de crecimiento endotelial vascular c

43

4.Literatura Citada

45

Í N D I C E D E T A B L A S

TABLA	TÍTULO	PÁGINA
<u>Tabla 5.1</u>	Formulación de medios utilizados para el protocolo de diferenciación	11
<u>Tabla 5.2</u>	Lista de oligonucleótidos utilizados para qRT-PCR	12

Í N D I C E D E F I G U R A S

FIGURA	TÍTULO	PÁGINA
<u>Figura 2.1</u>	Origen del tejido adiposo	4
<u>Figura 2.2</u>	Cascada de señalización de la adipogénesis	6
<u>Figura 5.1</u>	Esquema del protocolo de diferenciación	11
<u>Figura 6.1.1</u>	Caracterización y validación del modelo experimental	13
<u>Figura 6.2.1</u>	Visualización de CPAs subcutáneas de ratones alimentados con DC (Sc DC)	14
<u>Figura 6.2.2</u>	Visualización de CPAs subcutáneas de ratones alimentados con DAG (Sc DAG)	15
<u>Figura 6.2.3</u>	Visualización de CPAs viscerales de ratones alimentados con DC (Vis DC)	15
<u>Figura 6.2.4</u>	Visualización de CPAs viscerales de ratones alimentados con DAG (Vis DAG)	16
<u>Figura 6.2.5</u>	Efecto de la diferenciación sobre la expresión génica	18
<u>Figura 6.3.1</u>	Diferencias en la expresión génica de ppary entre CPAs subcutáneas y viscerales	19
<u>Figura 6.3.2</u>	Diferencias en la expresión génica de hp entre CPAs subcutáneas y viscerales	20
<u>Figura 6.3.3</u>	Diferencias en la expresión génica de agt entre CPAs subcutáneas y viscerales	21
<u>Figura 6.3.4</u>	Diferencias en la expresión génica de fndc5 entre CPAs subcutáneas y viscerales	23
<u>Figura 6.3.5</u>	Diferencias en la expresión génica de lhx8 entre CPAs subcutáneas y viscerales	24
<u>Figura 6.3.6</u>	Diferencias en la expresión génica de mmp3 entre CPAs subcutáneas y viscerales	25
<u>Figura 6.3.7</u>	Diferencias en la expresión génica de dkk2 entre CPAs subcutáneas y viscerales	26
<u>Figura 6.3.8</u>	Diferencias en la expresión génica de tcf21 entre CPAs subcutáneas y viscerales	26
<u>Figura 6.3.9</u>	Diferencias en la expresión génica de cdh9 entre CPAs subcutáneas y viscerales	27
<u>Figura 6.3.10</u>	Diferencias en la expresión génica de vegfc entre CPAs subcutáneas y viscerales	28
<u>Figura 6.4.1</u>	Efecto de la dieta sobre la expresión de ppary	30
<u>Figura 6.4.2</u>	Efecto de la dieta sobre la expresión de hp	31
<u>Figura 6.4.3</u>	Efecto de la dieta sobre la expresión de agt	32

FIGURA	TÍTULO	PÁGINA
<u>Figura 6.4.4</u>	Efecto de la dieta sobre la expresión de fndc5	33
<u>Figura 6.4.5</u>	Efecto de la dieta sobre la expresión de lhx8	33
<u>Figura 6.4.6</u>	Efecto de la dieta sobre la expresión de mmp3	34
<u>Figura 6.4.7</u>	Efecto de la dieta sobre la expresión de dkk2	35
<u>Figura 6.4.8</u>	Efecto de la dieta sobre la expresión de tcf21	35
<u>Figura 6.4.9</u>	Efecto de la dieta sobre la expresión de cdh9	36
<u>Figura 6.4.10</u>	Efecto de la dieta sobre la expresión de vegfc	37

L I S T A D E A B R E V I A C I O N E S

- ➔ **ASB:** Albúmina de suero bovino
- ➔ **AGL:** Ácidos grasos libres
- ➔ **Agt:** Angiotensinógeno
- ➔ **BMP4:** Proteína morfogenética de hueso 4
- ➔ **Cdh9:** Caderina 9
- ➔ **C/EBP:** Proteínas de unión estimulante a CCAAT
- ➔ **CMM:** Células Madre Mesenquimales
- ➔ **CPAs:** Células Precursoras de Preadipocitos
- ➔ **DAG:** Dieta alta en grasa
- ➔ **DC:** Dieta control
- ➔ **Dkk2:** Proteína relacionada a dickkopf 2
- ➔ **Fndc5:** Fibronectina 5 con dominio tipo III
- ➔ **GLUT4:** Transportador de glucosa 4
- ➔ **Hp:** Haptoglobina
- ➔ **ICC:** Índice de cintura-cadera
- ➔ **IL-6:** Interleucina-6
- ➔ **IMC:** Índice de masa corporal
- ➔ **Lhx8:** LIM homeobox 8
- ➔ **Mmp3:** Metaloproteasa de matriz 3
- ➔ **Ppar γ :** Receptor activado por proliferadores de peroxisoma gamma
- ➔ **Sc DAG:** CPAs subcutáneas provenientes de ratones alimentados con dieta alta en grasa
- ➔ **Sc DC:** CPAs subcutáneas provenientes de ratones alimentados con dieta control
- ➔ **SFB:** Suero fetal bovino
- ➔ **TAB:** Tejido adiposo blanco
- ➔ **TAC:** Tejido adiposo café
- ➔ **Tbp:** Proteína de unión a la secuencia TATA
- ➔ **Tcf21:** Factor de transcripción 21
- ➔ **TSc:** Tejido adiposo subcutáneo
- ➔ **TVis:** Tejido adiposo visceral
- ➔ **TNF- α :** Factor de necrosis tumoral alfa
- ➔ **UCP-1:** Proteína desacoplante 1
- ➔ **Vis DAG:** CPAs viscerales provenientes de ratones alimentados con dieta alta en grasa
- ➔ **Vis DC:** CPAs viscerales provenientes de ratones alimentados con dieta control
- ➔ **Vegfc:** Factor de crecimiento endotelial vascular

1.

Introducción

El sobrepeso y la obesidad son enfermedades que se caracterizan por un exceso de tejido adiposo y actualmente afectan alrededor del 70% de la población adulta, el 40% de la población infantil y un tercio de la población adolescente de México (ENSANUT, 2012). La organización mundial de la salud define que una persona se encuentra en sobrepeso cuando presenta un índice de masa corporal (IMC) igual o mayor a 25 kg/m² y menor a 30 kg/m² y obesa cuando su IMC es mayor o igual a 30 kg/m² (OMS, 2012). Esta acumulación se asocia con el desarrollo de enfermedades metabólicas como la diabetes mellitus tipo 2, hipertensión arterial y dislipidemias además de con un incremento considerable en el riesgo de desarrollar enfermedades cardiovasculares y cáncer (Zeve *et al.*, 2009). Sin embargo, esta correlación existe entre la localización y no la cantidad total de la acumulación de grasa corporal, lo cual ha llevado a que se utilice el índice cintura-cadera (ICC) para identificar aquellos individuos en riesgo de desarrollar el síndrome metabólico. Estos datos sugieren que no toda la grasa corporal juega el mismo papel patológico. Los expertos en el campo incluso consideran cada depósito de grasa como un órgano distinto ya que poseen diferencias genéticas intrínsecas y en los últimos años, la investigación en obesidad y diabetes se ha enfocado hacia entender las características de cada tipo de tejido adiposo (Bays *et al.*, 2008). Una de las diferencias entre depósitos es la capacidad de expandirse (como en la obesidad) generando nuevos adipocitos a partir de células precursoras de adipocitos (CPAs) para almacenar el exceso de energía de manera funcional y evitar su depósito en otros órganos. Dado que la acumulación de grasa en órganos como el hígado, músculo y páncreas se considera una de las causas principales de la resistencia a la insulina y sus complicaciones, esta capacidad adipogénica determinará por lo menos en parte el potencial patológico de cada tejido. En el presente trabajo se estudió el efecto de un ambiente obesogénico sobre la expresión de genes diferenciales entre depósitos (subcutáneo vs. visceral) durante la diferenciación de CPAs *in vitro* con el fin de mejor entender el por qué del diferencial patológico entre tejidos.

2.

Revisión de Literatura

El tejido adiposo y su clasificación

El tejido adiposo se clasifica en dos tipos principales: el tejido adiposo blanco (TAB) y el tejido adiposo café (TAC) (Rosen and Spiegelman, 2006). Ambos provienen de células madre mesenquimales (CMM) sin embargo, los adipocitos café comparten un precursor en común con los miocitos, pero no con los adipocitos blancos (ver Figura 2.1). Por consecuencia, la morfología del TAC se asemeja a la del músculo esquelético (almacenando menos lípidos y contiene mayor cantidad de mitocondrias que el TAB) (Rosen and MacDougald, 2006). El TAC expresa genes específicos, como la proteína desacoplante 1 (UCP1) que le permite liberar energía en forma de calor sin generar ATP, de tal forma que una de las principales funciones biológicas del TAC es la regulación de la temperatura corporal. Estas características hacen más metabólicamente activo al TAC que el TAB y por estas razones su acumulación se considera benéfica. En los humanos el TAC se encuentra depositado en grandes cantidades durante la infancia (Rosen and MacDougald, 2006). Recientemente, se han identificado depósitos significativos de TAC en adultos que se extienden de la parte posterior del cuello hacia el tórax, aunque estos depósitos son mayores en mujeres que en hombres y están inversamente correlacionados con la edad y el IMC. En modelos animales, el TAC se incrementa por la exposición prolongada al frío (Cypess *et al.*, 2009). El TAB puede contener parches de adipocitos que expresan genes termogénicos del TAC (como UCP1) pero también genes específicos de TAB, como respuesta al ejercicio, catecolaminas y/o frío (Wu *et al.*, 2012). A este tejido con características de TAB y TAC se le conoce como tejido adiposo beige (Wu *et al.*, 2012).

Se sabe que el TAB inicia su desarrollo en etapas tardías de la gestación (Tang *et al.*, 2008) y crece rápidamente en respuesta al incremento en la disponibilidad de nutrientes durante la lactancia (Kirtland and Harris, 1980). Este crecimiento continúa en la pubertad pero disminuye significativamente durante la adultez (Hirsch and Han, 1969), en la cual hay un recambio aproximado del 10% del tejido adiposo por año (Spalding *et al.*, 2008). De acuerdo a su localización, el TAB se divide de forma general en dos tipos: el tejido adiposo visceral (TVis) y el subcutáneo (TSc). El TSc constituye aproximadamente el 80% del tejido adiposo total en humanos con IMC normal e incluye los depósitos de grasa troncales, gluteofemorales, mamarios, e inguinales. El TVis incluye los depósitos de grasa intraperitoneal (omental, mesentérica y umbilical), la extraperitoneal (peripancreática y perirenal), la intrapélvica (gonadal, epididimal, y urogenital) y periorgánica (pericardial, perimuscular, perivascular, orbital y paraósea) y constituye el 20% del tejido adiposo total (Bays *et al.*, 2008). La acumulación de tejido adiposo es

mayor en mujeres que en hombres (hasta un 30% de adiposidad total comparado con un 15 a 20% en hombres). En hombres la mayor parte de la acumulación de tejido adiposo se da en forma de TVis, y en mujeres se da en forma de TSc (Lemieux *et al.*, 1993). La localización del exceso de tejido adiposo es de suma importancia durante la obesidad ya que el exceso de TVis está correlacionado con el desarrollo de enfermedades metabólicas, mientras que el TSc se ha encontrado sin riesgo e incluso con una disminución en riesgo de dichas enfermedades (Rosen and Spiegelman, 2006).

La razón de que la acumulación de TVis se asocie a riesgos mayores de desarrollar enfermedades metabólicas podría deberse a que sus moléculas secretadas drenan directamente a la circulación portal (que proporciona el 80% de sangre al hígado), sin embargo el TSc proporciona el 85% de los ácidos grasos libres a la circulación (molécula que está estrechamente correlacionada con la resistencia a la insulina) (Lebovitz and Banerji, 2005). Como el papel de cada tejido en la fisiopatología del síndrome metabólico permanece controversial, los estudios se han enfocado principalmente a la posibilidad de que estas diferencias en riesgos se debiera a diferencias intrínsecas entre los tejidos a nivel genético (Tchkonia *et al.*, 2007) más que a su localización en el organismo. En realidad, a pesar de sus similitudes histológicas, se cree que el TVis y el TSc desarrollan distintas funciones metabólicas y pueden ser considerados órganos diferentes (Ibrahim, 2010).

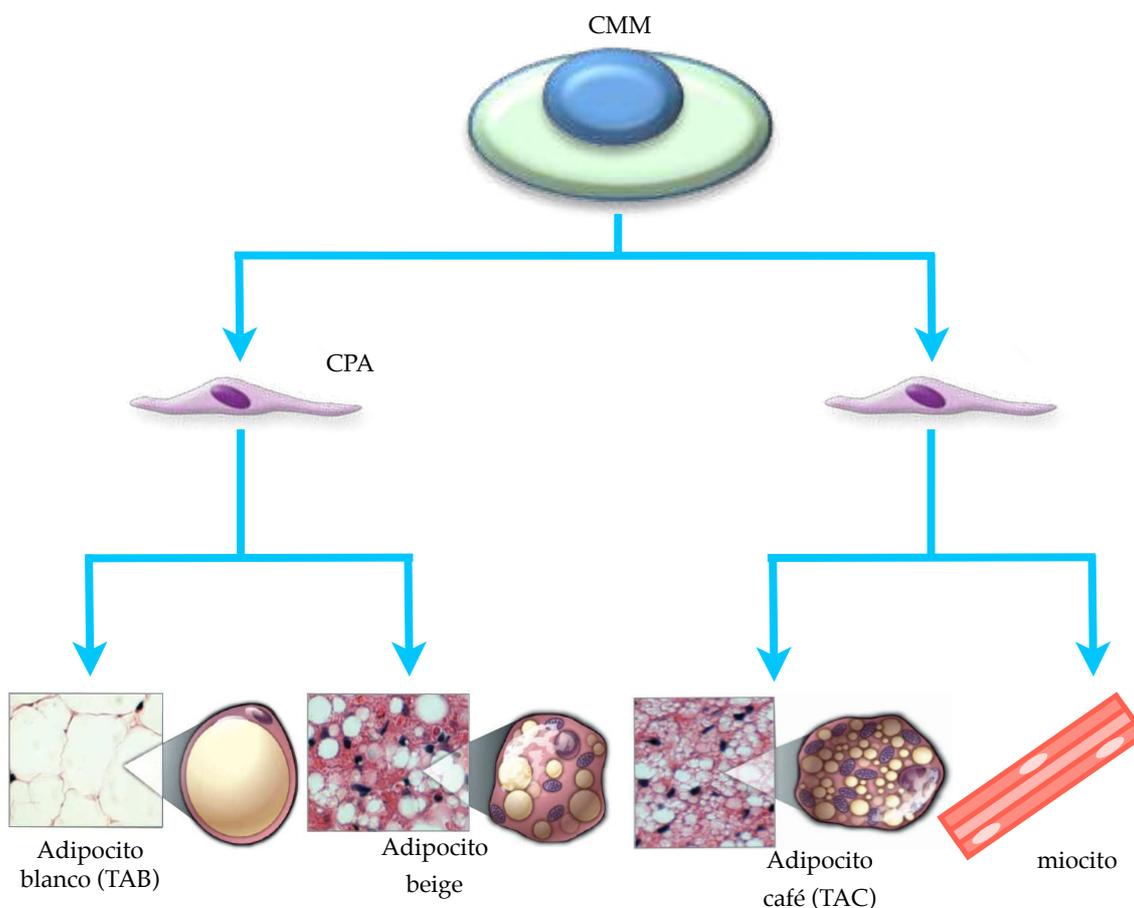


Figura 2.1. Origen del tejido adiposo. Linaje de tejido adiposo. Los adipocitos blancos, cafés y beige provienen de CMM. Sin embargo, los adipocitos cafés tiene características estructurales más parecidas a las de los miocitos. El adipocito beige expresa genes de TAB y TAC por efecto de la estimulación con catecolaminas y/o exposición al frío. CMM: Célula madre mesenquimal; CPA: Célula precursora de adipocito; TAB: Tejido adiposo blanco; TAC: Tejido adiposo café. Adaptado de (Algire *et al.*, 2012).

Fisiopatología de la disfunción adiposa

Aunque hace algunos años la función del tejido adiposo se pensaba poco más que la de un simple depósito energético, ahora se sabe que es un importante y activo órgano endócrino involucrado en procesos metabólicos como angiogénesis, adipogénesis, lipogénesis, metabolismo (de glucosa, lípidos y esteroides), producción enzimática y hormonal, regulación del apetito y de la respuesta inmune, por lo anterior, su disfunción puede resultar en procesos anormales en estas y muchas otras áreas que contribuyen al desarrollo de enfermedades metabólicas (Bays, 2005).

En condiciones de balance energético positivo crónico, el tejido adiposo se encuentra bajo la presión de crecer continuamente para almacenar el exceso de energía en forma de grasa. Puesto que los adipocitos son post-mitóticos, el tejido adiposo tiene dos opciones: aumentar el número de adipocitos a partir de CPAs mediante el proceso de

adipogénesis (hiperplasia), o aumentar de tamaño los adipocitos existentes (hipertrofia). El tejido adiposo hipertrófico, presenta un aumento en la producción de factores como interleucina-6 (IL-6), factor de necrosis tumoral -alfa (TNF- α), leptina, resistina y una disminución en el transportador de glucosa 4 (GLUT4), cambios que pueden empeorar la disfunción metabólica y generar aún mas hipertrofia. El tejido adiposo subcutáneo tiende a la hiperplasia, mientras que el visceral tiende a la hipertrofia (Bays *et al.*, 2008).

1. Los ácidos grasos libres y la disfunción metabólica

Aproximadamente el 80% del peso de un adipocito blanco son lípidos, y aproximadamente el 90% de los lípidos de un adipocito se almacenan como triglicéridos (Bays *et al.*, 2008). Una molécula de triglicérido está compuesto por tres ácidos grasos y una molécula de glicerol. Acoplados a la molécula de glicerol en forma de triglicéridos, los ácidos grasos se consideran relativamente inocuos ya que se encuentran estables y no interfieren con la señalización del adipocito ni generan inflamación. Sin embargo, los ácidos grasos libres (AGL), el mayor producto secretado por adipocitos (producidos a partir de triglicéridos), interfieren con la señalización del receptor de insulina. Altos niveles crónicos de AGL en sangre contribuyen a la adquisición o empeoramiento de resistencia a la insulina (Jensen, 2006) así como a la pérdida de producción de insulina en páncreas (Bays *et al.*, 2008). La resistencia a la insulina por sí misma aumenta la presión arterial pero también lo hace a través de disminuir la vasodilatación endotelial y contribuir a otras disfunciones microvasculares (de Jongh *et al.*, 2004). Por último, los AGL contribuyen a la dislipidemia típica del síndrome metabólico, que se caracteriza por altos niveles de triglicéridos, bajos niveles de colesterol proveniente de lipoproteínas de alta densidad y altos niveles de colesterol proveniente de lipoproteínas de baja densidad en sangre (Bays, 2005).

2. La adipogénesis

La adipogénesis es el proceso mediante el cual las CPAs se diferencian en adipocitos maduros y consta de dos etapas: compromiso de CMM hacia preadipocitos y diferenciación terminal de preadipocitos a adipocitos maduros (Cristancho and Lazar, 2011). Este proceso (Figura 2.2) se regula mediante cascadas de transcripción complejas en las cuales participan numerosas enzimas, coenzimas, cofactores, receptores y otras proteínas. El receptor activado por proliferadores de peroxisomas gamma (PPAR γ) es uno de los factores de transcripción principales cuya función es tanto indispensable como suficiente para la diferenciación de CPAs (Rosen and MacDougald, 2006). Su expresión está regulada a su vez por numerosos factores antiadipogénicos (KLF2, C/EBP γ , etc...) y

proadipogénicos (KLF5, KLF15, C/EBP β , C/EBP δ , etc...). El ligando responsable de la activación de PPAR γ aun no ha sido identificado (Rosen *et al.*, 2000).

Las proteínas de unión estimulante a secuencias CCAAT (C/EBP) presentes en las regiones promotoras de varios genes también están íntimamente involucradas en la adipogénesis. La C/EBP α está regulada por las C/EBP β y C/EBP δ y a su vez es responsable de activar a PPAR γ (MacDougald and Mandrup, 2002). Ambos genes de diferenciación terminal (c/ebp α y ppar γ) pueden ser regulados por factores extra-celulares. Entre los más importantes y conocidos de estos factores está la insulina, que promueve la diferenciación y el TGF β factor inflamatorio que la inhibe (Rosen and MacDougald, 2006). La adiponectina, la leptina y la sintasa de ácidos grasos (producidos solo por adipocitos maduros) son otros factores que influyen la adipogénesis (Bays *et al.*, 2008).

Gran parte del conocimiento de los mecanismos de la adipogénesis surgió de estudios con la línea celular 3T3-L1. Estas son células inmortalizadas provenientes de fibroblastos embrionarios que pueden ser diferenciadas a adipocitos bajo las condiciones de cultivo adecuadas. Aunque este modelo se utiliza mucho por su accesibilidad, la expresión génica, perfil secretor y requerimientos adipogénicos de estas células es distinto al de CPAs primarias (Gesta *et al.*, 2006) por lo cual es relevante realizar estos estudios con CPAs.

