



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS  
FACULTAD DE MEDICINA

**EL PAPEL DE TIMP4 EN LA ADIPOGÉNESIS**

**T E S I S**

QUE PARA OPTAR AL GRADO DE:  
DOCTOR EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

PRESENTA:  
LUZ MARIA DEL CONSUELO MEJIA CRISTOBAL

JORGE MELENDEZ ZAJGLA  
FACULTAD DE MEDICINA

GLORIA SOLDEVILA MELGAREJO  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS

MAHARA VALVERDE RAMIREZ  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS

Ciudad Universitaria, Cd. Mx. Septiembre 2016



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Genómica Funcional del Cáncer del Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN), bajo la dirección del Dr. Jorge Meléndez Zajgla.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: DR. CARLOS ROSALES LEDEZMA

SECRETARIO: DR. JORGE MELENDEZ ZAJGLA

VOCAL: DRA. MARICELA LUNA MUÑOZ

VOCAL: DRA. YAZMIN MACOTELA GUZMAN

VOCAL: DR. ALFREDO VARELA ECHAVARRIA

Le agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por haberme otorgado una beca con el número de registro 171568 durante la realización de mis estudios de Doctorado en Ciencias Biomédicas en la Universidad Nacional Autónoma de México.

## AGRADECIMIENTOS

A mi comité tutorial integrado por:

- Dr. Jorge Meléndez Zajgla, por permitirme desarrollar este proyecto de investigación.
- Dra. Mahara Valverde Ramírez y
- Dra. Gloria Soldevila Melgarejo por su apoyo y consejos.

A todos los miembros del laboratorio por sus ideas y ayuda, en especial a:

- Dra. Floria Lizárraga,
- Dra. Vilma Maldonado Lagunas,
- Dra. Magali Espinosa,
- Dra. Gisela Ceballos
- cDr. Sergio Garay Sánchez

A todos ustedes muchas gracias...

## INDICE

|   |           |
|---|-----------|
| <b>ABREVIATURAS.....</b>  | <b>1</b>  |
| <b>LISTA DE TABLAS FIGURAS.....</b>                                 | <b>3</b>  |
| <b>RESUMEN.....</b>   | <b>5</b>  |
| <b>ABSTRACT.....</b>  | <b>6</b>  |
| <b>INTRODUCCION.....</b>  | <b>7</b>  |
| • <i>Adipogénesis.....</i>  | <i>7</i>  |
| • <i>Etapas de la adipogénesis.....</i>                             | <i>8</i>  |
| <i>Determinación.....</i>   | <i>8</i>  |
| <i>Diferenciación terminal.....</i>                                 | <i>10</i> |
| • <i>Cascada transcripcional en la diferenciación terminal.....</i> | <i>10</i> |
| • <i>Familia PPARs.....</i>   | <i>12</i> |
| <i>PPAR<math>\gamma</math>.....</i>                                 | <i>12</i> |
| • <i>Familia C/EBPs.....</i>  | <i>14</i> |
| • <i>NF-<math>\kappa</math>B.....</i>                               | <i>16</i> |

|   |    |
|---|----|
| • <i>Inhibidores tisulares de metaloproteasas (TIMPs).....</i>            | 17 |
| <i>TIMP4.....</i>   | 19 |
| • <i>Actividades biológicas de los TIMPs.....</i>                         | 19 |
| <br>  |    |
| <b>HIPÓTESIS.....</b>   | 21 |
| <br>  |    |
| <b>OBJETIVOS.....</b>   | 21 |
| <br>  |    |
| <b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>  | 22 |
| • <i>Cultivo celular.....</i>   | 22 |
| • <i>Tinción rojo oleoso (Oil Red O) de los preadipocitos 3T3-</i>        |    |
| <i>L1.....</i>  | 22 |
| • <i>Transfección de preadipocitos 3T3-L1 con shRNA.....</i>              | 23 |
| • <i>Análisis de la expresión de ARNm.....</i>                            | 24 |
| • <i>Preparación de extractos celulares totales.....</i>                  | 24 |
| • <i>Electroforesis en gel e inmunotransferencia.....</i>                 | 25 |
| • <i>Tratamiento con TIMP4 recombinante.....</i>                          | 26 |
| • <i>Ensayos de luciferasa.....</i>                                       | 26 |
| • <i>Análisis estadístico.....</i>  | 27 |
| <br>  |    |
| <b>RESULTADOS.....</b>  | 28 |
| • <i>Expresión de TIMP4 durante el proceso de diferenciación terminal</i> |    |

|   |    |
|---|----|
| <i>en preadipocitos 3T3-L1.....</i>   | 28 |
| • <i>Efecto del silenciamiento de TIMP4 en el proceso de diferenciación terminal de preadipocitos 3T3-L1.....</i> | 30 |
| • <i>Activación de NF-<math>\kappa</math>B durante la diferenciación terminal de preadipocitos 3T3-L1.....</i>    | 35 |
| <b>DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....</b>   | 39 |
| <b>CONCLUSIONES.....</b>  | 41 |
| <b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>  | 42 |
| <b>PUBLICACIÓN.....</b>   | 50 |