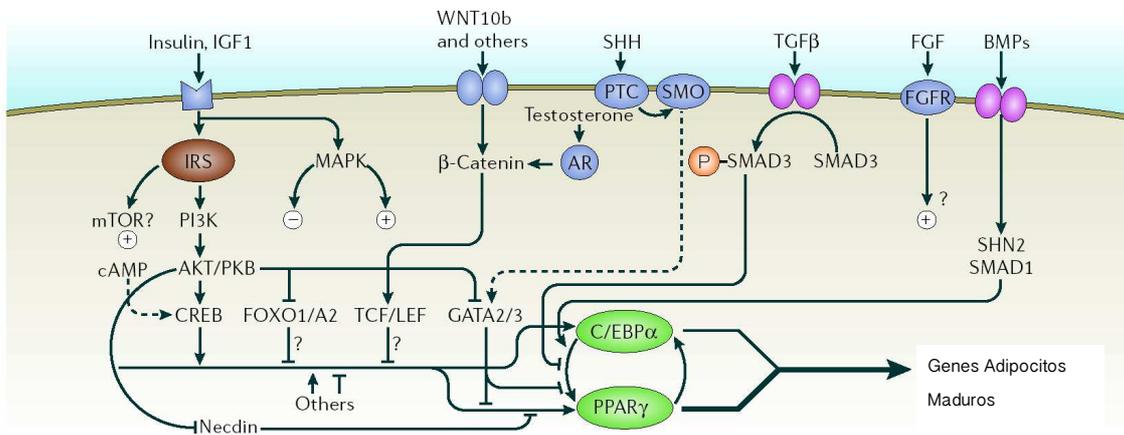


Figura 2.2. Cascada de señalización de la adipogénesis. En la cascada de señalización de la adipogénesis participan muchos factores, principalmente C/EBP α y PPAR γ los cuales forman un ciclo de regulación positiva para activar los genes de diferenciación terminal (Rosen and MacDougald, 2006).

3. La teoría de la expansión adiposa deficiente

Una de las mayores diferencias entre el TSc y el TVis es la capacidad adipogénica. Mientras que el TSc genera hiperplasia con mayor facilidad, el TVis aumenta su alma-

cenamiento de lípidos por medio de la hipertrofia (Bays *et al.*, 2008). La capacidad del TSc de proliferar le da al tejido la capacidad de continuar almacenando lípidos sin sacrificar su funcionalidad. En contraste, el TVis al no tener la misma capacidad adipogénica alcanza su límite de almacenamiento antes que el TSc, genera hipertrofia, disfunciones e inflamación y el exceso de lípidos entrantes, al no almacenarse continúan en la circulación y se depositan en otros órganos contribuyendo a la disfunción metabólica (Weyer *et al.*, 2000).

El porcentaje de CPAs en el TVis es mayor que en el TSc sin embargo en CPAs subcutáneas, hay mayor expresión de genes pro-adipogénicos (*dkk*, *c/ebp α* , *ppar γ* , *stat5a* y *bmp*) y en CPAs viscerales de genes anti-adipogénicos (*tgf β* y *gata-2*) (Macotella *et al.*, 2012) lo cual podría en parte explicar la tendencia del TVis hacia la hipertrofia. Otra posibilidad es que las CMMs presentes en el TVis se encuentren menos diferenciadas hacia CPAs, dado que el tratamiento *in vitro* con proteínas morfogenéticas de hueso 2 y 4 (BMP2 y 4), conocidos factores de compromiso hacia CPAs, rescató la ausencia de diferenciación observada con el coctel de diferenciación clásico (Macotella *et al.*, 2012). Sin embargo, aun no se conoce qué factores determinan que una CPA se comporte como visceral o subcutánea.

4. Otros factores relacionados con el desarrollo de enfermedades metabólicas

Cabe mencionar que el potencial patológico del exceso de tejido adiposo también depende de factores ambientales y de la predisposición genética. Por ejemplo, los indios Pima habitan tanto en Estados Unidos de Norte América como en México y ambos presentan la misma predisposición genética a obesidad, insulinoresistencia y DMT2. Sin embargo, los indios Pima de EU, que presentan una prevalencia de obesidad significativamente mayor y sobrepeso comparados con los indios Pima Mexicanos, también presentan cinco veces más prevalencia de DMT2 (Schulz *et al.*, 2006). En otras palabras, la adiposidad excesiva puede ser el factor catalítico para una enfermedad metabólica pero no el único (Bays *et al.*, 2008). Factores adquiridos y ambientales tales como la hypercortisolemia (que ocurre durante el síndrome de Cushing's o utilización farmacéutica de corticosteroides) es un ejemplo entre muchos otros que pueden también afectar el desarrollo de enfermedades metabólicas relacionadas con el tejido adiposo .

Diferencias genéticas intrínsecas entre tejidos adiposos

Como se mencionó anteriormente, el TVis y el TSc poseen características intrínsecas distintas las cuales incluyen la secreción de adipocinas, sensibilidad a la insulina, metabolismo y tendencia a generar inflamación (Wajchenberg *et al.*, 2002) y estas diferen-

cias han sido correlacionadas con la expresión diferencial de genes en cada tipo de tejido (Cantile *et al.*, 2003; Gesta *et al.*, 2006; Tchoukalova *et al.*, 2010; Yamamoto *et al.*, 2010).

En un estudio reciente, un microarreglo elaborado en CPAs murinas arrojó una lista de genes con expresión preferencial en TVis o TSc (Macotela *et al.*, 2012). Con el fin de identificar genes responsables del fenotipo de cada tejido, en el presente trabajo se seleccionaron 9 de dicha lista para valorar su expresión diferencial entre tejidos durante la diferenciación y el efecto de un ambiente obesogénico generado por una dieta alta en grasa.

3.

Justificación

El mundo actual enfrenta una epidemia de sobrepeso, obesidad y enfermedades metabólicas sin precedentes (Zeve *et al.*, 2009). El tejido adiposo y su habilidad de diferenciación y proliferación están implicados íntimamente en el desarrollo, pronóstico, tratamiento y prevención de éstas enfermedades. El estudio de los factores que determinan la diferencia en el riesgo presentado por la acumulación del tejido visceral o el subcutáneo permitirán entender mejor qué factores y mecanismos participan en estos fenómenos, permitiendo un mayor avance hacia su manipulación benéfica con fines terapéuticos.

4. Hipótesis y Objetivos

Hipótesis

La capacidad de diferenciación de los preadipocitos se verá atenuada en condiciones de obesidad y la expresión de genes diferenciales entre adipocitos viscerales y subcutáneos se verá modificada por la DAG.

Objetivo General

Evaluar el efecto de una dieta alta en grasa sobre la expresión génica durante la diferenciación *in vitro* de preadipocitos subcutáneos y viscerales murinos.

Objetivos Específicos

- ◆ Implementar el modelo de obesidad en ratones inducido por una dieta alta en grasa
- ◆ Evaluar tolerancia a la glucosa e incremento de tejido adiposo
- ◆ Extraer y aislar preadipocitos murinos de los depósitos subcutáneo inguinal y visceral perigonadal y someterlos al procedimiento de diferenciación *in vitro*.
- ◆ Evaluar y comparar la diferenciación de CPAs provenientes de distintos depósitos grasos (TVis vs. TSc) en cuanto a:
 - * Acumulación lipídica
 - * Expresión del gen regulador de la adipogénesis, receptor activado por peroxisoma proliferador gamma (ppar γ).
 - * Genes preferencialmente expresados en preadipocitos subcutáneos (lhx8, cdh9, mmp3, dkk2)
 - * Genes preferencialmente expresados en preadipocitos viscerales (tcf21, agt, hp, vegfc, fndc5)
- ◆ Evaluar y comparar el efecto de la dieta alta en grasa en la expresión de:
 - * Acumulación lipídica
 - * Expresión del gen ppar γ .
 - * Genes preferencialmente expresados en preadipocitos subcutáneos (lhx8, cdh9, mmp3, dkk2)
 - * Genes preferencialmente expresados en preadipocitos viscerales (tcf21, agt, hp, vegfc, fndc5)

5.

Metodología

Ratones

Se obtuvieron 18 ratones de la cepa C57BL/6 (entre 3 y 4 semanas) del bioterio del Instituto de Neurobiología (INB), UNAM y se mantuvieron en un cuarto con ciclos de luz-obscuridad 12:12 a una temperatura constante. Se les dio una dieta control (DC) con 22% kcal provenientes de grasa o una dieta alta en grasa (DAG) con 60% kcal provenientes de grasa (OpenSource Diet D12492; Research Diets) por 8 semanas y agua ad libitum. El sacrificio de ratones se llevó a cabo por inhalación de CO₂ y todo el manejo y estudio de animales fue de acuerdo con el protocolo aprobado por el comité de bioética del INB.

Extracción y Aislado de Preadipocitos

Se extrajo el tejido adiposo perigonadal (visceral) e inguinal (subcutáneo), se cortó en pequeños pedazos con tijeras esterilizadas y se incubaron en una solución de colagenasa (1mg/mL) disuelta en medio DMEM LG con 1% albúmina de suero bovino (ASB) por 30 minutos a 37°C. Posteriormente, se filtró la solución a través de una malla de nylon de 200µm y se sometieron las muestras a una centrifugación de 1,300rpm. Los adipocitos maduros flotantes se aspiraron y se aplicó 1 mL de buffer de lisis a cada muestra para eliminar eritrocitos (ACK lysing buffer Cat. 10-548E, Life Technologies). De la fracción celular resultante aquellas células negativas para CD31 y CD45 (marcadores de células endoteliales y leucocitos) y positivas para CD34 y SCA1 (marcadores de células madre) se consideraron preadipocitos. La separación se llevó a cabo con el equipo Auto-MACS Pro y anticuerpos acoplados a partículas magnéticas (eBioscience).

Sembrado y crecimiento de células

Las células precursoras de adipocitos se sembraron en pozos de 3.8 cm² previamente tratados con matrigel (BD Biosciences) al 2.5% en medio F10 (Life Technologies) para aumentar su número. Cuando las células alcanzaron el 80% de confluencia se cambiaron a pozos de 0.75 cm² a una densidad de 40,000 células por pozo hasta alcanzar de nuevo el 80% de confluencia. Durante este periodo se utilizó el medio de crecimiento el cual se cambió cada 2 días. La formulación de medios de cultivo se muestran en la Tabla 5.1.

Tabla 5.1. Formulación de medios utilizados para el protocolo de diferenciación

Medio de Crecimiento	Medio de Mantenimiento	Coctel de diferenciación
Medio de Mantenimiento adicionado con: 8% suero fetal de bovino (SFB) 0.1mg/mL Normocina (InvitroGen) 10 ng/mL factor de crecimiento epidérmico (EGF) (InvitroGen) 10 ng/mL factor inhibidor de leucemia (LIF) (InvitroGen) 10 ng/mL Factor de crecimiento BB derivado de plaquetas (PDGF) (InvitroGen) 5 ng/mL factor básico de crecimiento de fibroblastos (bFGF) (InvitroGen)	60% DMEM LG (Invitrogen) 38% MCDB201 Media (Sigma, M6770) 2% suero fetal de bovino (SFB) 1% Penicilina/Streptomina Dexametasona 1nM (Sigma, D-4902) Ácido ascórbico 2 fosfato 0.1 mM (Sigma, A8960) Mix ITS 1x (Sigma, I3146) Ácido linoleico-Albúmina 1x (Sigma, L9530)	Medio de Mantenimiento 100 nmol/L insulina, 0.5 µmol/L isobutilmethylxantina (IBMX), 1 µmol/L dexametasona y 1 µmol/L rosiglitazona

Protocolo de diferenciación

Al alcanzar el 80% de confluencia, las células se trataron con BMP4 a 3.3nM por dos días para comprometerlas al linaje de adipocito, después se incubaron con el coctel de diferenciación por tres días y finalmente con insulina (100nM) por otros dos días. Posteriormente se cambió el medio de mantenimiento cada dos días hasta alcanzar 11 días desde que se inició el protocolo de diferenciación (Figura 5.1). Se colectaron muestras de células previo a cada tratamiento y se lisaron con el buffer RLT del kit de extracción de ARN RNeasy (Qiagen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las muestras celulares se procesaron por triplicado.

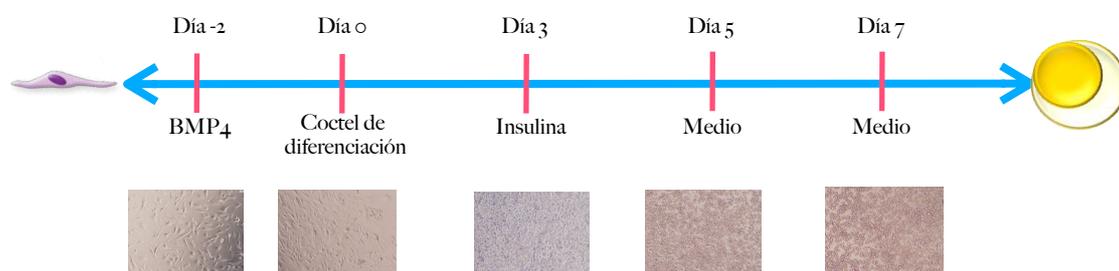


Figura 5.1. Esquema de protocolo de diferenciación. Se inició con células no diferenciadas y se finalizó con adipocitos maduros. La proteína morfogenética de hueso 4 (BMP4) se utilizó para comprometer a las células a un linaje de adipocitos, el coctel de diferenciación y la insulina estimulan el proceso de diferenciación. Se tomaron muestras con sus respectivas fotografías todos los días de tratamiento o cambio de medio (días -2, 0, 3, 5 y 7).

Extracción de ARN, síntesis de cDNA y PCR en tiempo real

Se utilizó el kit RNeasy (Qiagen) para la extracción de RNA de las células y el método utilizado fue de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Para la síntesis de cDNA se utilizó el kit “high capacity reverse transcription kit” (Applied Biosystems). Para PCR en tiempo real se utilizó Maxima SYBR Green (Fermentas) utilizando el equipo CFX96 Real-Time System (BIO RAD) bajo las siguientes condiciones para todos los genes:

- 1 ciclo: 95°C por 10 min
- 40 ciclos de 95°C por 10 s, 59°C por 20 s y 72°C por 30s

Se utilizó la expresión de la proteína de unión a la secuencia TATA (Tbp) como gen control para normalizar los datos de la expresión de genes amplificados con los oligonucleótidos de la Tabla 5.2.

Tabla 5.2. Lista de oligonucleótidos utilizados para qRT-PCR

Gen	Derecho	Reversa
Hp	GAGAGGTCCACGATGAGAGC	CTTCGGCCCTAGTCTGTAG
Agt	TATCCAAGTACCCAGTTCTT	AAGTGAACGTAGGTGTTGAAA
Fnde5	ATGAAGGAGATGCGGAGGAA	GCGGCAGAAAGAGAGCTATAACA
Lhx8	GAGCTCGGACCAGCTTCA	TTGTTGTCTCTGACCGAACTG
Mmp3	TGGAGATGCTCACTTTGACG	ATGGAAACGGGACAACTCTG
Dkk2	CCCGAGACTGAAAGAAAACG	CCCCATACATTTCTGCGAGT
Tcf21	CATTCACCCAGTCAACCTGA	TTCCTTCAGGTCATTCTCTGG
Cdh9	CTGATGCGGTCAGGATTCA	CTCCCCCTCCTAGAGAGGACTT
Vegfe	CGAGGTCAAGGCTTTTGAAG	TCCCCTGTCTGCTATTGAG
Tbp	GAAGCTGCGGTACAATTCCAG	CCCCTTGTACCCTTCACCAAT

Estadística

Se utilizó la prueba T de student de dos colas con 95% de confianza para la determinación de diferencias significativas.

6.

Resultados

En el presente trabajo se investigaron tres aspectos: el efecto de la diferenciación, el efecto del tejido adiposo de origen y el efecto de la dieta sobre la expresión génica. En la sección de resultados se mencionarán todos estos sin embargo, por razones de claridad, ésta sección se subdividirá en cuatro: (1) la validación del modelo de obesidad inducido por dieta alta en grasa, (2) la caracterización de diferencias generales entre tejido de origen y dieta, (3) el efecto del tejido de origen y (4) efecto de la dieta (DAG vs. DC) sobre la expresión génica de CPAs durante la diferenciación.

1) Caracterización y validación del modelo de obesidad inducido por dieta alta en grasa

Con el fin de validar el modelo, después de 8 semanas de mantener a los ratones con la respectiva dieta: control (DC) o alta en grasa (DAG), se realizaron mediciones del peso completo del animal al final de la dieta así como el de ambos tejidos adiposos (TVis y TSc) y de la glicemia en el posprandio. No se observaron cambios significativos de peso completo de los ratones entre dietas utilizadas (Figura 6.1.1 A). Sin embargo, los tejidos adiposos viscerales y subcutáneos ambos aumentaron de peso de forma significativa en los ratones con dieta alta en grasa (Figura 6.1.1 B). Por otra parte, la glicemia posprandial de los ratones en DAG también se encontró significativamente elevada en comparación con la de los animales en DC (Figura 6.1.1 C). Estos resultados indican que la DAG aumenta la acumulación de tejido adiposo y altera los niveles de glucosa en sangre, lo cual lo hace efectivo como modelo experimental.

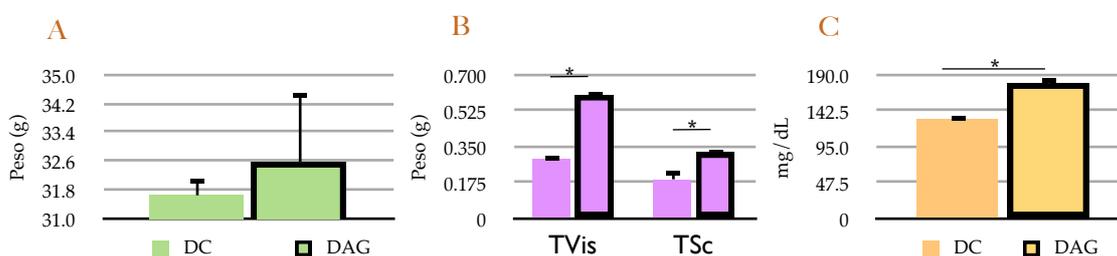


Figura 6.1.1. Caracterización y validación del modelo experimental. (A) Promedio de **peso de ratones** completos tras 8 semanas de dieta. El peso fue tomado inmediatamente después del sacrificio de cinco experimentos separados con un total de 23 ratones en dieta control (DC) y 18 en dieta alta en grasa (DAG). (B) Promedio de **peso de tejidos adiposos** del epiplón (TVis) e inguinal (TSc) de ratones con DC o DAG. (C) **Glicemia posprandial** al día del sacrificio de ratones en DC y DAG. Se ayunaron los ratones 2 horas antes del sacrificio. Gráficas muestran error estándar y * indica diferencias significativas ($p < 0.05$).

2) Caracterización de CPAs subcutáneas y viscerales en ambas dietas

1. Diferenciación por medio de la acumulación lipídica celular

Los preadipocitos subcutáneos obtenidos de ratones alimentados con una dieta control (Sc DC) mostraron la mayor diferenciación por valoración subjetiva de acumulación de lípidos. Los preadipocitos de este grupo pasaron de ser células fibroblásticas alargadas a células redondas con varias gotas medianas de grasa (Figura 6.2.1).

En cambio, el mismo protocolo en preadipocitos subcutáneos de animales alimentados con una dieta alta en grasa (Sc DAG) resultó en menos células con morfología de adipocito maduro. Aquellas células que si acumularon lípidos al día 7, exhibieron esta acumulación como gotas más grandes que las del grupo Sc DC pudiendo sugerir una tendencia a la hipertrofia por efecto de la DAG (Figura 6.2.2).

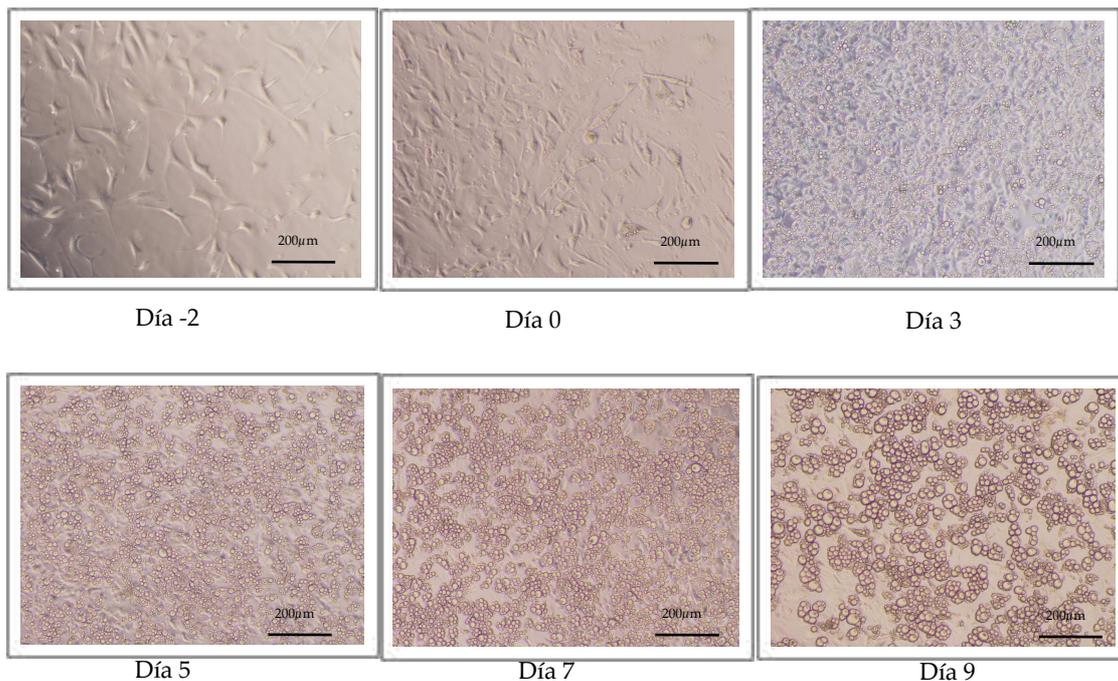


Figura 6.2.1. Visualización de CPAs subcutáneas de ratones alimentados con DC (Sc DC). Microfotografías de las células precursoras de adipocitos (CPAs) durante el protocolo de diferenciación obtenidas del **tejido subcutáneo** (inguinal) de ratones alimentados con **dieta control** (DC). Todas las fotografías fueron tomadas con un aumento de 15x.

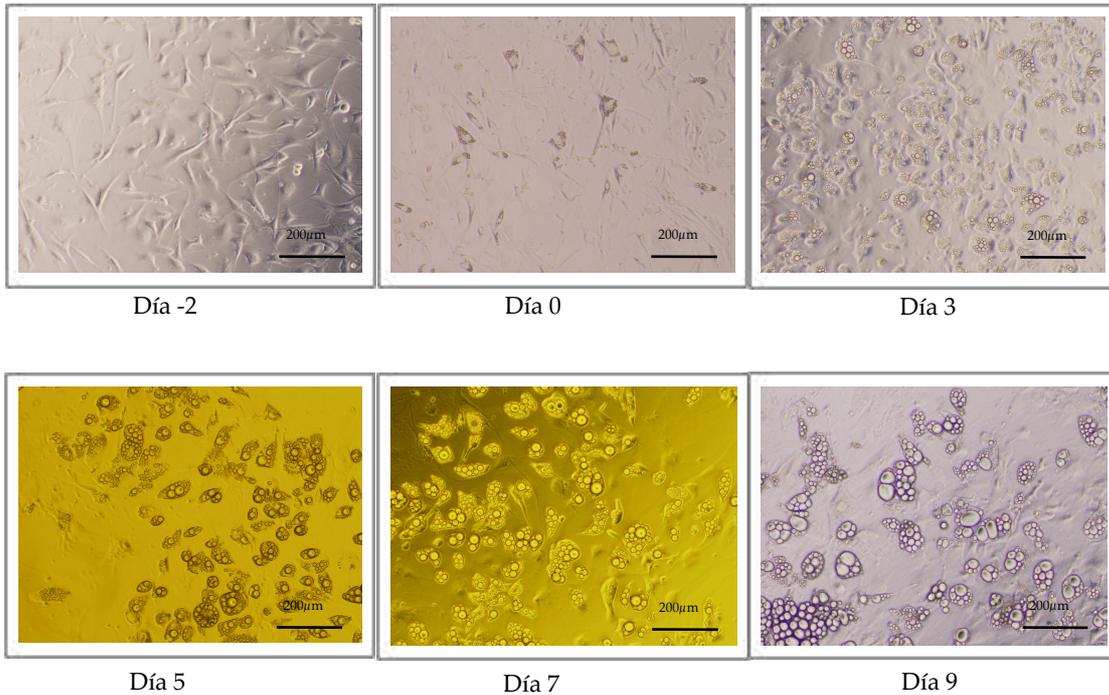


Figura 6.2.2. Visualización de CPAs **subcutáneas** de ratones alimentados con **DAG (Sc DAG)**. Microfotografías de las células precursoras de adipocitos (CPAs) durante el protocolo de diferenciación obtenidas del tejido **subcutáneo** (inguinal) de ratones alimentados con **dieta alta en grasa** (DAG). Todas las fotografías fueron tomadas a un aumento de 15x.

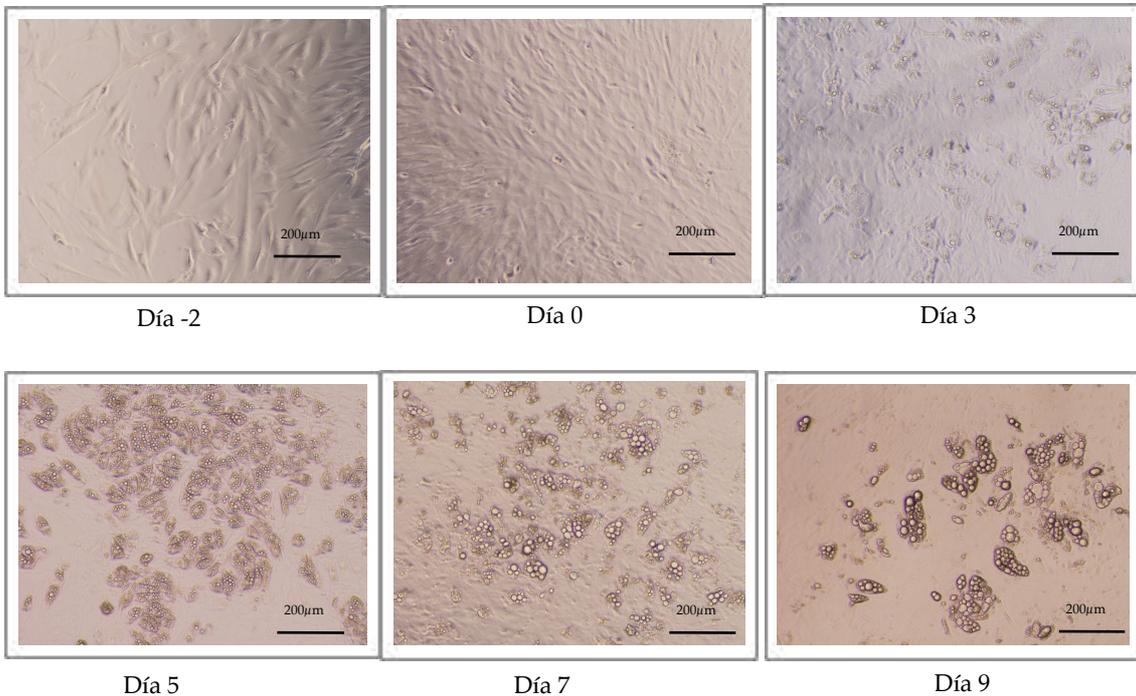


Figura 6.2.3. Visualización de CPAs **visceral** de ratones alimentados con **DC (Vis DC)**. Microfotografías de las células precursoras de adipocitos (CPAs) obtenidas del tejido **visceral** (epiplón) de ratones alimentados con **dieta control** (DC) durante el protocolo de diferenciación. Todas las fotografías fueron tomadas a un aumento de 15x.

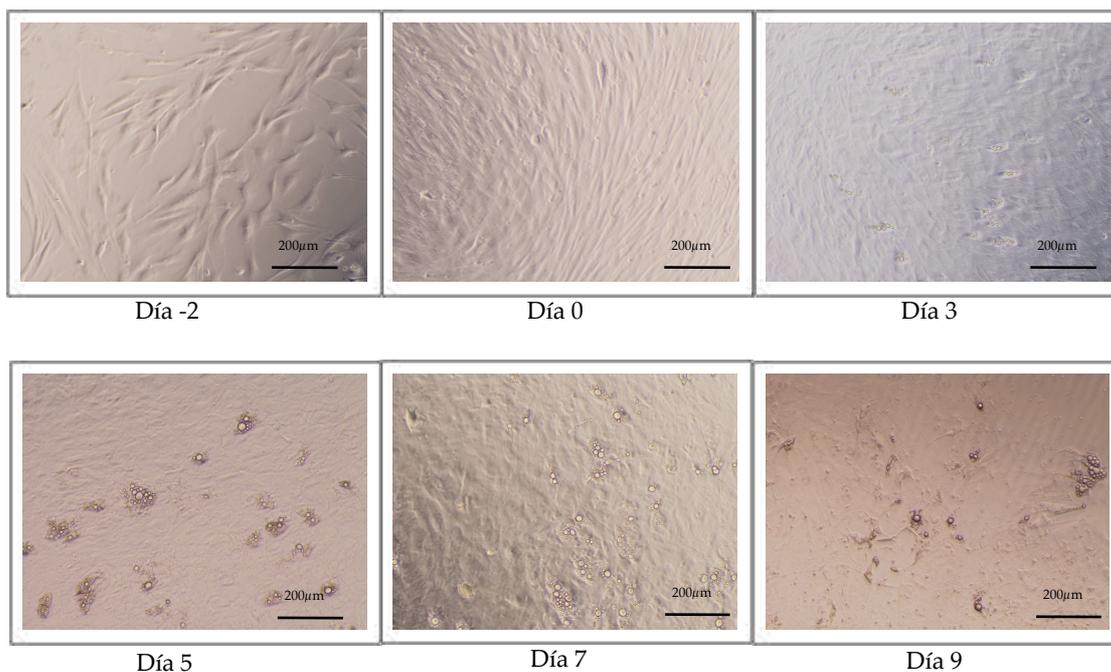


Figura 6.2.4. Visualización de CPAs viscerales de ratones alimentados con DAG (Vis DAG). Microfotografías de las células precursoras de adipocitos (CPAs) obtenidas del tejido visceral (epiplón) de ratones alimentados con **dieta alta en grasa (DAG)** durante el protocolo de diferenciación. Todas las fotografías fueron tomadas a un aumento de 15x.

Los preadipocitos viscerales provenientes de ratones alimentados con dieta control (Vis DC) (Figura 6.2.3) fueron similares a los Sc DAG (Figura 6.2.2) en términos de número de células aparentemente diferenciadas siendo estas menos que las observadas en el grupo Sc DC. Sin embargo, las gotas de grasa en el caso de las Vis CD fueron mas pequeñas a las de Sc DAG.

Los preadipocitos obtenidos del tejido visceral de animales alimentados con dieta alta en grasa (Vis DAG) mostraron la menor cantidad de adipocitos maduros de los cuatro grupos al final del protocolo de diferenciación con casi ninguna célula que exhibiera acumulación lipídica (Figura 6.2.4).

2. Expresión génica antes y después del protocolo de diferenciación

Con la finalidad de evaluar la expresión génica por efecto del protocolo de diferenciación, se realizaron valoraciones de los genes de interés previo al inicio (día -2) y al finalizar el protocolo de diferenciación (día 7). Estos datos se muestran a continuación (Figura 6.2.5) incorporando todos los genes en los días mencionados para ilustrar de forma concisa aquellos genes cambiantes con la diferenciación, en los dos tejidos y las dos dietas. En aquellos genes que presentaron cambios por efecto de la diferenciación y el

tejido o la dieta se realizaron valoraciones de la expresión génica para el resto de los días (0, 3 y 5). Dichos resultados se describirán mas adelante en las siguientes secciones.

En las CPAs de los cuatro grupos, la expresión de los genes *hp*, *agt* y *fnDC5* aumentó significativamente al día 7 con respecto al -2 del protocolo de diferenciación. El gen *mmp3* aumentó significativamente su expresión al final de la diferenciación sólo en CPAs viscerales de ambas dietas mientras que el gen *cdh9* presentó cambios significativos solo en CPAs subcutáneas de ambas dietas. El gen *vegfc* aumentó significativamente con la diferenciación solo en CPAs con DC. Finalmente, el gen *dkk2* permaneció igual en todos los grupos excepto en CPAs viscerales de animales en DC, donde aumentó significativamente con la diferenciación (Figura 6.2.5 A).

En la Figura 6.2.5 B, se muestran las veces de cambio entre el día -2 y 7 de cada gen normalizados al día -2 de cada grupo (Sc DC, Sc DAG, Vis DC, Vis DAG). Las variables de tejido y dieta también afectaron las veces de aumento en cada gen. La expresión de *hp* y *agt* aumentó significativamente sólo en los grupos Sc DC y Vis DAG. Las veces de cambio del gen *fnDC5* fue significativo solo en CPAs subcutáneas de dieta control y las de los genes *dkk2* y *cdh9* solo en CPAs subcutáneas de dieta alta en grasa. Para el gen *mmp3*, las veces de cambio fueron significativas solo en los CPAs viscerales y para el gen *vegfc* solo en CPAs subcutáneas de dieta alta en grasa y viscerales de dieta control.

3) Caracterización de CPAs por el tejido de origen

1. Valoración de la diferenciación entre tejidos por medio de la expresión del gen *ppary*
Los cambios en la diferenciación entre cada tejido y cada dieta, se analizaron a nivel molecular midiendo la expresión de *ppary*, el cual es un factor de transcripción indispensable para la diferenciación, por medio de qRT-PCR.

En apoyo a lo observado en las micro-fotografías, donde la diferenciación fue mayor en CPAs subcutáneas por exhibir estas mayor acumulación lipídica, la expresión de *ppary* en estos grupos (Sc DC y Sc DAG) fue significativamente mayor que en CPAs viscerales de ambas dietas (Figuras 6.3.1 A y C). Sin embargo, en ambas dietas no hubo diferencias significativas en cuanto a patrón de expresión y veces de aumento (Figuras 6.3.1 B, D y F). Estos resultados se mantuvieron cuando se incluyeron todos los puntos de la curva en el cálculo de significancias, siendo la expresión en CPAs subcutáneas también distinta entre dietas (Figura 6.3.1 E).

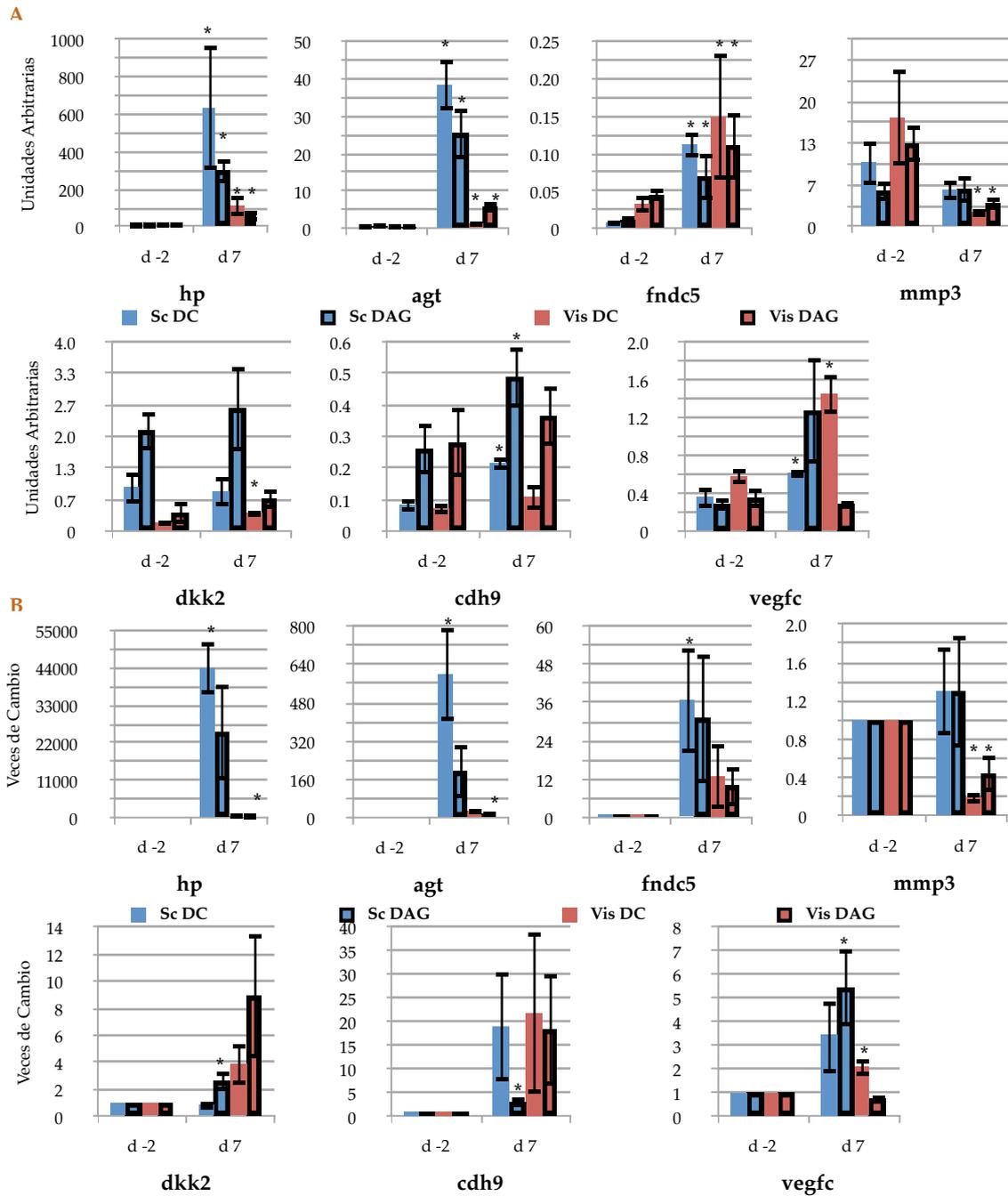


Figura 6.2.5. Efecto de la diferenciación sobre la expresión génica. (A) Diferencias en expresión génica en CPAs al inicio (día -2) y término del protocolo de diferenciación (día 7). Datos expresados en **unidades arbitrarias**. **(B) Veces de cambio** en la expresión génica en CPAs al inicio (día -2) y término del protocolo de diferenciación (día 7). Datos normalizados con respecto al día -2 de cada grupo. **Sc DC**= CPAs subcutáneas de animales en dieta control; **Sc DAG**= CPAs subcutáneas de animales en dieta alta en grasa; **Vis DC**= CPAs viscerales de animales en dieta control; **Vis DAG**= CPAs viscerales de animales en dieta alta en grasa. n=6. Gráficas muestran error estándar. (*) Significancia respecto al día -2 de cada grupo ($p < 0.05$).

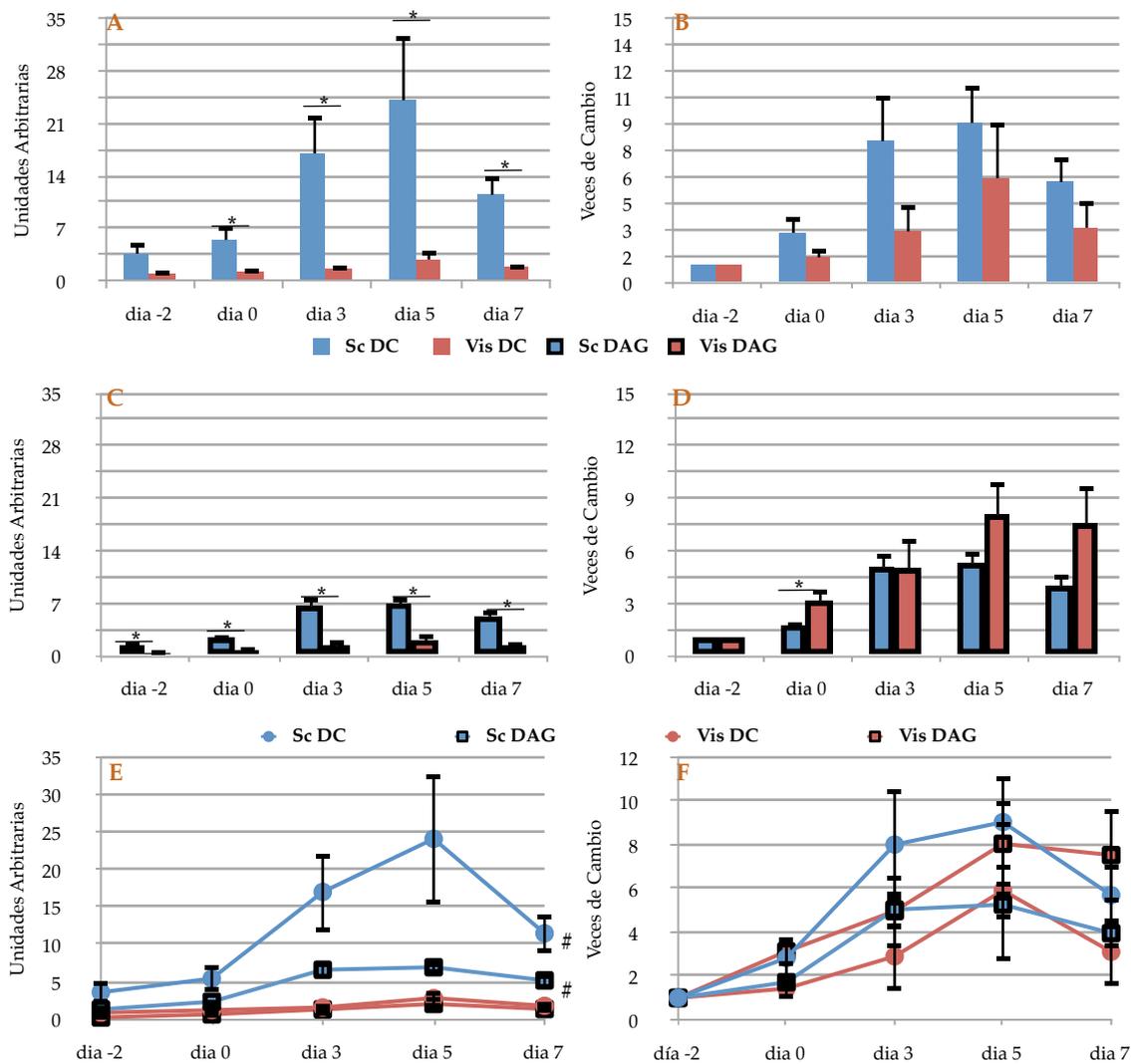


Figura 6.3.1. Diferencias en la expresión génica de *pparγ* entre CPAs subcutáneas y viscerales. (A) Expresión de *pparγ* en unidades arbitrarias a lo largo del protocolo de diferenciación en CPAs viscerales y subcutáneas provenientes de animales en **dieta control** (DC). Datos sin normalizar. (B) **Veces de cambio** en la expresión de *pparγ* a lo largo del protocolo de diferenciación en CPAs viscerales y subcutáneas provenientes de animales en **dieta control** (DC). Los datos están normalizados al día -2 de cada tejido. (C) Expresión de *pparγ* en unidades arbitrarias a lo largo del protocolo de diferenciación en CPAs viscerales y subcutáneas provenientes de animales en **dieta alta en grasa** (DAG). Datos sin normalizar. (D) **Veces de cambio** en la expresión de *pparγ* a lo largo del protocolo de diferenciación en CPAs viscerales y subcutáneas provenientes de animales en **dieta alta en grasa** (DAG). Los datos están normalizados al día -2 de cada tejido. (E) Expresión de *pparγ* en unidades arbitrarias a lo largo del protocolo de diferenciación en todos los grupos. Datos sin normalizar. (F) **Veces de cambio** en la expresión de *pparγ* a lo largo del protocolo de diferenciación en todos los grupos. Datos normalizados al día -2 de cada tejido. CPAs: Células precursoras de adipocitos. **Sc DC**= CPAs subcutáneas de animales en dieta control; **Vis DC**= CPAs viscerales de animales en dieta control; **Sc DAG**= CPAs subcutáneas de animales en dieta alta en grasa; **Vis DAG**= CPAs viscerales de animales en dieta alta en grasa. n=6. Gráficas muestran error estándar. n=6. (*) Significancia respecto al mismo día. (#) Diferencia significativa del grupo. (p<0.05).

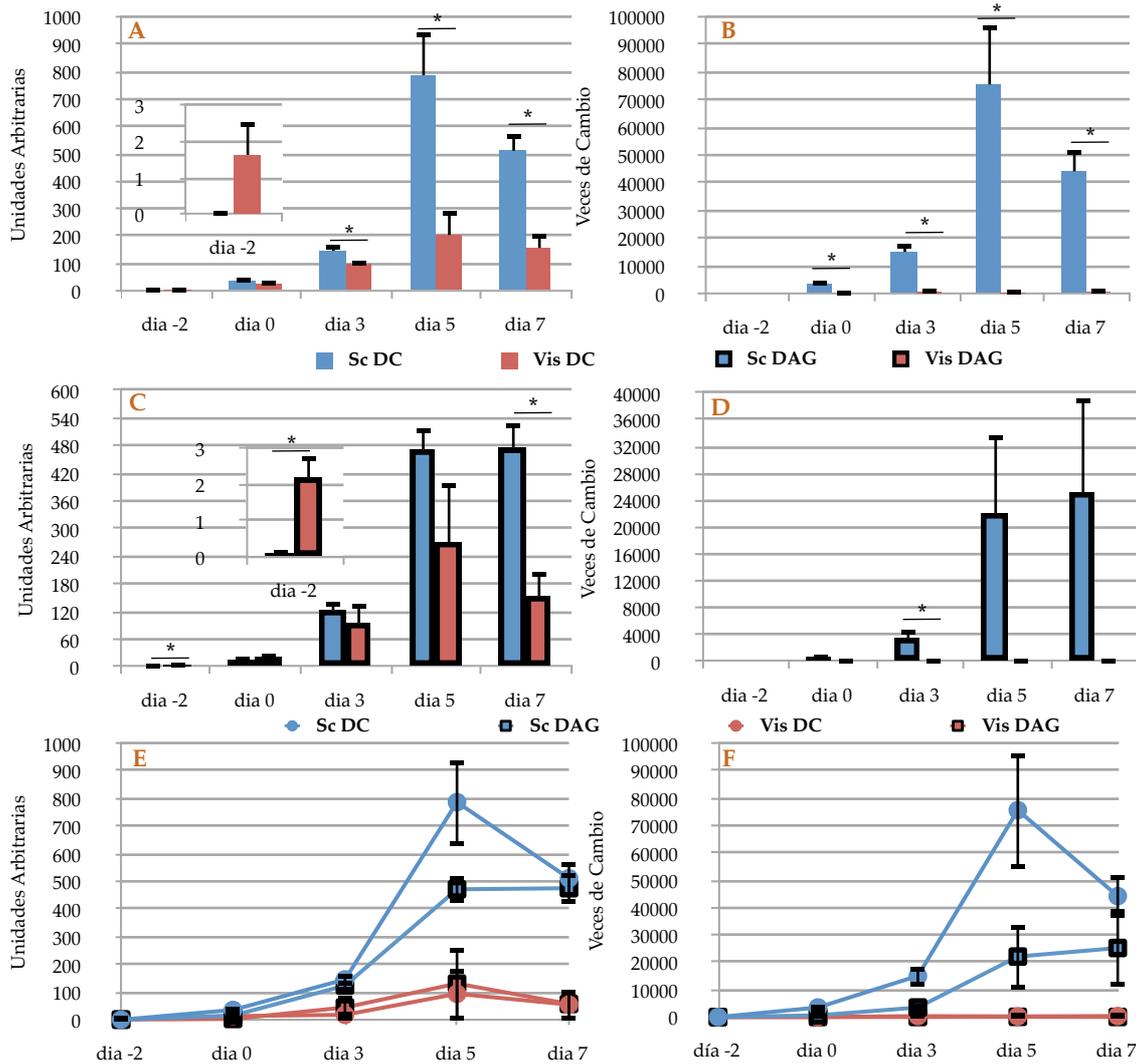


Figura 6.3.2. Diferencias en la expresión génica de *hp* entre CPAs subcutáneas y viscerales. (A) Expresión en **unidades arbitrarias** de *hp* en CPAs subcutáneas y viscerales provenientes de animales alimentados con **dieta control** en días -2, 0, 3, 5 y 7 del protocolo de diferenciación. Datos sin normalizar. (B) **Veces de cambio** en la expresión de *hp* en CPAs subcutáneas y viscerales provenientes de animales alimentados con **dieta control** en días -2, 0, 3, 5 y 7 del protocolo de diferenciación. Datos normalizados al día -2 de cada tejido. (C) Expresión en **unidades arbitrarias** de *hp* en CPAs subcutáneas y viscerales provenientes de animales alimentados con **dieta alta en grasa** en días -2, 0, 3, 5 y 7 del protocolo de diferenciación. Datos sin normalizar. (D) **Veces de cambio** en la expresión de *hp* en CPAs subcutáneas y viscerales provenientes de animales alimentados con **dieta alta en grasa** en días -2, 0, 3, 5 y 7 del protocolo de diferenciación. Datos normalizados al día -2 de cada tejido. (E) Expresión de *hp* en unidades arbitrarias a lo largo del protocolo de diferenciación en todos los grupos. Datos sin normalizar. (F) **Veces de cambio** en la expresión de *hp* a lo largo del protocolo de diferenciación en todos los grupos. Datos normalizados al día -2 de cada tejido. CPAs: Células precursoras de adipocitos. **Sc DC**= CPAs subcutáneas de animales en dieta control; **Vis DC**= CPAs viscerales de animales en dieta control; **Sc DAG**= CPAs subcutáneas de animales en dieta alta en grasa; **Vis DAG**= CPAs viscerales de animales en dieta alta en grasa. n=6. Gráficas muestran error estándar. n=6. (*) Significancia respecto al mismo día (p< 0.05).

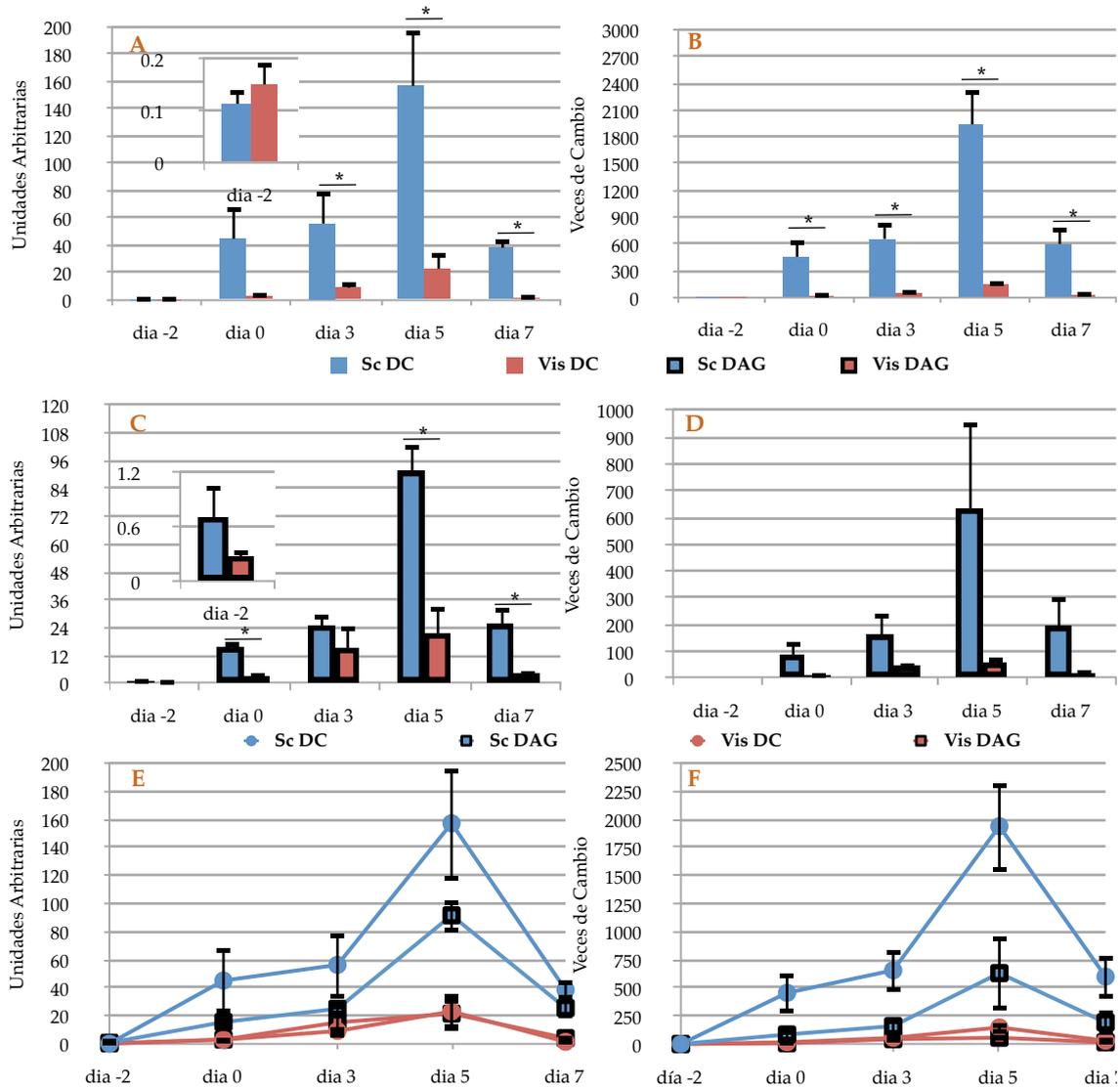


Figura 6.3.3. Diferencias en la expresión génica de *agt* entre CPAs subcutáneas y viscerales. (A) Expresión en **unidades arbitrarias** de *agt* en CPAs subcutáneas y viscerales provenientes de animales alimentados con **dieta control** en días -2, 0, 3, 5 y 7 del protocolo de diferenciación. Datos sin normalizar. (B) **Veces de cambio** en la expresión de *agt* en CPAs subcutáneas y viscerales provenientes de animales alimentados con **dieta control** en días -2, 0, 3, 5 y 7 del protocolo de diferenciación. Datos normalizados al día -2 de cada tejido. (C) Expresión en **unidades arbitrarias** de *agt* en CPAs subcutáneas y viscerales provenientes de animales alimentados con **dieta alta en grasa** en días -2, 0, 3, 5 y 7 del protocolo de diferenciación. Datos sin normalizar. (D) **Veces de cambio** en la expresión de *agt* en CPAs subcutáneas y viscerales provenientes de animales alimentados con **dieta alta en grasa** en días -2, 0, 3, 5 y 7 del protocolo de diferenciación. Datos normalizados al día -2 de cada tejido. (E) Expresión de *agt* en unidades arbitrarias a lo largo del protocolo de diferenciación en todos los grupos. Datos sin normalizar. (F) **Veces de cambio** en la expresión de *agt* a lo largo del protocolo de diferenciación en todos los grupos. Datos normalizados al día -2 de cada tejido. CPAs: Células precursoras de adipocitos. Sc DC= CPAs subcutáneas de animales en dieta control; Vis DC= CPAs viscerales de animales en dieta control; Sc DAG= CPAs subcutáneas de animales en dieta alta en grasa; Vis DAG= CPAs viscerales de animales en dieta alta en grasa. n=6. Gráficas muestran error estándar. n=6. (*) Significancia respecto al mismo día ($p < 0.05$).

2. Diferencias en la expresión génica entre CPAs subcutáneas y viscerales

Haptoglobina (hp)

En ambos tejidos, visceral y subcutáneo, la diferenciación induce un aumento significativo en la expresión de hp (Figura 6.2.5), la cual tiene un patrón en forma de campana y su pico es alcanzado al día 5. En el caso de animales con DC, la expresión de hp en CPAs subcutáneas es significativamente más alta que en viscerales (Figuras 6.3.2 A y B).

En el caso de animales con DAG, las diferencias descritas arriba no alcanzan a ser significativas entre CPAs subcutáneas y viscerales en ninguno de los días (Figuras 6.3.2 C y D). En otras palabras, el aumento en la expresión de hp, aunque es mayor conforme avanza la diferenciación en ambos tejidos, es menor en CPAs viscerales que en subcutáneas y éstas diferencias son menos evidentes cuando los animales son sometidos a una DAG. La comparación de las curvas completas no arrojó diferencias significativas probablemente debido a una gran variabilidad entre cultivos (Figuras 6.3.2E y F).

Angiotensinógeno (agt)

La expresión de agt, también en forma de campana con un pico al día 5, fue significativamente mayor en CPAs subcutáneas en los días 0, 3, 5 y 7 del protocolo de diferenciación (Figuras 6.3.3 A y C). Cuando los datos son normalizados al día -2 de su respectivo tejido, el aumento de expresión es mayor en CPAs subcutáneas que viscerales en condiciones de dieta control (Figura 6.3.3 B) pero estas diferencias no son significativas en condiciones de dieta alta en grasa (Figura 6.3.3 D). Cuando se tomaron en cuenta todos los puntos de la curva, las diferencias entre grupos no fueron significativas, probablemente debido a una gran variabilidad entre cultivos (Figuras 6.3.3 E y F).

Fibronectina 5 con dominio tipo III (fndc5)

Como se describió anteriormente, fndc5 aumenta con la diferenciación independientemente del tejido o la dieta (Figura 6.2.5). La expresión de fndc5 no se midió para los días 0, 3 y 7 ya que no se observaron diferencias entre dietas o tejidos al final de la diferenciación (Figura 6.3.4). Sin embargo, en ambas dietas, la expresión basal (día -2) de fndc5 fue mayor en CPAs viscerales (Figuras 6.3.4 A y C).

LIM homeobox 8 (lhx8)

El gen *lhx8* es aparentemente exclusivo a CPAs subcutáneas, ya que la expresión en viscerales fue muy baja o nula (Figura 6.3.5). En CPAs subcutáneas, *lhx8* incrementó significativamente con la diferenciación (aproximadamente 8 veces en DC y 7 en DAG).

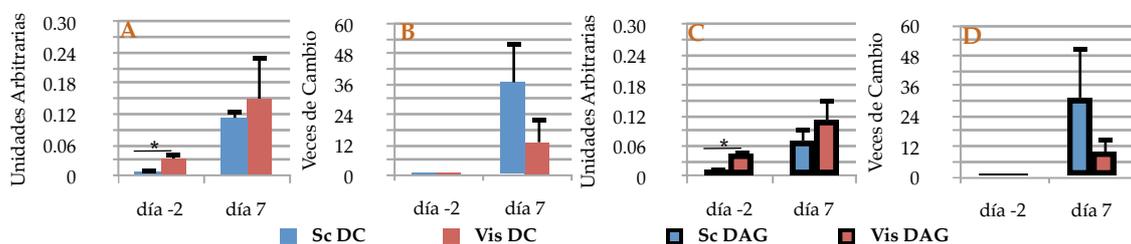


Figura 6.3.4. Diferencias en la expresión génica de *fndc5* entre CPAs subcutáneas y viscerales. (A) Expresión en **unidades arbitrarias** de *fndc5* en CPAs subcutáneas y viscerales provenientes de animales alimentados con **dieta control** en días -2 y 7 del protocolo de diferenciación. Datos sin normalizar. (B) **Veces de cambio** en la expresión de *fndc5* en CPAs subcutáneas y viscerales provenientes de animales alimentados con **dieta control** en días -2 y 7 del protocolo de diferenciación. Datos normalizados al día -2 de cada tejido. (C) Expresión en **unidades arbitrarias** de *fndc5* en CPAs subcutáneas y viscerales provenientes de animales alimentados con **dieta alta en grasa** en días -2 y 7 del protocolo de diferenciación. Datos sin normalizar. (D) **Veces de cambio** en la expresión de *fndc5* en CPAs subcutáneas y viscerales provenientes de animales alimentados con **dieta alta en grasa** en días -2 y 7 del protocolo de diferenciación. Datos normalizados al día -2 de cada tejido. Sc DC= CPAs subcutáneas de animales en dieta control; Vis DC= CPAs viscerales de animales en dieta control; Sc DAG= CPAs subcutáneas de animales en dieta alta en grasa; Vis DAG= CPAs viscerales de animales en dieta alta en grasa. n=6. Gráficas muestran error estándar. n=6. (*) Significancia respecto al mismo día ($p < 0.05$).

Metaloproteasa de matriz 3 (mmp3)

La expresión de *mmp3* siguió un patrón opuesto entre CPAs subcutáneas y viscerales pero consistente entre dietas. En la primera mitad del protocolo de diferenciación (días -2, 0 y 3), su expresión y aumento fue mayor en CPAs viscerales y en la segunda mitad (días 5 y 7) en subcutáneas (Figura 6.3.6). Estas diferencias aunque evidentes en ambas dietas, la DAG tiene menos casos significativos. Cuando se tomaron todos los puntos de la curva, no hubo diferencias significativas entre grupos (Figuras 6.3.6 E y F).

Proteína relacionada a dickkopf 2 (dkk2)

La expresión de *dkk2* no se midió para los días 0, 3 y 7 ya que no se observaron diferencias entre tejidos al final de la diferenciación. Sin embargo, como *fndc5*, la expresión de *dkk2* fue significativamente mayor al día -2 en CPAs subcutáneas, diferencia que no se mantuvo al día 7 en la dieta control debido a un aumento significativo de su expresión en CPAs viscerales (Figuras 6.3.7 A y C). En CPAs subcutáneas la expresión de *dkk2* no sufrió cambios con la diferenciación, sin embargo, en el caso de CPAs visce-

rales aumentó alcanzando significancia solo en condiciones de dieta control (Figuras 6.3.7 B y D).

Factor de transcripción 21 (tcf21)

El gen *tcf21* se expresó a niveles no detectables por qRT-PCR en CPAs subcutáneas de dieta control y a niveles muy bajos en CPAs subcutáneas de DAG. Por esta razón la expresión de *tcf21* resultó significativamente mayor en CPAs viscerales (Figuras 6.3.8 A y C). Además, en CPAs viscerales este gen no cambió entre el inicio y el fin del protocolo de diferenciación. En CPAs subcutáneas de dieta alta en grasa, su expresión disminuyó aun mas, lo cual resultó estadísticamente significativo (Figuras 6.3.8 B y D).

Caderina 9 (cdh9)

Como se describió al inicio de esta sección, el gen *cdh9* subió de forma significativa con la diferenciación solo en CPAs subcutáneas (Figura 6.2.5). No hubo diferencias significativas entre CPAs subcutáneas o viscerales en cuanto a su expresión una vez iniciado el protocolo de diferenciación, sin embargo, al día -2 su expresión fue mayor en CPAs viscerales de dieta control (Figura 6.3.9). Los cambios por efecto de la dieta se describirán a mayor detalle en la siguiente sección.

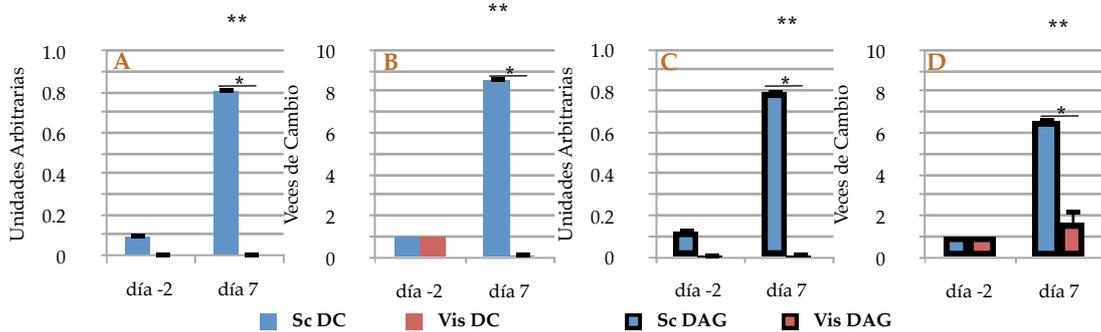


Figura 6.3.5. Diferencias en la expresión génica de *lhx8* entre CPAs subcutáneas y viscerales. (A) Expresión en **unidades arbitrarias** de *lhx8* en CPAs subcutáneas y viscerales provenientes de animales alimentados con **dieta control** en días -2 y 7 del protocolo de diferenciación. Datos sin normalizar. (B) **Veces de cambio** en la expresión de *lhx8* en CPAs subcutáneas y viscerales provenientes de animales alimentados con **dieta control** en días -2 y 7 del protocolo de diferenciación. Datos normalizados al día -2 de cada tejido. (C) Expresión en **unidades arbitrarias** de *lhx8* en CPAs subcutáneas y viscerales provenientes de animales alimentados con **dieta alta en grasa** en días -2 y 7 del protocolo de diferenciación. Datos sin normalizar. (D) **Veces de cambio** en la expresión de *lhx8* en CPAs subcutáneas y viscerales provenientes de animales alimentados con **dieta alta en grasa** en días -2 y 7 del protocolo de diferenciación. Datos normalizados al día -2 de cada tejido. Sc DC= CPAs subcutáneas de animales en dieta control; Vis DC= CPAs viscerales de animales en dieta control; Sc DAG= CPAs subcutáneas de animales en dieta alta en grasa; Vis DAG= CPAs viscerales de animales en dieta alta en grasa. n=6. Gráficas muestran error estándar. n=6. (*) Significancia respecto al mismo día ($p < 0.05$). (**) Significancia respecto al día -2.

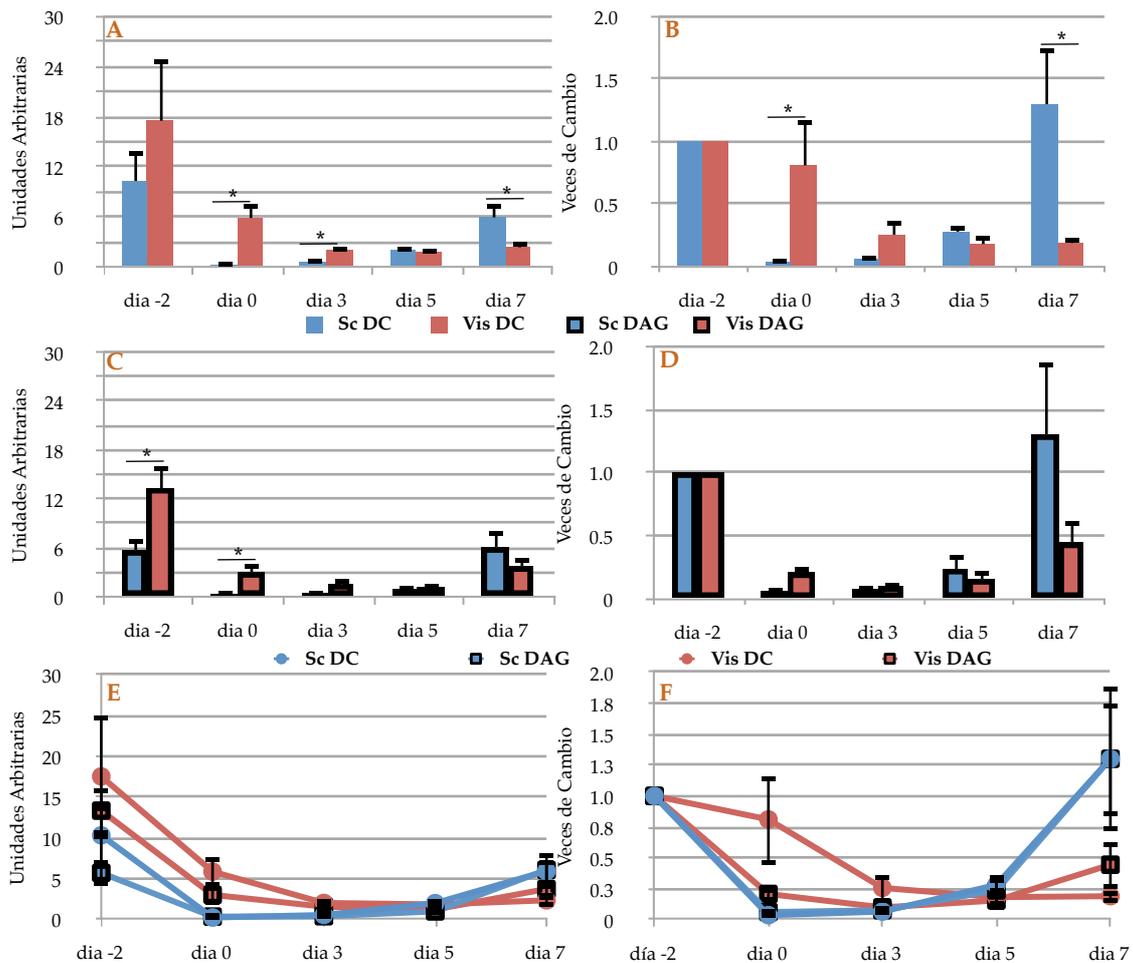


Figura 6.3.6. Diferencias en la expresión génica de *mmp3* entre CPAs subcutáneas y viscerales. (A) Expresión en **unidades arbitrarias** de *mmp3* en CPAs subcutáneas y viscerales provenientes de animales alimentados con **dieta control** en días -2, 0, 3, 5 y 7 del protocolo de diferenciación. Datos sin normalizar. (B) **Veces de cambio** en la expresión de *mmp3* en CPAs subcutáneas y viscerales provenientes de animales alimentados con **dieta control** en días -2, 0, 3, 5 y 7 del protocolo de diferenciación. Datos normalizados al día -2 de cada tejido. (C) Expresión en **unidades arbitrarias** de *mmp3* en CPAs subcutáneas y viscerales provenientes de animales alimentados con **dieta alta en grasa** en días -2, 0, 3, 5 y 7 del protocolo de diferenciación. Datos sin normalizar. (D) **Veces de cambio** en la expresión de *mmp3* en CPAs subcutáneas y viscerales provenientes de animales alimentados con **dieta alta en grasa** en días -2, 0, 3, 5 y 7 del protocolo de diferenciación. Datos normalizados al día -2 de cada tejido. (E) Expresión de *mmp3* en unidades arbitrarias a lo largo del protocolo de diferenciación en todos los grupos. Datos sin normalizar. (F) **Veces de cambio** en la expresión de *mmp3* a lo largo del protocolo de diferenciación en todos los grupos. Datos normalizados al día -2 de cada tejido. CPAs: Células precursoras de adipocitos. **Sc DC**= CPAs subcutáneas de animales en dieta control; **Vis DC**= CPAs viscerales de animales en dieta control; **Sc DAG**= CPAs subcutáneas de animales en dieta alta en grasa; **Vis DAG**= CPAs viscerales de animales en dieta alta en grasa. n=6. Gráficas muestran error estándar. n=6. (*) Significancia respecto al mismo día (p< 0.05).

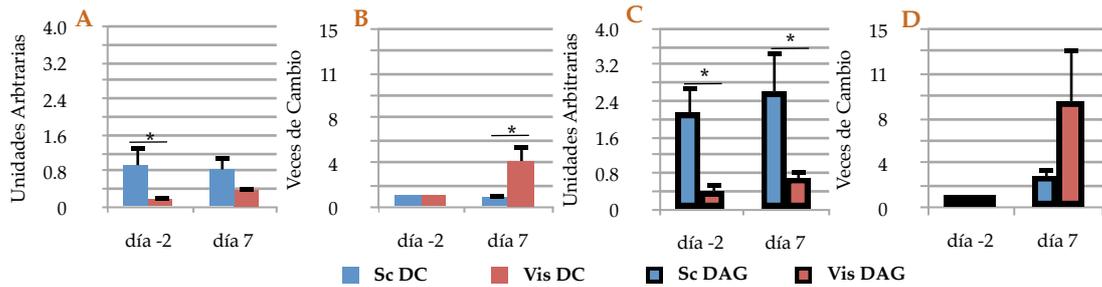


Figura 6.3.7. Diferencias en la expresión génica de *dkk2* entre CPAs subcutáneas y viscerales. (A) Expresión en **unidades arbitrarias** de *dkk2* en CPAs subcutáneas y viscerales provenientes de animales alimentados con **dieta control** en días -2 y 7 del protocolo de diferenciación. Datos sin normalizar. (B) **Veces de cambio** en la expresión de *dkk2* en CPAs subcutáneas y viscerales provenientes de animales alimentados con **dieta control** en días -2 y 7 del protocolo de diferenciación. Datos normalizados al día -2 de cada tejido. (C) Expresión en **unidades arbitrarias** de *dkk2* en CPAs subcutáneas y viscerales provenientes de animales alimentados con **dieta alta en grasa** en días -2 y 7 del protocolo de diferenciación. Datos sin normalizar. (D) **Veces de cambio** en la expresión de *dkk2* en CPAs subcutáneas y viscerales provenientes de animales alimentados con **dieta alta en grasa** en días -2 y 7 del protocolo de diferenciación. Datos normalizados al día -2 de cada tejido. Sc DC= CPAs subcutáneas de animales en dieta control; Vis DC= CPAs viscerales de animales en dieta control; Sc DAG= CPAs subcutáneas de animales en dieta alta en grasa; Vis DAG= CPAs viscerales de animales en dieta alta en grasa. n=6. Gráficas muestran error estándar. n=6. (*) Significancia respecto al mismo día (p< 0.05).

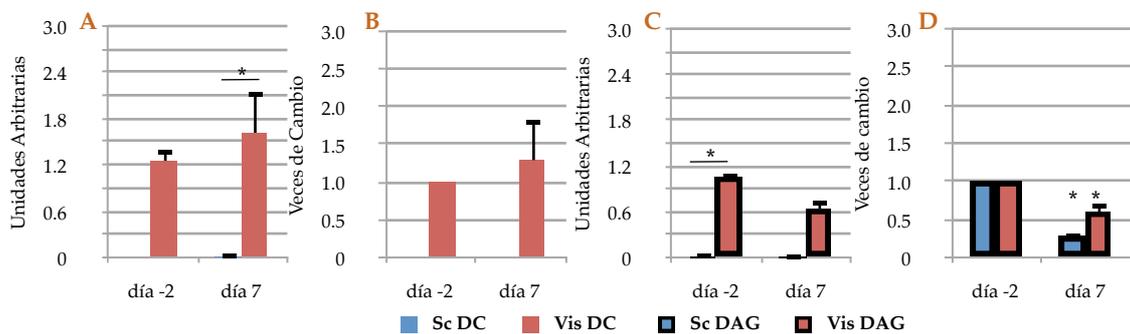


Figura 6.3.8. Diferencias en la expresión génica de *tcf21* entre CPAs subcutáneas y viscerales. (A) Expresión en **unidades arbitrarias** de *tcf21* en CPAs subcutáneas y viscerales provenientes de animales alimentados con **dieta control** en días -2 y 7 del protocolo de diferenciación. Datos sin normalizar. (B) **Veces de cambio** en la expresión de *tcf21* en CPAs subcutáneas y viscerales provenientes de animales alimentados con **dieta control** en días -2 y 7 del protocolo de diferenciación. Datos normalizados al día -2 de cada tejido. (C) Expresión en **unidades arbitrarias** de *tcf21* en CPAs subcutáneas y viscerales provenientes de animales alimentados con **dieta alta en grasa** en días -2 y 7 del protocolo de diferenciación. Datos sin normalizar. (D) **Veces de cambio** en la expresión de *tcf21* en CPAs subcutáneas y viscerales provenientes de animales alimentados con **dieta alta en grasa** en días -2 y 7 del protocolo de diferenciación. Datos normalizados al día -2 de cada tejido. Sc DC= CPAs subcutáneas de animales en dieta control; Vis DC= CPAs viscerales de animales en dieta control; Sc DAG= CPAs subcutáneas de animales en dieta alta en grasa; Vis DAG= CPAs viscerales de animales en dieta alta en grasa. n=6. Gráficas muestran error estándar. n=6. (*) Significancia respecto al mismo día (p< 0.05). (**) Significancia respecto al día -2.

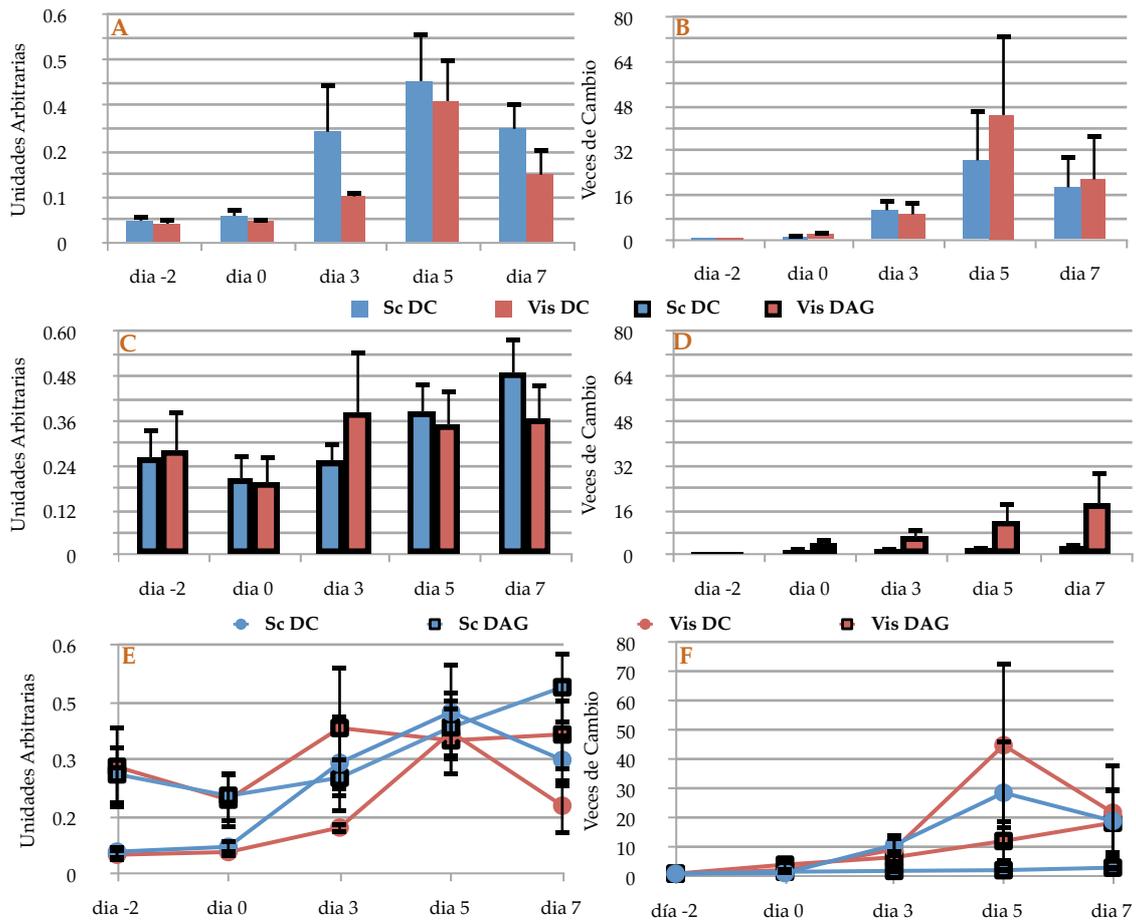


Figura 6.3.9. Diferencias en la expresión génica de *cdh9* entre CPAs subcutáneas y viscerales. (A) Expresión en **unidades arbitrarias** de *cdh9* en CPAs subcutáneas y viscerales provenientes de animales alimentados con **dieta control** en días -2, 0, 3, 5 y 7 del protocolo de diferenciación. Datos sin normalizar. (B) **Veces de cambio** en la expresión de *cdh9* en CPAs subcutáneas y viscerales provenientes de animales alimentados con **dieta control** en días -2, 0, 3, 5 y 7 del protocolo de diferenciación. Datos normalizados al día -2 de cada tejido. (C) Expresión en **unidades arbitrarias** de *cdh9* en CPAs subcutáneas y viscerales provenientes de animales alimentados con **dieta alta en grasa** en días -2, 0, 3, 5 y 7 del protocolo de diferenciación. Datos sin normalizar. (D) **Veces de cambio** en la expresión de *cdh9* en CPAs subcutáneas y viscerales provenientes de animales alimentados con **dieta alta en grasa** en días -2, 0, 3, 5 y 7 del protocolo de diferenciación. Datos normalizados al día -2 de cada tejido. **Sc DC**= CPAs subcutáneas de animales en dieta control; **Vis DC**= CPAs viscerales de animales en dieta control; **Sc DAG**= CPAs subcutáneas de animales en dieta alta en grasa; **Vis DAG**= CPAs viscerales de animales en dieta alta en grasa. n=6. Gráficas muestran error estándar. n=6. (*) Significancia respecto al mismo día ($p < 0.05$).

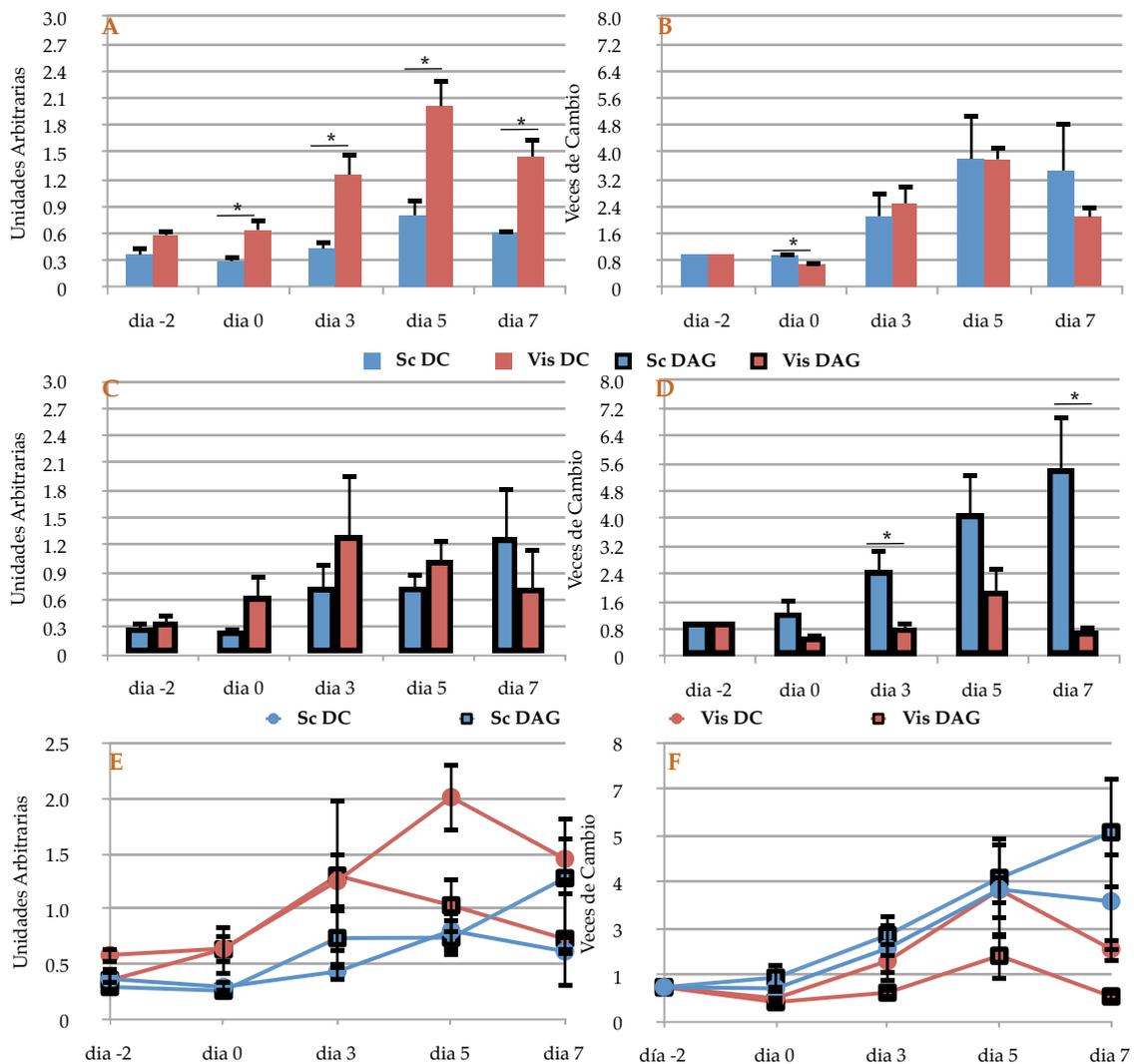


Figura 6.3.10. Diferencias en la expresión génica de *vegfc* entre CPAs subcutáneas y viscerales. (A) Expresión en **unidades arbitrarias** de *vegfc* en CPAs subcutáneas y viscerales provenientes de animales alimentados con **dieta control** en días -2, 0, 3, 5 y 7 del protocolo de diferenciación. Datos sin normalizar. (B) **Veces de cambio** en la expresión de *vegfc* en CPAs subcutáneas y viscerales provenientes de animales alimentados con **dieta control** en días -2, 0, 3, 5 y 7 del protocolo de diferenciación. Datos normalizados al día -2 de cada tejido. (C) Expresión en **unidades arbitrarias** de *vegfc* en CPAs subcutáneas y viscerales provenientes de animales alimentados con **dieta alta en grasa** en días -2, 0, 3, 5 y 7 del protocolo de diferenciación. Datos sin normalizar. (D) **Veces de cambio** en la expresión de *vegfc* en CPAs subcutáneas y viscerales provenientes de animales alimentados con **dieta alta en grasa** en días -2, 0, 3, 5 y 7 del protocolo de diferenciación. Datos normalizados al día -2 de cada tejido. **Sc DC**= CPAs subcutáneas de animales en dieta control; **Vis DC**= CPAs viscerales de animales en dieta control; **Sc DAG**= CPAs subcutáneas de animales en dieta alta en grasa; **Vis DAG**= CPAs viscerales de animales en dieta alta en grasa. n=6. Gráficas muestran error estándar. n=6. (*) Significancia respecto al mismo día ($p < 0.05$).

Factor de crecimiento endotelial vascular c (vegfc)

Como se describió anteriormente, la expresión de vegfc aumentó con la diferenciación solo en condiciones de dieta control (Figura 6.2.5). Su expresión siguió un patrón de campana, con un pico al día 5 y en condiciones de dieta control resultó significativamente mayor sólo en CPAs viscerales sin diferencias en las veces de aumento (Figuras 6.3.10 A y C). Sin embargo, en condiciones de dieta alta en grasa no se observaron estas diferencias debido a un aumento de expresión significativamente mayor en CPAs subcutáneas que en viscerales (Figura 6.3.10 D). Cuando se tomaron todos los puntos de la curva, no hubo diferencias significativas entre grupos probablemente debido a la gran variabilidad entre cultivos y un número insuficiente de casos (Figuras 6.3.10 E y F).

4) Caracterización de diferencias entre CPAs por efecto de la dieta

1. Valoración de la diferenciación entre dietas por medio de la expresión del gen ppar γ

La Figura 6.4.1 muestra los datos del mismo experimento que arrojó los datos de la Figura 6.2.5, sin embargo, en este caso están organizados por tejidos para permitir la comparación entre dietas.

Con el objeto de analizar los cambios en la capacidad adipogénica de CPAs por efecto de la dieta, se midió la expresión de ppar γ (factor de transcripción esencial para la adipogénesis) por medio de qRT-PCR. La expresión de ppar γ siguió un patrón similar en todos los casos, sin embargo, en CPAs subcutáneas de dieta control llegó a un pico significativamente mayor que en las de dieta alta en grasa (Figura 6.4.1 A). En CPAs viscerales el efecto de la dieta fue evidente solo al día -2 del protocolo de diferenciación, donde la expresión de ppar γ fue significativamente mayor en la DC (Figura 6.4.1 C). Al día 0, las CPAs de DAG mostraron un aumento significativo en la expresión de ppar γ con respecto a las de DC lo cual les permitió mantener niveles de expresión equivalentes por el resto del protocolo de diferenciación (Figura 6.4.1 D).

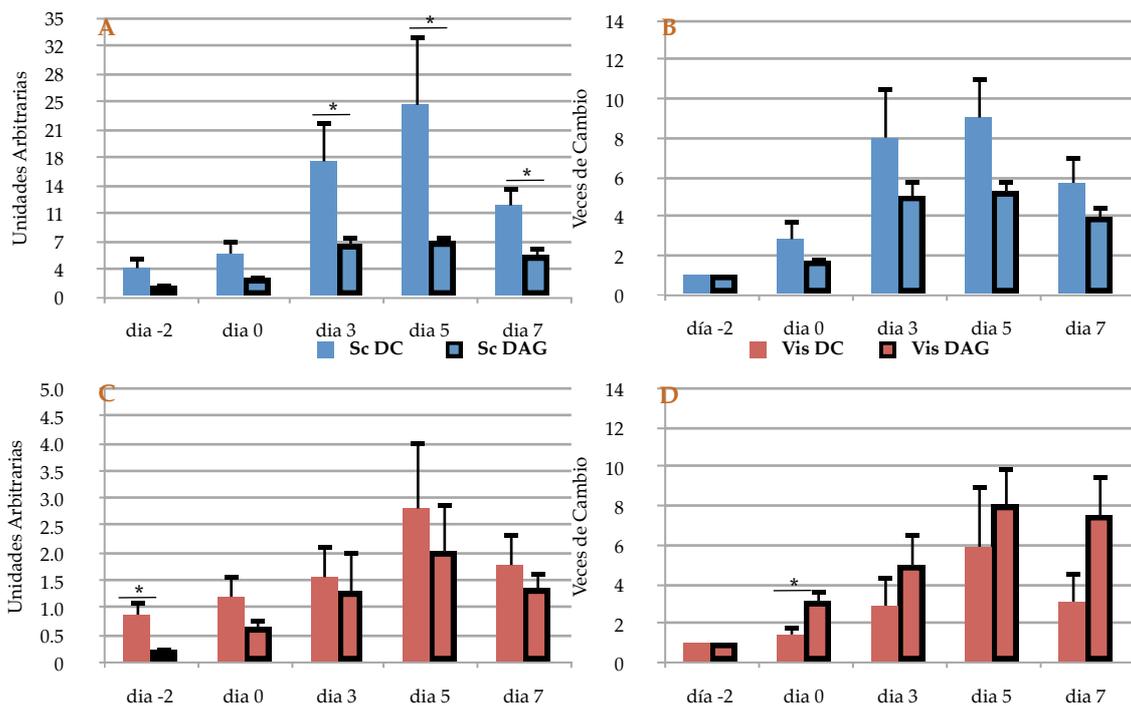


Figura 6.4.1. Efecto de la dieta sobre la expresión de pparγ. (A) Expresión de pparγ en unidades arbitrarias a lo largo del protocolo de diferenciación en CPAs subcutáneas de ambas dietas. Datos sin normalizar. (B) Veces de cambio en la expresión de pparγ a lo largo del protocolo de diferenciación en CPAs subcutáneas de ambas dietas. Los datos están normalizados al día -2 de cada dieta. (C) Expresión de pparγ en unidades arbitrarias a lo largo del protocolo de diferenciación en CPAs viscerales de ambas dietas. Datos sin normalizar. (D) Veces de cambio en la expresión de pparγ a lo largo del protocolo de diferenciación en CPAs viscerales de ambas dietas. Los datos están normalizados al día -2 de cada dieta. CPAs: Células precursoras de adipocitos. Sc DC= CPAs subcutáneas de animales en dieta control; Vis DC= CPAs viscerales de animales en dieta control; Sc DAG= CPAs subcutáneas de animales en dieta alta en grasa; Vis DAG= CPAs viscerales de animales en dieta alta en grasa. n=6. Gráficas muestran error estándar. n=6. (*) Significancia respecto al mismo día (p< 0.05).

2. Diferencias entre CPAs respecto a la expresión génica por efecto de la dieta

Con el objeto de comparar diferencias entre la expresión génica de CPAs en cuanto a dieta, en la presente sección se organizaron los datos de la sección pasada de forma que permitiera la comparación entre dietas en lugar de tejidos.

Haptoglobina (hp)

En CPAs subcutáneas, la DAG ocasionó una sobre-expresión de hp al día -2 pero evitó que se alcanzara el pico de expresión observado al día 5 del protocolo de diferenciación (Figura 6.4.2 A). Esta sobre-expresión al día -2 ocurrió en CPAs viscerales de ambas dietas, lo cual coincidió con una menor expresión a lo largo del protocolo de diferencia-

ción (Figura 6.4.2 C). En apoyo a esto, en CPAs subcutáneas el aumento en expresión fue mayor en la dieta control en los días 0 a 5 (Figura 6.4.2 B) y también pudo haber permitido el pico significativamente mayor en CPAs subcutáneas. En CPAs viscerales, la dieta control permitió un aumento en expresión estadísticamente significativo sólo en el día 0 (Figura 6.4.2 D).

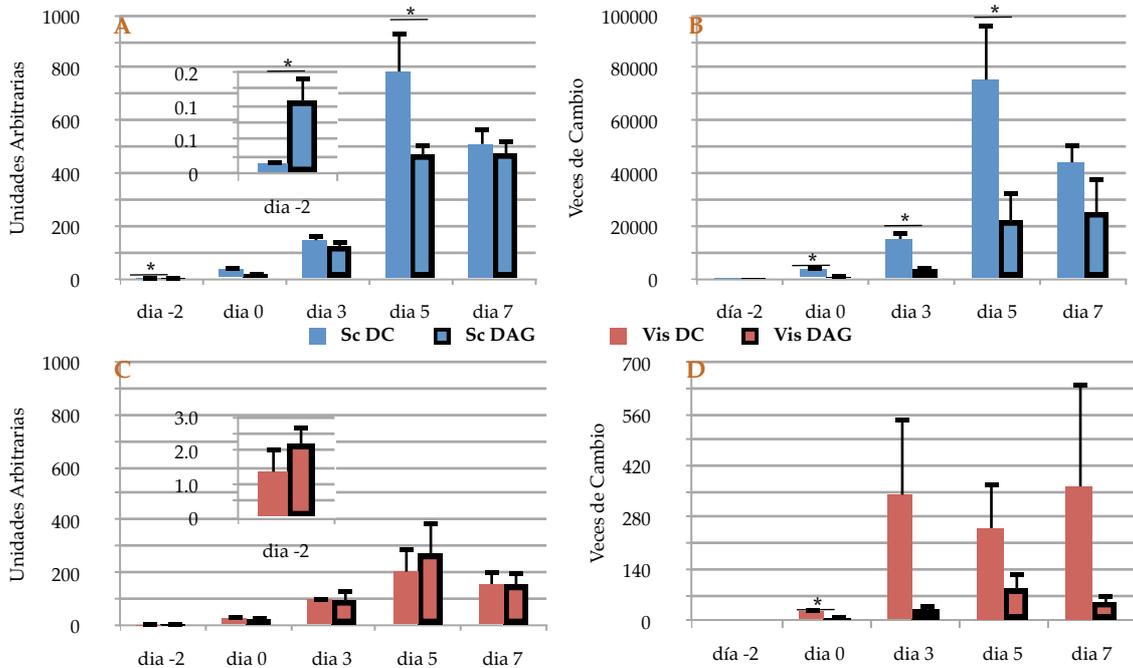


Figura 6.4.2. Efecto de la dieta sobre la expresión de hp. (A) Expresión de hp en unidades arbitrarias a lo largo del protocolo de diferenciación en CPAs subcutáneas de ambas dietas. Datos sin normalizar. (B) Veces de cambio en la expresión de hp a lo largo del protocolo de diferenciación en CPAs subcutáneas de ambas dietas. Los datos están normalizados al día -2 de cada dieta. (C) Expresión de hp en unidades arbitrarias a lo largo del protocolo de diferenciación en CPAs viscerales de ambas dietas. Datos sin normalizar. (D) Veces de cambio en la expresión de hp a lo largo del protocolo de diferenciación en CPAs viscerales de ambas dietas. Los datos están normalizados al día -2 de cada dieta. Sc DC= CPAs subcutáneas de animales en dieta control; Vis DC= CPAs viscerales de animales en dieta control; Sc DAG= CPAs subcutáneas de animales en dieta alta en grasa; Vis DAG= CPAs viscerales de animales en dieta alta en grasa. n=6. Gráficas muestran error estándar. n=6. (*) Significancia respecto al mismo día ($p < 0.05$).

Angiotensinógeno (*agt*)

La expresión de agt al día -2 fue mayor en los grupos de DAG, aunque solo significativo en el caso de CPAs viscerales (Figuras 6.4.3 A y C). Interesantemente, solo en el caso de las CPAs subcutáneas la dieta control coincidió con un aumento en expresión significativamente mayor al de la dieta alta en grasa (Figuras 6.4.3 B y D), pudiendo indicar que, como en el caso de hp, una sobreexpresión inicial (día -2) por efecto de la DAG, previene el aumento en expresión esperado con una DC. La expresión de agt en todos

los puntos del protocolo de diferenciación, aunque no estadísticamente significativo, fue mayor en condiciones de dieta control (Figuras 6.3.3 E y F).

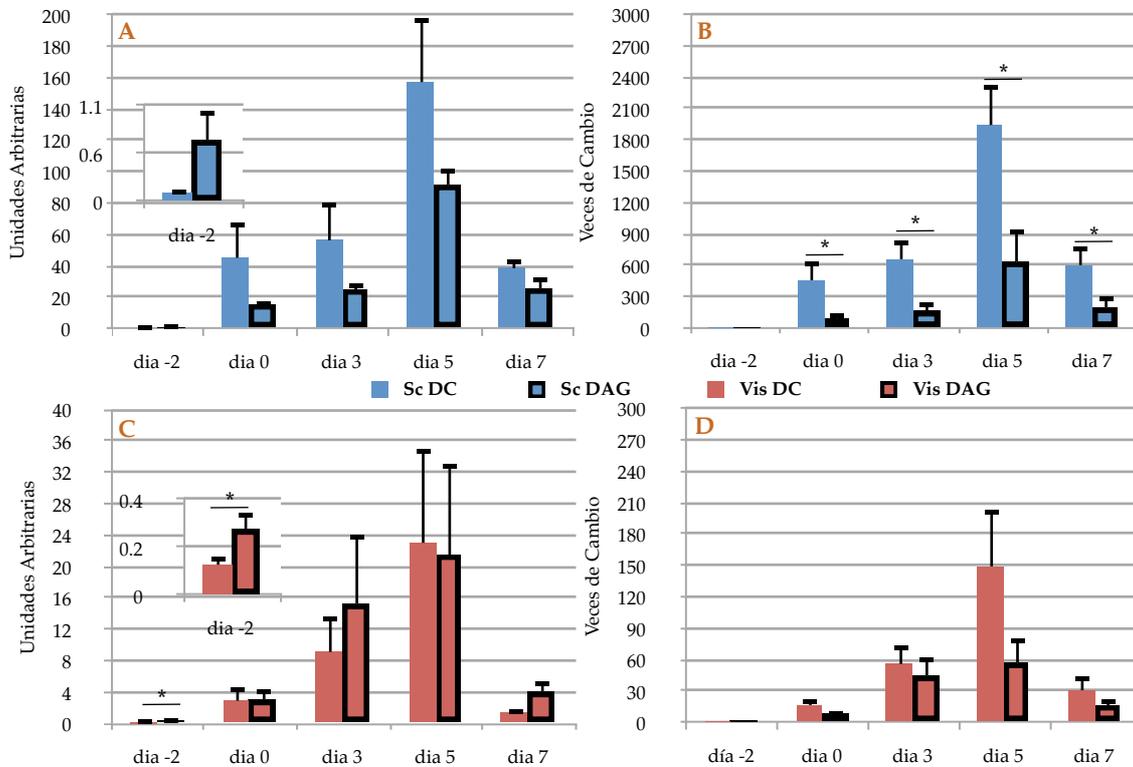


Figura 6.4.3. Efecto de la dieta sobre la expresión de agt. (A) Expresión de agt en unidades arbitrarias a lo largo del protocolo de diferenciación en CPAs subcutáneas de ambas dietas. Datos sin normalizar. (B) Veces de cambio en la expresión de agt a lo largo del protocolo de diferenciación en CPAs subcutáneas de ambas dietas. Los datos están normalizados al día -2 de cada dieta. (C) Expresión de agt en unidades arbitrarias a lo largo del protocolo de diferenciación en CPAs viscerales de ambas dietas. Datos sin normalizar. (D) Veces de cambio en la expresión de agt a lo largo del protocolo de diferenciación en CPAs viscerales de ambas dietas. Los datos están normalizados al día -2 de cada dieta. Sc DC= CPAs subcutáneas de animales en dieta control; Vis DC= CPAs viscerales de animales en dieta control; Sc DAG= CPAs subcutáneas de animales en dieta alta en grasa; Vis DAG= CPAs viscerales de animales en dieta alta en grasa. n=6. Gráficas muestran error estándar. n=6. (*) Significancia respecto al mismo día (p< 0.05).

Fibronectina 5 con dominio tipo III (*fndc5*)

Como descrito en la sección anterior, el gen *fndc5* aumentó significativamente con la diferenciación (Figura 6.2.5), pero no presentó diferencias entre tejidos (Figura 6.3.4) y tampoco presentó diferencias por efecto de la dieta (Figura 6.4.4).

LIM homeobox 8 (*lhx8*)

Como se describió previamente, la expresión de *lhx8* subió significativamente con la diferenciación (Figura 6.2.5), expresándose preferencialmente en CPAs subcutáneas. En éstas, se observó una tendencia donde la expresión de *lhx8* fue menor en el grupo de DAG (Figura 6.4.5 A) aunque estas diferencias no resultaron significativas. Tampoco resultaron diferentes las CPAs subcutáneas de ambas dietas en cuanto a aumento en la expresión de *lhx8* (Figura 6.4.5 B).

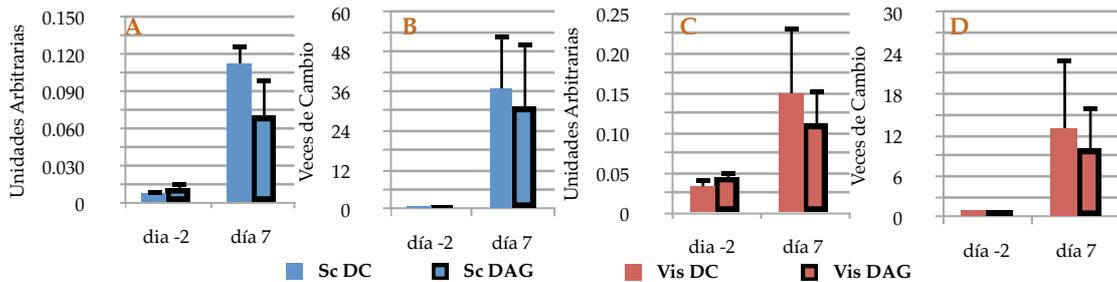


Figura 6.4.4. Efecto de la dieta sobre la expresión de *fndc5*. (A) Expresión de *fndc5* en **unidades arbitrarias** al inicio (día -2) y término (día 7) del protocolo de diferenciación en CPAs **subcutáneas** de ambas dietas. Datos sin normalizar. (B) **Veces de cambio** en la expresión de *fndc5* al inicio (día -2) y término (día 7) del protocolo de diferenciación en CPAs **subcutáneas** de ambas dietas. Los datos están normalizados al día -2 de cada dieta. (C) Expresión de *fndc5* en **unidades arbitrarias** al inicio (día -2) y término (día 7) del protocolo de diferenciación en CPAs **viscerales** de ambas dietas. Datos sin normalizar. (D) **Veces de cambio** en la expresión de *fndc5* al inicio (día -2) y término (día 7) del protocolo de diferenciación en CPAs **viscerales** de ambas dietas. Los datos están normalizados al día -2 de cada dieta. Sc DC= CPAs subcutáneas de animales en dieta control; Vis DC= CPAs viscerales de animales en dieta control; Sc DAG= CPAs subcutáneas de animales en dieta alta en grasa; Vis DAG= CPAs viscerales de animales en dieta alta en grasa. n=6. Gráficas muestran error estándar. n=6. (*) Significancia respecto al mismo día ($p < 0.05$).

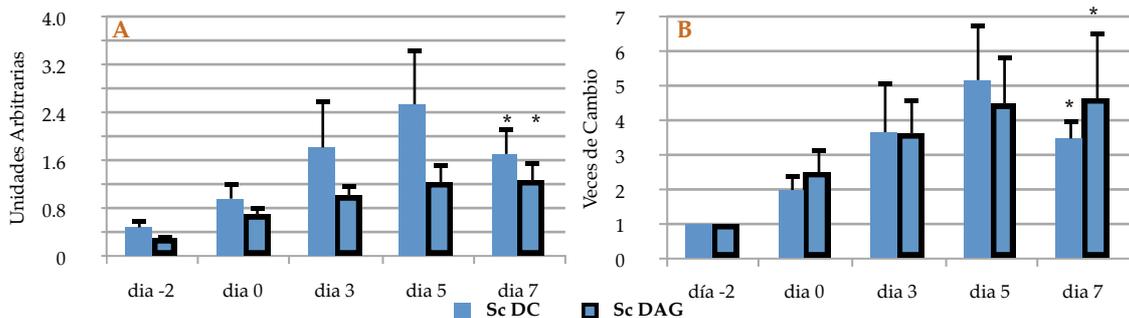


Figura 6.4.5. Efecto de la dieta sobre la expresión de *lhx8* en CPAs subcutáneas. (A) Expresión de *lhx8* en **unidades arbitrarias** a lo largo del protocolo de diferenciación en CPAs **subcutáneas** de ambas dietas. Datos sin normalizar. (B) **Veces de cambio** en la expresión de *lhx8* a lo largo del protocolo de diferenciación en CPAs **subcutáneas** de ambas dietas. Los datos están normalizados al día -2 de cada dieta. Sc DC= CPAs subcutáneas de animales en dieta control; Sc DAG= CPAs subcutáneas de animales en dieta alta en grasa. n=6. Gráficas muestran error estándar. (*) Significancia respecto al día -2.

Metaloproteasa de matriz 3 (mmp3)

Tanto en CPAs subcutáneas como viscerales, la expresión de *mmp3* siguió el patrón de una curva inversa, con los puntos mas altos al inicio (día -2) y fin (día 7) y el mas bajo a la mitad (día 3) del protocolo de diferenciación. No hubo efecto estadísticamente significativo de la dieta alta en grasa, aunque la expresión de *mmp3* en CPAs subcutáneas fue menor en promedio que en viscerales (Figura 6.4.6).

Proteína relacionada a dickkopf 2 (dkk2)

Tanto en CPAs subcutáneas como viscerales, la expresión de *dkk2*, aunque no significativo, tendió a ser mayor en el grupo de DAG (Figuras 6.4.7 A y C), pero la expresión en las viscerales a una menor escala. La dieta alta en grasa se asoció con un aumento (significativo en el caso de las subcutáneas) del día 2 al 7 (Figuras 6.4.7 B y D).

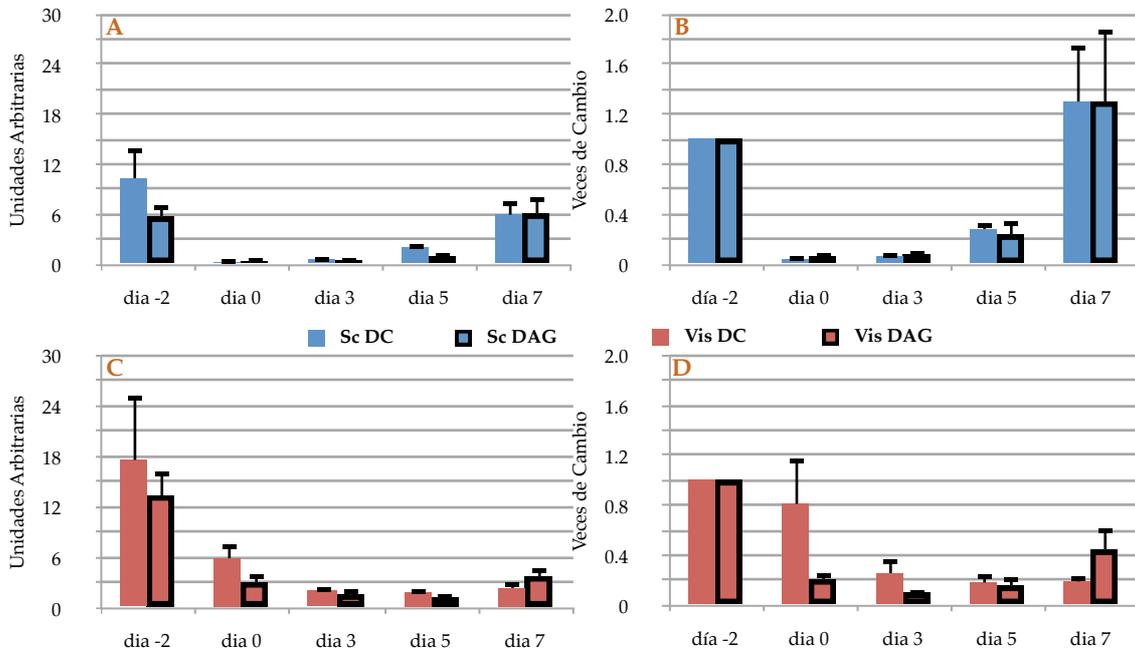


Figura 6.4.6. Efecto de la dieta sobre la expresión de *mmp3*. (A) Expresión de *mmp3* en **unidades arbitrarias** a lo largo del protocolo de diferenciación en CPAs **subcutáneas** de ambas dietas. Datos sin normalizar. (B) **Veces de cambio** en la expresión de *mmp3* a lo largo del protocolo de diferenciación en CPAs **subcutáneas** de ambas dietas. Los datos están normalizados al día -2 de cada dieta. (C) Expresión de *mmp3* en **unidades arbitrarias** a lo largo del protocolo de diferenciación en CPAs **viscerales** de ambas dietas. Datos sin normalizar. (D) **Veces de cambio** en la expresión de *mmp3* a lo largo del protocolo de diferenciación en CPAs **viscerales** de ambas dietas. Los datos están normalizados al día -2 de cada dieta. **Sc DC**= CPAs subcutáneas de animales en dieta control; **Sc DAG**= CPAs subcutáneas de animales en dieta alta en grasa; **Vis DC**= CPAs viscerales de animales en dieta control; **Vis DAG**= CPAs viscerales de animales en dieta alta en grasa. n=6. Gráficas muestran error estándar.

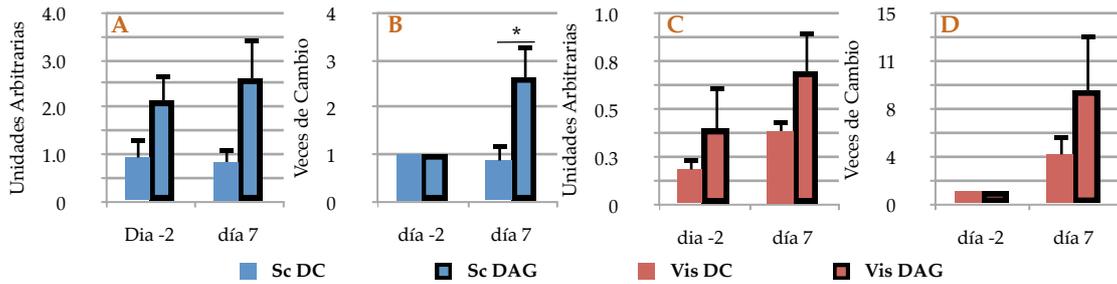


Figura 6.4.7. Efecto de la dieta sobre la expresión de *dkk2*. (A) Expresión de *dkk2* en **unidades arbitrarias** al inicio (día -2) y término (día 7) del protocolo de diferenciación en CPAs **subcutáneas** de ambas dietas. Datos sin normalizar. (B) **Veces de cambio** en la expresión de *dkk2* al inicio (día -2) y término (día 7) del protocolo de diferenciación en CPAs **subcutáneas** de ambas dietas. Los datos están normalizados al día -2 de cada dieta. (C) Expresión de *dkk2* en **unidades arbitrarias** al inicio (día -2) y término (día 7) del protocolo de diferenciación en CPAs **viscerales** de ambas dietas. Datos sin normalizar. (D) **Veces de cambio** en la expresión de *dkk2* al inicio (día -2) y término (día 7) del protocolo de diferenciación en CPAs **viscerales** de ambas dietas. Los datos están normalizados al día -2 de cada dieta. Sc DC= CPAs subcutáneas de animales en dieta control; Sc DAG= CPAs subcutáneas de animales en dieta alta en grasa; Vis DC= CPAs viscerales de animales en dieta control; Vis DAG= CPAs viscerales de animales en dieta alta en grasa. n=6. Gráficas muestran error estándar. (*) Significancia respecto al mismo día.

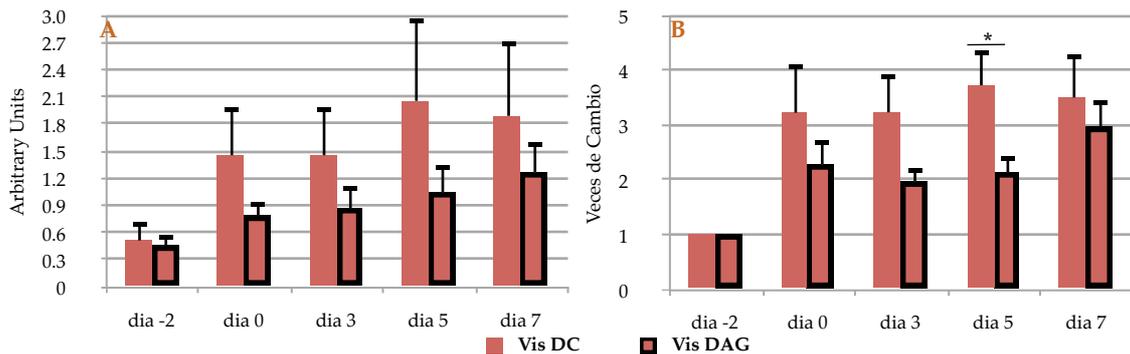


Figura 6.4.8. Efecto de la dieta sobre la expresión de *tcf21*. (A) Expresión de *tcf21* en **unidades arbitrarias** a lo largo del protocolo de diferenciación en CPAs **subcutáneas** de ambas dietas. Datos sin normalizar. (B) **Veces de cambio** en la expresión de *tcf21* a lo largo del protocolo de diferenciación en CPAs **subcutáneas** de ambas dietas. Los datos están normalizados al día -2 de cada dieta. Vis DC= CPAs viscerales de animales en dieta control; Vis DAG= CPAs viscerales de animales en dieta alta en grasa. n=6. Gráficas muestran error estándar. (*) Significancia respecto al mismo día.

Factor de transcripción 21 (tcf21)

En CPAs viscerales, la expresión de *tcf21* fue mayor en condiciones de dieta control, aunque ésta diferencia no resultó significativa (Figura 6.4.8 A). Esta expresión tiende a aumentar con el transcurso del protocolo de diferenciación, siendo el aumento en condiciones de dieta control significativamente mayor el día 5 a la de la dieta alta en grasa (Figura 6.4.8 B). No se evaluó la expresión de *tcf21* en los días 0, 3, y 5 para CPAs subcutáneas ya que la valoración de los días -2 y 7 (Figura 6.3.8) reveló una expresión muy baja o ausente.

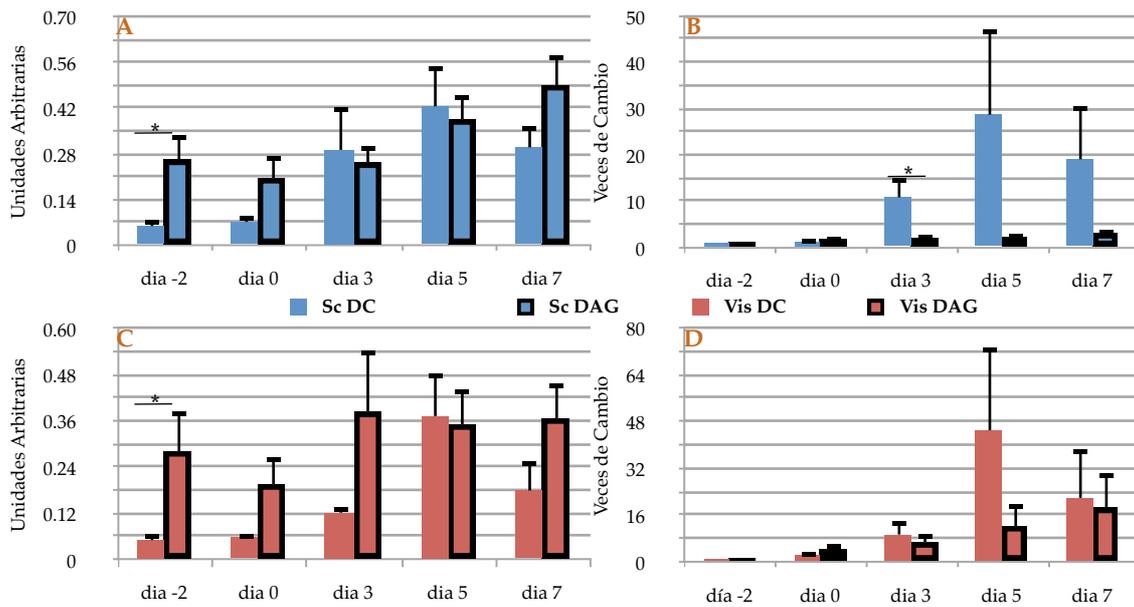


Figura 6.4.9. Efecto de la dieta sobre la expresión de *cdh9*. (A) Expresión de *cdh9* en unidades arbitrarias a lo largo del protocolo de diferenciación en CPAs subcutáneas de ambas dietas. Datos sin normalizar. (B) Veces de cambio en la expresión de *cdh9* a lo largo del protocolo de diferenciación en CPAs subcutáneas de ambas dietas. Los datos están normalizados al día -2 de cada dieta. (C) Expresión de *cdh9* en unidades arbitrarias a lo largo del protocolo de diferenciación en CPAs viscerales de ambas dietas. Datos sin normalizar. (D) Veces de cambio en la expresión de *cdh9* a lo largo del protocolo de diferenciación en CPAs viscerales de ambas dietas. Los datos están normalizados al día -2 de cada dieta. Sc DC= CPAs subcutáneas de animales en dieta control; Sc DAG= CPAs subcutáneas de animales en dieta alta en grasa; Vis DC= CPAs viscerales de animales en dieta control; Vis DAG= CPAs viscerales de animales en dieta alta en grasa. n=6. Gráficas muestran error estándar. (*) Significancia respecto al mismo día.

Caderina 9 (*cdh9*)

En CPAs viscerales y subcutáneas, la expresión basal (día -2) de *cdh9* es significativamente mayor (5 y 3 veces, respectivamente) en condiciones de dieta alta en grasa (Figuras 6.4.9 A y C). La expresión de *cdh9* en el grupo de dieta alta en grasa se mantiene al mismo alto nivel durante toda la diferenciación, mientras que en el grupo de dieta control aumenta aproximadamente 40 veces alcanzando una expresión similar a la del grupo DAG al día 5 y disminuyendo al día 7 (Figuras 6.4.9 B y D). Sin embargo, debido a la variabilidad entre cultivos, estas diferencias en el aumento de expresión no alcanzan la significancia estadística, salvo al día 3 en CPAs subcutáneas (Figura 6.4.9 B).

Factor de crecimiento endotelial vascular c (vegfc)

La expresión de vegfc al día -2 tiende a ser mayor en el grupo de dieta control, aunque esta tendencia resulta significativa solo en CPAs viscerales (Figuras 6.4.10 A y C). Interesantemente, esta sobreexpresión presente solo con DC coincide con un aumento de casi el doble en la expresión de vegfc al día 5 y 7 y un mayor pico alcanzado en CPAs del mismo grupo (Figura 6.4.10 D). En CPAs subcutáneas, donde la diferencia en expresión al día -2 no fue significativo, no se observaron estos cambios (Figuras 6.4.10 A y B).

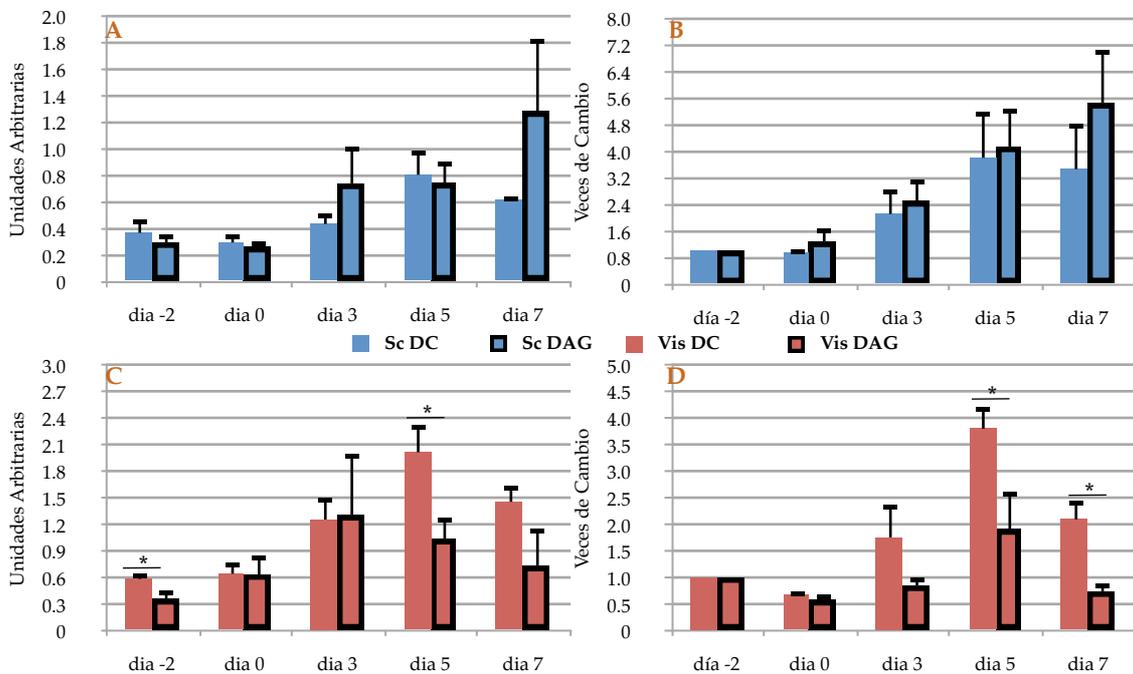


Figura 6.4.10. Efecto de la dieta sobre la expresión de vegfc. (A) Expresión de vegfc en **unidades arbitrarias** a lo largo del protocolo de diferenciación en CPAs **subcutáneas** de ambas dietas. Datos sin normalizar. (B) **Veces de cambio** en la expresión de vegfc a lo largo del protocolo de diferenciación en CPAs **subcutáneas** de ambas dietas. Los datos están normalizados al día -2 de cada dieta. (C) Expresión de vegfc en **unidades arbitrarias** a lo largo del protocolo de diferenciación en CPAs **viscerales** de ambas dietas. Datos sin normalizar. (D) **Veces de cambio** en la expresión de vegfc a lo largo del protocolo de diferenciación en CPAs **viscerales** de ambas dietas. Los datos están normalizados al día -2 de cada dieta. **Sc DC**= CPAs subcutáneas de animales en dieta control; **Sc DAG**= CPAs subcutáneas de animales en dieta alta en grasa; **Vis DC**= CPAs viscerales de animales en dieta control; **Vis DAG**= CPAs viscerales de animales en dieta alta en grasa. n=6. Gráficas muestran error estándar. (*) Significancia respecto al mismo día.

7.

Discusión

En el presente trabajo se evaluó la regulación de distintos genes que se expresan de manera diferencial entre las células precursoras de adipocitos (CPAs) viscerales y subcutáneas durante su diferenciación a adipocitos y el efecto de una dieta alta en grasa (DAG) o control (DC) sobre ésta. Para ello, se utilizó el modelo de obesidad inducido por una DAG en ratones machos. Éste modelo, aunque no generó un cambio en el peso total de los animales, generó aumentos significativos en la acumulación de grasa visceral y subcutánea y alteraciones en la regulación de la glucosa en sangre, lo que validó el modelo.

Diferencias en la morfología y capacidad adipogénica por efecto del tejido de origen y la dieta

Las CPAs subcutáneas provenientes de animales alimentados con dieta control (Sc DC) exhibieron la mayor diferenciación evidenciada por acumulación lipídica y expresión del regulador adipogénico *ppar γ* , seguidas por las CPAs subcutáneas provenientes de animales alimentados por dieta alta en grasa (Sc DAG). Consistente con otro estudio (Isakson *et al.*, 2009), además de disminuir la diferenciación en CPAs subcutáneas la DAG se asoció con gotas de grasa mas grandes. Esto resulta de gran interés, ya que ya ha sido descrita la correlación positiva que existe entre el tamaño de un adipocito y sus depósitos grasos con la secreción de adipocinas proinflamatorias, inflamación sistémica y resistencia a la insulina (Salans *et al.*, 1968; Smith, 1970; Salans and Dougherty, 1971; Smith, 1971; Jernas *et al.*, 2006) que caracteriza al síndrome metabólico.

Interesantemente, en las células viscerales, la DAG tuvo el efecto de disminuir el número de células diferenciadas, sin embargo, el tamaño de sus gotas de grasa no fue aparentemente distinto con la DC. Esto podría indicar que la mayor acumulación de grasa ante el reto de una DAG en CPAs subcutáneas es un mecanismo compensatorio que no está presente en CPAs viscerales. Las CPAs viscerales exhibieron menor número de células diferenciadas y menor expresión de *ppar γ* que las subcutáneas. En células viscerales la DAG también disminuyó el número de células diferenciadas, sin embargo la expresión de *ppar γ* no fue significativamente distinta entre dietas. Una posible explicación de la expresión de *ppar γ* sin aparente diferenciación, es que la expresión de *ppar γ* no sea suficiente para propiciar la diferenciación en CPAs viscerales dado que, aunque se ha documentado extensamente que *ppar γ* es necesario para la adipogénesis (Kubota *et al.*, 1999; Rosen *et al.*, 1999; Rosen *et al.*, 2000), hasta la fecha ningún estudio ha demostrado en CPAs viscerales primarias que este estímulo sea suficiente. Alternativamente, podría ser que las CPAs viscerales de DAG estén diferenciadas pero su acumulación lipídica esté inhibida. Para comprobar esto último, sería necesario medir

la expresión de genes de diferenciación terminal como leptina, transportador de glucosa 4 y sintasa de ácidos grasos.

Diferencias en la expresión de genes diferenciales entre tejidos por efecto de la dieta

De los resultados de un micro-arreglo previo realizado en CPAs subcutáneas y viscerales en dieta control, donde se identificaron varios genes con expresión diferencial entre tejidos (Macotela *et al.*, 2012), se seleccionaron 9 genes que por diversas razones resultaron de interés. De acuerdo a este estudio, la expresión de los genes *hp*, *agt*, *fndc5*, *tcf21* y *vegfc* fue mayor en CPAs viscerales y la expresión de *lxh8*, *mmp3*, *dkk2* y *cdh9* fue mayor en subcutáneas. En el presente estudio se comprobaron estas observaciones salvo en el caso de *mmp3* y *cdh9* donde no se observaron diferencias entre tejidos al día -2. A continuación se discutirán los resultados observados para cada gen.

Haptoglobina

La haptoglobina (*hp*) es una adipocina conocida por su participación en la etapa aguda de inflamación y de acuerdo con un estudio realizado en una línea celular de CPAs humanas, su expresión disminuye ante el tratamiento con TNF-alfa durante la diferenciación *in vitro* (Wang *et al.*, 2005). En el presente trabajo, la DAG se asoció con menor expresión de *hp* durante la diferenciación en ambos tejidos e interesantemente, se observó que a mayor expresión de *hp* al día -2 (por efecto de la DAG o el tejido), menor expresión el resto de los días. Dado que los niveles de TNF-alfa aumentan en modelos de obesidad inducida por una DAG en roedores (Hotamisligil *et al.*, 1993), el efecto inhibitorio de la DAG sobre expresión de *hp* alcanzada podría estar mediado de manera negativa por TNF-alfa.

Angiotensinógeno

El angiotensinógeno (*agt*) es el precursor inactivo de la angiotensina, y forma parte del sistema renina-angiotensina (RAS) el cual está implicado en la regulación de la presión sanguínea y el desarrollo de la hipertensión arterial (HTA) (Matsushita *et al.*, 2006). El RAS podría tener una función importante en el tejido adiposo, ya que los adipocitos expresan todos los componentes del RAS (Engeli *et al.*, 2000) y el bloqueo de la expresión de angiotensinógeno inhibe la diferenciación *in vitro* de CPAs viscerales humanas (Ye *et al.*, 2010). En el presente estudio, las CPAs subcutáneas exhibieron una expresión de *agt* 4 veces mayor a las viscerales posiblemente impactando que éstas se hayan diferenciado más. El efecto de la DAG, mas evidente en CPAs subcutáneas que viscerales por su elevada expresión, resultó en una inhibición significativa de las veces de aumento en la expresión de *agt*. Sin embargo, a pesar de la dieta, la expresión de *agt* en CPAs

subcutáneas fue aproximadamente el doble que la de las viscerales. La expresión en CPAs viscerales permaneció baja sin diferencias entre dietas. Estos datos podrían sugerir que las CPAs subcutáneas pero no las viscerales, son capaces de contrarrestar el efecto antiadipogénico de la DAG en cuanto a la expresión de agt.

Fibronectina 5 con dominio tipo III

La Fibronectina 5 con dominio tipo III (*fn5*) es una proteína de membrana tipo 1 que contiene 209 aminoácidos, y su bloqueo disminuye significativamente la diferenciación de células madre murinas a neuronas (Hashemi *et al.*, 2013). En el presente estudio, *fn5* aumentó al día 7 en CPAs viscerales y subcutáneas sin diferencias significativas entre tejidos ni dietas, indicando una posible participación de este gen en el proceso de diferenciación. Recientemente se descubrió que la proteína *fn5* en miocitos se corta en la nueva hormona “irisina” en respuesta al ejercicio y produce el cambio del tejido adiposo blanco subcutáneo a beige mejorando la sensibilidad a la insulina en ratones (Bostrom *et al.*, 2012) y en humanos, la expresión de *fn5* en tejido adiposo blanco subcutáneo y visceral se correlaciona negativamente con la obesidad (Moreno-Navarrete *et al.*, 2013). Sin embargo, en el presente estudio no se observaron diferencias significativas en la expresión de *fn5* por el efecto de la DAG.

LIM homeobox 8

El gen LIM homeobox 8 (*lh8*) está involucrado en determinar la localización ventral o lateral de células madre murinas durante la diferenciación (Nat *et al.*, 2012). Por esta razón, su expresión se asocia con la localización del depósito y es preferencial en tejidos adiposos con capacidad termogénica como el tejido adiposo café y el beige (Walden *et al.*, 2012). Resultó de interés para esta tesis, por ser identificado como el gen con mayor expresión en CPAs subcutáneas y menor en viscerales (Macotela *et al.*, 2012). En oocitos murinos se considera esencial en la diferenciación y supervivencia de ellos (Choi *et al.*, 2008) y sugiere que esté involucrado en brindarle a las CPAs subcutáneas su capacidad adipogénica superior. En el presente estudio *lh8* se expresó significativamente más en CPAs subcutáneas que viscerales y aumentó significativamente con la diferenciación sugiriendo su participación en este proceso. La DAG resultó en una expresión menor de *lh8* durante la diferenciación pero estas diferencias no resultaron significativas. De acuerdo a estos resultados, el gen *lh8* aún ofrece una atractiva avenida para el estudio de factores responsables por diferencias en la capacidad adipogénica de cada tejido adiposo y se requieren estudios que lo bloqueen y/o sobre-expresen para aclarar su función.

Metaloproteasa de matriz 3

La metaloproteasa de matriz 3 (mmp3) es una proteasa dependiente de zinc responsable de la degradación de una gran variedad de componentes de la matriz extracelular (Ogata *et al.*, 1992) e implicada en la remodelación del tejido adiposo, indispensable para su expansión durante la obesidad (Ogata *et al.*, 1992). Se ha reportado que la expresión de mmp3 en el tejido adiposo se correlaciona negativamente con la obesidad (Traurig *et al.*, 2006), y en el presente estudio, la DAG se asoció con una disminución, aunque no significativa, en la expresión de mmp3 (día -2). La expresión de mmp3 fue menor en adipocitos viscerales diferenciados que en CPAs del mismo tejido, lo cual es consistente con la literatura (O'Hara *et al.*, 2009), sin embargo el presente trabajo muestra que esto no es el caso en células subcutáneas, donde la expresión de mmp3 se mantiene aún tras la diferenciación. Dado que en adipocitos 3T3-L1, el bloqueo de mmp3 resultó en inhibición de la diferenciación (Unoki *et al.*, 2006), la continua expresión de mmp3 en adipocitos maduros subcutáneos podría ser causa o consecuencia de una mejor capacidad proliferativa.

Proteína relacionada a dikkopf 2

El gen que codifica la proteína relacionada a dikkopf 2 (dkk2) tiene una función proadipogénica y ha sido identificado previamente como un gen preferencialmente expresado en CPAs subcutáneas (Macotela *et al.*, 2012). En el actual trabajo, se confirmó su expresión preferencial en CPAs subcutáneas mediante qRT-PCR. No se observaron cambios significativos ante la diferenciación en ninguno de los grupos excepto en CPAs viscerales de DC cuya aumento significativo correlaciona con la diferenciación. La DAG aumentó la expresión de dkk2 en CPAs de ambos tejidos (aunque solo resultó significativo en el caso de las subcutáneas), pudiendo indicar su función como mecanismo compensatorio por los efectos antiadipogénicos de la DAG aunque más estudios se requieren para clarificarlo.

Factor de transcripción 21

Se conoce poco del gen que codifica al factor de transcripción 21 (tcf21), y generó interés para la presente tesis por expresarse preferencialmente en CPAs del tejido adiposo visceral epididimal (Macotela *et al.*, 2012; Walden *et al.*, 2012). En el presente trabajo se confirmó esta expresión preferencial y se asoció la DAG con una disminución en su expresión no significativa pero consistente entre todos los días. De acuerdo a la literatura, tcf21 regula positivamente a BMP4 (factor de compromiso de CMM a CPAs) (Quaggin *et al.*, 1999) lo cual podría explicar por lo menos en parte la correlación entre su baja expresión y la baja diferenciación observada en CPAs Vis DAG.

Caderina 9

El papel de las caderinas en el tejido adiposo se conoce poco. Las caderinas forman parte de una gran familia de receptores de adhesión celular multifuncionales que participan en el desarrollo embrionario y en el mantenimiento de la estructura tisular (Takeichi, 1995; Wheelock and Johnson, 2003; Gumbiner, 2005). Hasta la fecha, la función de la caderina 9 (cdh9) solo ha sido descrita en el cerebro (Shimoyama *et al.*, 2000) y en el riñón (Thedieck *et al.*, 2007), en el último funcionando como marcador de superficie de un tipo particular de fibroblastos mesenquimales. La cdh9 generó interés para el presente trabajo por su identificación como un gen de expresión diferencial entre CPAs subcutáneas y viscerales (Macotela *et al.*, 2012), sin embargo en este trabajo no se observaron estas diferencias previo a la inducción de diferenciación. Una vez completada la diferenciación (día 7), la expresión de cdh9 aumentó significativamente en CPAs subcutáneas pero no en viscerales y la DAG se asoció con una sobre-expresión del gen al día -2. El hecho de que su sobre-expresión se asocie con la DAG, podría indicar una participación en mecanismos compensatorios por ésta aunque más estudios se requieren para clarificarlo.

Factor de crecimiento endotelial vascular c

El factor de crecimiento endotelial vascular c (vegfc) es un gen asociado con la generación de tejido linfático en varios órganos incluyendo el tejido adiposo (Yan *et al.*, 2011) y sus concentraciones en sangre se correlacionan positivamente con la obesidad (Silha *et al.*, 2005). El tratamiento de animales obesos con factores antiangiogénicos ha resultado en la reducción del tejido adiposo de forma dosis-dependiente lo cual sugiere que la regulación de la vasculatura del tejido adiposo es un componente importante de la obesidad (Rupnick *et al.*, 2002). La expresión de vegfc fue significativamente mayor en CPAs viscerales que en subcutáneas bajo DC, sin embargo, la DAG aumentó la expresión en CPAs subcutáneas, asemejándolas a viscerales. En CPAs viscerales la DAG tuvo el efecto opuesto, disminuyendo su expresión. Basado en lo anterior, la expresión de vegfc se comporta distinta entre tejidos y su función podría ser la de compensación por el efecto anti-adipogénico de la DAG, el cual está presente en CPAs subcutáneas, pero no viscerales.

En conclusión, el presente trabajo proporciona evidencia de que la dieta alta en grasa por sí sola es capaz de modificar la expresión de una variedad de genes del tejido adiposo con funciones muy variadas lo cual podría resultar en consecuencias negativas sobre su funcionalidad y la salud del sujeto. Estos cambios, que podrían ser mecanismos compensatorios por el efecto anti-adipogénico de la DAG, fueron más evidentes en células subcutáneas, sugiriendo que éstas tienen mayor capacidad adaptativa que

las viscerales lo cual podría en parte explicar la diferencia entre riesgos atribuíos a cada tejido. Se requieren más estudios para precisar la importancia y función de estos cambios.

8. Literatura Citada

- Algire, C., D. Medrikova and S. Herzig, 2012. White and brown adipose stem cells: From signaling to clinical implications. *Biochim Biophys Acta*.
- Bays, H., 2005. Adiposopathy, metabolic syndrome, quantum physics, general relativity, chaos and the theory of everything. *Expert Rev Cardiovasc Ther*, 3(3): 393-404.
- Bays, H., 2005. Adiposopathy: Role of adipocyte factors in a new paradigm. *Expert Rev Cardiovasc Ther*, 3(2): 187-189.
- Bays, H.E., J.M. Gonzalez-Campoy, G.A. Bray, A.E. Kitabchi, D.A. Bergman, A.B. Schorr, H.W. Rodbard and R.R. Henry, 2008. Pathogenic potential of adipose tissue and metabolic consequences of adipocyte hypertrophy and increased visceral adiposity. *Expert Rev Cardiovasc Ther*, 6(3): 343-368.
- Bostrom, P., J. Wu, M.P. Jedrychowski, A. Korde, L. Ye, J.C. Lo, K.A. Rasbach, E.A. Bostrom, J.H. Choi, J.Z. Long, S. Kajimura, M.C. Zingaretti, B.F. Vind, H. Tu, S. Cinti, K. Hojlund, S.P. Gygi and B.M. Spiegelman, 2012. A pgc1-alpha-dependent myokine that drives brown-fat-like development of white fat and thermogenesis. *Nature*, 481(7382): 463-468.
- Cantile, M., A. Procino, M. D'Armiento, L. Cindolo and C. Cillo, 2003. Hox gene network is involved in the transcriptional regulation of in vivo human adipogenesis. *J Cell Physiol*, 194(2): 225-236.
- Choi, Y., D.J. Ballow, Y. Xin and A. Rajkovic, 2008. Lim homeobox gene, *lhx8*, is essential for mouse oocyte differentiation and survival. *Biol Reprod*, 79(3): 442-449.
- Cristancho, A.G. and M.A. Lazar, 2011. Forming functional fat: A growing understanding of adipocyte differentiation. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 12(11): 722-734.
- Cypess, A.M., S. Lehman, G. Williams, I. Tal, D. Rodman, A.B. Goldfine, F.C. Kuo, E.L. Palmer, Y.H. Tseng, A. Doria, G.M. Kolodny and C.R. Kahn, 2009. Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans. *N Engl J Med*, 360(15): 1509-1517.
- de Jongh, R.T., E.H. Serne, R.G. Ijzerman, G. de Vries and C.D. Stehouwer, 2004. Free fatty acid levels modulate microvascular function: Relevance for obesity-associated insulin resistance, hypertension, and microangiopathy. *Diabetes*, 53(11): 2873-2882.
- Engeli, S., R. Negrel and A.M. Sharma, 2000. Physiology and pathophysiology of the adipose tissue renin-angiotensin system. *Hypertension*, 35(6): 1270-1277.
- ENSANUT, 2012. Secretaría de Salud de México.
- Gesta, S., M. Bluher, Y. Yamamoto, A.W. Norris, J. Berndt, S. Kralisch, J. Boucher, C. Lewis and C.R. Kahn, 2006. Evidence for a role of developmental genes in the origin of obesity and body fat distribution. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(17): 6676-6681.
- Gumbiner, B.M., 2005. Regulation of cadherin-mediated adhesion in morphogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 6(8): 622-634.
- Hashemi, M.S., K. Ghaedi, A. Salamian, K. Karbalaie, M. Emadi-Baygi, S. Tanhaei, M.H. Nasr-Esfahani and H. Baharvand, 2013. *Fndc5* knockdown significantly decreased neural differentiation rate of mouse embryonic stem cells. *Neuroscience*, 231: 296-304.

- Hirsch, J. and P.W. Han, 1969. Cellularity of rat adipose tissue: Effects of growth, starvation, and obesity. *J Lipid Res*, 10(1): 77-82.
- Hotamisligil, G.S., N.S. Shargill and B.M. Spiegelman, 1993. Adipose expression of tumor necrosis factor- α : Direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science*, 259(5091): 87-91.
- Ibrahim, M.M., 2010. Subcutaneous and visceral adipose tissue: Structural and functional differences. *Obes Rev*, 11(1): 11-18.
- Isakson, P., A. Hammarstedt, B. Gustafson and U. Smith, 2009. Impaired preadipocyte differentiation in human abdominal obesity: Role of wnt, tumor necrosis factor- α , and inflammation. *Diabetes*, 58(7): 1550-1557.
- Jensen, M.D., 2006. Is visceral fat involved in the pathogenesis of the metabolic syndrome? Human model. *Obesity (Silver Spring)*, 14 Suppl 1: 20S-24S.
- Jernas, M., J. Palming, K. Sjoholm, E. Jennische, P.A. Svensson, B.G. Gabrielsson, M. Levin, A. Sjogren, M. Rudemo, T.C. Lystig, B. Carlsson, L.M. Carlsson and M. Lonn, 2006. Separation of human adipocytes by size: Hypertrophic fat cells display distinct gene expression. *FASEB J*, 20(9): 1540-1542.
- Kirtland, J. and P.M. Harris, 1980. Changes in adipose tissue of the rat due early undernutrition followed by rehabilitation. 3. Changes in cell replication studied with tritiated thymidine. *Br J Nutr*, 43(1): 33-43.
- Kubota, N., Y. Terauchi, H. Miki, H. Tamemoto, T. Yamauchi, K. Komeda, S. Satoh, R. Nakano, C. Ishii, T. Sugiyama, K. Eto, Y. Tsubamoto, A. Okuno, K. Murakami, H. Sekihara, G. Hasegawa, M. Naito, Y. Toyoshima, S. Tanaka, K. Shiota, T. Kitamura, T. Fujita, O. Ezaki, S. Aizawa, T. Kadowaki and et al., 1999. Ppar gamma mediates high-fat diet-induced adipocyte hypertrophy and insulin resistance. *Mol Cell*, 4(4): 597-609.
- Lebovitz, H.E. and M.A. Banerji, 2005. Point: Visceral adiposity is causally related to insulin resistance. *Diabetes Care*, 28(9): 2322-2325.
- Lemieux, S., D. Prud'homme, C. Bouchard, A. Tremblay and J.P. Despres, 1993. Sex differences in the relation of visceral adipose tissue accumulation to total body fatness. *Am J Clin Nutr*, 58(4): 463-467.
- MacDougald, O.A. and S. Mandrup, 2002. Adipogenesis: Forces that tip the scales. *Trends Endocrinol Metab*, 13(1): 5-11.
- Macotela, Y., B. Emanuelli, M.A. Mori, S. Gesta, T.J. Schulz, Y.H. Tseng and C.R. Kahn, 2012. Intrinsic differences in adipocyte precursor cells from different white fat depots. *Diabetes*, 61(7): 1691-1699.
- Matsushita, K., Y. Wu, Y. Okamoto, R.E. Pratt and V.J. Dzau, 2006. Local renin angiotensin expression regulates human mesenchymal stem cell differentiation to adipocytes. *Hypertension*, 48(6): 1095-1102.
- Moreno-Navarrete, J.M., F. Ortega, M. Serrano, E. Guerra, G. Pardo, F. Tinahones, W. Ricart and J. Manuel-Fernandez-Real, 2013. Irisin is expressed and produced by human muscle and adipose tissue in association with obesity and insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metab*.
- Nat, R., A. Salti, L. Suci, S. Strom and G. Dechant, 2012. Pharmacological modulation of the hedgehog pathway differentially affects dorsal/ventral patterning in mouse and human embryonic stem cell models of telencephalic development. *Stem Cells Dev*, 21(7): 1016-1046.

- O'Hara, A., F.L. Lim, D.J. Mazzatti and P. Trayhurn, 2009. Microarray analysis identifies matrix metalloproteinases (mmps) as key genes whose expression is up-regulated in human adipocytes by macrophage-conditioned medium. *Pflugers Arch*, 458(6): 1103-1114.
- Ogata, Y., J.J. Enghild and H. Nagase, 1992. Matrix metalloproteinase 3 (stromelysin) activates the precursor for the human matrix metalloproteinase 9. *J Biol Chem*, 267(6): 3581-3584.
- Olaiz-Fernandez, G., Rivera-Dommarco, J., Shamah-Levy, T., Rojas, R., Villalpando-Hernández, S., Hernández-Ávila, M., 2006. Encuesta nacional de salud y nutrición. Instituto Nacional de Salud Pública, Cuernavaca, México.
- OMS, 2012. *Obesidad y sobrepeso*.
- Quaggin, S.E., L. Schwartz, S. Cui, P. Igarashi, J. Deimling, M. Post and J. Rossant, 1999. The basic-helix-loop-helix protein pod1 is critically important for kidney and lung organogenesis. *Development*, 126(24): 5771-5783.
- Rosen, E.D. and O.A. MacDougald, 2006. Adipocyte differentiation from the inside out. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 7(12): 885-896.
- Rosen, E.D., P. Sarraf, A.E. Troy, G. Bradwin, K. Moore, D.S. Milstone, B.M. Spiegelman and R.M. Mortensen, 1999. Ppar gamma is required for the differentiation of adipose tissue in vivo and in vitro. *Mol Cell*, 4(4): 611-617.
- Rosen, E.D. and B.M. Spiegelman, 2006. Adipocytes as regulators of energy balance and glucose homeostasis. *Nature*, 444(7121): 847-853.
- Rosen, E.D., C.J. Walkey, P. Puigserver and B.M. Spiegelman, 2000. Transcriptional regulation of adipogenesis. *Genes Dev*, 14(11): 1293-1307.
- Rupnick, M.A., D. Panigrahy, C.Y. Zhang, S.M. Dallabrida, B.B. Lowell, R. Langer and M.J. Folkman, 2002. Adipose tissue mass can be regulated through the vasculature. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(16): 10730-10735.
- Salans, L.B. and J.W. Dougherty, 1971. The effect of insulin upon glucose metabolism by adipose cells of different size. Influence of cell lipid and protein content, age, and nutritional state. *J Clin Invest*, 50(7): 1399-1410.
- Salans, L.B., J.L. Knittle and J. Hirsch, 1968. The role of adipose cell size and adipose tissue insulin sensitivity in the carbohydrate intolerance of human obesity. *J Clin Invest*, 47(1): 153-165.
- Schulz, L.O., P.H. Bennett, E. Ravussin, J.R. Kidd, K.K. Kidd, J. Esparza and M.E. Valencia, 2006. Effects of traditional and western environments on prevalence of type 2 diabetes in pima indians in mexico and the u.S. *Diabetes Care*, 29(8): 1866-1871.
- Shimoyama, Y., G. Tsujimoto, M. Kitajima and M. Natori, 2000. Identification of three human type-ii classic cadherins and frequent heterophilic interactions between different subclasses of type-ii classic cadherins. *Biochem J*, 349(Pt 1): 159-167.
- Silha, J.V., M. Krsek, P. Sucharda and L.J. Murphy, 2005. Angiogenic factors are elevated in overweight and obese individuals. *Int J Obes (Lond)*, 29(11): 1308-1314.
- Smith, U., 1970. Insulin responsiveness and lipid synthesis in human fat cells of different sizes: Effect of the incubation medium. *Biochim Biophys Acta*, 218(3): 417-423.

- Smith, U., 1971. Effect of cell size on lipid synthesis by human adipose tissue in vitro. *J Lipid Res*, 12(1): 65-70.
- Spalding, K.L., E. Arner, P.O. Westermark, S. Bernard, B.A. Buchholz, O. Bergmann, L. Blomqvist, J. Hoffstedt, E. Naslund, T. Britton, H. Concha, M. Hassan, M. Ryden, J. Frisen and P. Arner, 2008. Dynamics of fat cell turnover in humans. *Nature*, 453(7196): 783-787.
- Takeichi, M., 1995. Morphogenetic roles of classic cadherins. *Curr Opin Cell Biol*, 7(5): 619-627.
- Tang, W., D. Zeve, J.M. Suh, D. Bosnakovski, M. Kyba, R.E. Hammer, M.D. Tallquist and J.M. Graff, 2008. White fat progenitor cells reside in the adipose vasculature. *Science*, 322(5901): 583-586.
- Tchkonia, T., M. Lenburg, T. Thomou, N. Giorgadze, G. Frampton, T. Pirtskhalava, A. Cartwright, M. Cartwright, J. Flanagan, I. Karagiannides, N. Gerry, R.A. Forse, Y. Tchoukalova, M.D. Jensen, C. Pothoulakis and J.L. Kirkland, 2007. Identification of depot-specific human fat cell progenitors through distinct expression profiles and developmental gene patterns. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 292(1): E298-307.
- Tchoukalova, Y.D., C. Koutsari, S.B. Votruba, T. Tchkonia, N. Giorgadze, T. Thomou, J.L. Kirkland and M.D. Jensen, 2010. Sex- and depot-dependent differences in adipogenesis in normal-weight humans. *Obesity (Silver Spring)*, 18(10): 1875-1880.
- Thedieck, C., H. Kalbacher, M. Kuczyk, G.A. Muller, C.A. Muller and G. Klein, 2007. Cadherin-9 is a novel cell surface marker for the heterogeneous pool of renal fibroblasts. *PLoS One*, 2(7): e657.
- Traurig, M.T., P.A. Permana, S. Nair, S. Kobes, C. Bogardus and L.J. Baier, 2006. Differential expression of matrix metalloproteinase 3 (mmp3) in preadipocytes/stromal vascular cells from nonobese nondiabetic versus obese nondiabetic pima indians. *Diabetes*, 55(11): 3160-3165.
- Unoki, H., H. Bujo, M. Shibasaki and Y. Saito, 2006. Increased matrix metalloproteinase-3 mrna expression in visceral fat in mice implanted with cultured preadipocytes. *Biochem Biophys Res Commun*, 350(2): 392-398.
- Wajchenberg, B.L., D. Giannella-Neto, M.E. da Silva and R.F. Santos, 2002. Depot-specific hormonal characteristics of subcutaneous and visceral adipose tissue and their relation to the metabolic syndrome. *Horm Metab Res*, 34(11-12): 616-621.
- Walden, T.B., I.R. Hansen, J.A. Timmons, B. Cannon and J. Nedergaard, 2012. Recruited vs. Nonrecruited molecular signatures of brown, "brite," and white adipose tissues. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 302(1): E19-31.
- Wang, B., J.R. Jenkins and P. Trayhurn, 2005. Expression and secretion of inflammation-related adipokines by human adipocytes differentiated in culture: Integrated response to tnf-alpha. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 288(4): E731-740.
- Weyer, C., J.E. Foley, C. Bogardus, P.A. Tataranni and R.E. Pratley, 2000. Enlarged subcutaneous abdominal adipocyte size, but not obesity itself, predicts type ii diabetes independent of insulin resistance. *Diabetologia*, 43(12): 1498-1506.
- Wheelock, M.J. and K.R. Johnson, 2003. Cadherins as modulators of cellular phenotype. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 19: 207-235.

- Wu, J., P. Bostrom, L.M. Sparks, L. Ye, J.H. Choi, A.H. Giang, M. Khandekar, K.A. Virtanen, P. Nuutila, G. Schaart, K. Huang, H. Tu, W.D. van Marken Lichtenbelt, J. Hoeks, S. Enerback, P. Schrauwen and B.M. Spiegelman, 2012. Beige adipocytes are a distinct type of thermogenic fat cell in mouse and human. *Cell*, 150(2): 366-376.
- Yamamoto, Y., S. Gesta, K.Y. Lee, T.T. Tran, P. Saaditirad and C.R. Kahn, 2010. Adipose depots possess unique developmental gene signatures. *Obesity (Silver Spring)*, 18(5): 872-878.
- Yan, A., T. Avraham, J.C. Zampell, Y.S. Haviv, E. Weitman and B.J. Mehrara, 2011. Adipose-derived stem cells promote lymphangiogenesis in response to vegf-c stimulation or tgf-beta1 inhibition. *Future Oncol*, 7(12): 1457-1473.
- Ye, Z.W., X.M. Wu and J.G. Jiang, 2010. Knockdown of angiotensinogen by shrna-mediated rna interference inhibits human visceral preadipocytes differentiation. *Int J Obes (Lond)*, 34(1): 157-164.
- Zeve, D., W. Tang and J. Graff, 2009. Fighting fat with fat: The expanding field of adipose stem cells. *Cell Stem Cell*, 5(5): 472-481.