## ABREVIATURAS

|                                  |  |
|----------------------------------|--|
| ACO                              | acetil-CoA carboxilasa                                   |
| aP2/FABP                         | Proteína que liga ácidos grasos específica del adipocito |
| cDNA                             | Ácido desoxirribonucleico complementario                 |
| C/EBP                            | CCAAT/ Enhancer Binding Proteins                         |
| Hprt                             | Hipoxantina-guanina fosforibosil transferasa             |
| DMEM                             | Medio de Eagle modificado por Dulbecco                   |
| FAS                              | Sintasa de ácidos grasos                                 |
| I $\kappa$ B $\alpha$            | Inhibidor de NF $\kappa$ B subunidad alfa                |
| HE                               | Hematoxolina- eosina                                     |
| KCl                              | Cloruro de potasio                                       |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>  | Bifosfato de potasio                                     |
| LPL                              | Lipoproteína lipasa                                      |
| LXR                              | Receptor X de hígado                                     |
| mM                               | Milimolar  |
| MMP                              | Metaloproteasa   |
| mRNA                             | Ácido ribonucleico mensajero                             |
| Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> | Bifosfato de sodio                                       |
| NF- $\kappa$ B                   | Factor nuclear $\kappa$ B                                |

|               |   |
|---------------|---|
| PBS           | Buffer salino de fosfatos                                 |
| PBST          | Buffer salino de fosfatos con tween 20                    |
| PCR           | Reacción en cadena de la polimerasa                       |
| PPAR          | Peroxisome Proliferator Activated Receptor                |
| Pref-1        | Factor de preadipocitos-1                                 |
| rhTIMP4       | Inhibidor tisular de metaloproteasa 4 recombinante humano |
| rpm           | Revoluciones por minuto                                   |
| RXR           | Receptor X retinoide                                      |
| shRNA         | Short hairpin RNA   |
| SD            | Desviación estándar                                       |
| SE            | Error estándar  |
| TIMPs         | Inhibidores tisulares de metaloproteasas                  |
| TNF- $\alpha$ | Factor de necrosis tumoral alfa                           |
| WNT           | Glucoproteínas de secreción que actúan como ligandos      |

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Diferenciación celular a partir de una célula mesenquimal multipotente
- Figura 2. Etapas de diferenciación de adipocitos
- Figura 3. Estructura general de los miembros de la familia de PPAR $\gamma$
- Figura 4. Cascada de señalización en adipogénesis
- Figura 5. Estructura general de los TIMPs
- Figura 6. Mapa circular del vector reportero de NF $\kappa$ B
- Figura 7. Expresión de marcadores de diferenciación terminal
- Figura 8. Expresión de TIMP4 en preadipocitos sin diferenciar
- Figura 9. Silenciamiento de TIMP4
- Figura 10. Acumulación de lípidos intracelulares durante la diferenciación terminal en células 3T3-L1 con TIMP4 silenciado
- Figura 11. Expresión de marcadores de diferenciación terminal en células 3T3-L1 con TIMP4 silenciado
- Figura 12. Efecto del rhTIMP-4 en células transfectadas
- Figura 13. Localización de TIMP4 en células 3T3-L1 diferenciadas
- Figura 14. Activación de NF- $\kappa$ B en células 3T3-L1 shRNA-control estimuladas con TNF $\alpha$

Figura 15. Activación de NF- $\kappa$ B durante la diferenciación terminal

Figura 16. Expresión de I $\kappa$ B $\alpha$  y TIMP-4

## RESUMEN

Los inhibidores tisulares de metaloproteasas (TIMP) son proteínas multifuncionales que inhiben a las metaloproteasas (MMP) de la matriz extracelular. De esta familia, el último miembro descrito es el TIMP4 el cual se expresa principalmente en el tejido adiposo; sin embargo, el papel de este inhibidor en este tejido es desconocido. Debido a ello y con el fin de estudiar el papel de TIMP-4 durante la adipogénesis, células 3T3-L1 (preadipocitos) fueron transfectadas establemente con un shRNA específico para TIMP-4 o un shRNA control con el fin de silenciar el gen.

Al silenciar al *TIMP-4*, las células 3T3-L1 se diferenciaron con mayor rapidez a adipocitos maduros. Trabajos anteriores han demostrado que *NFκB* es un regulador de la adipogénesis. En concordancia, encontramos que la inhibición de *TIMP-4* disminuye la actividad de *NFκB* durante la adipogénesis. El presente trabajo sugiere que *TIMP-4* podría actuar como un regulador negativo de la adipogénesis a través de la modulación de la cascada de *NFκB*.

## ABSTRACT

Tissue Inhibitors of Metalloproteases (TIMPs) are multifunctional proteins that inhibit the activity of matrix metalloproteases (MMPs). TIMP-4 the latest described member of the family is expressed mainly in adipose tissue. Besides its high expression in fat, the role of this inhibitor in adipose tissue is unknown. In order to study the role of *TIMP-4* during adipogenesis, 3T3-L1 cells were stably transfected with a *TIMP-4* specific shRNA or a control shRNA. Unexpectedly, upon *TIMP-4* knockdown, 3T3-L1 cells differentiated faster into mature adipocytes. Previous reports have shown that NF $\kappa$ B is a key regulator of adipogenesis. In accordance, we found that *TIMP-4* knockdown decreased NF $\kappa$ B activity during adipogenesis. The present work suggests that *TIMP-4* might act as a negative regulator of adipogenesis through NF $\kappa$ B cascade modulation.

## INTRODUCCIÓN

El tejido adiposo es el principal reservorio de energía que se encuentra distribuido en distintos depósitos en el organismo y está compuesto por varios tipos celulares, siendo los adipocitos los más abundantes.

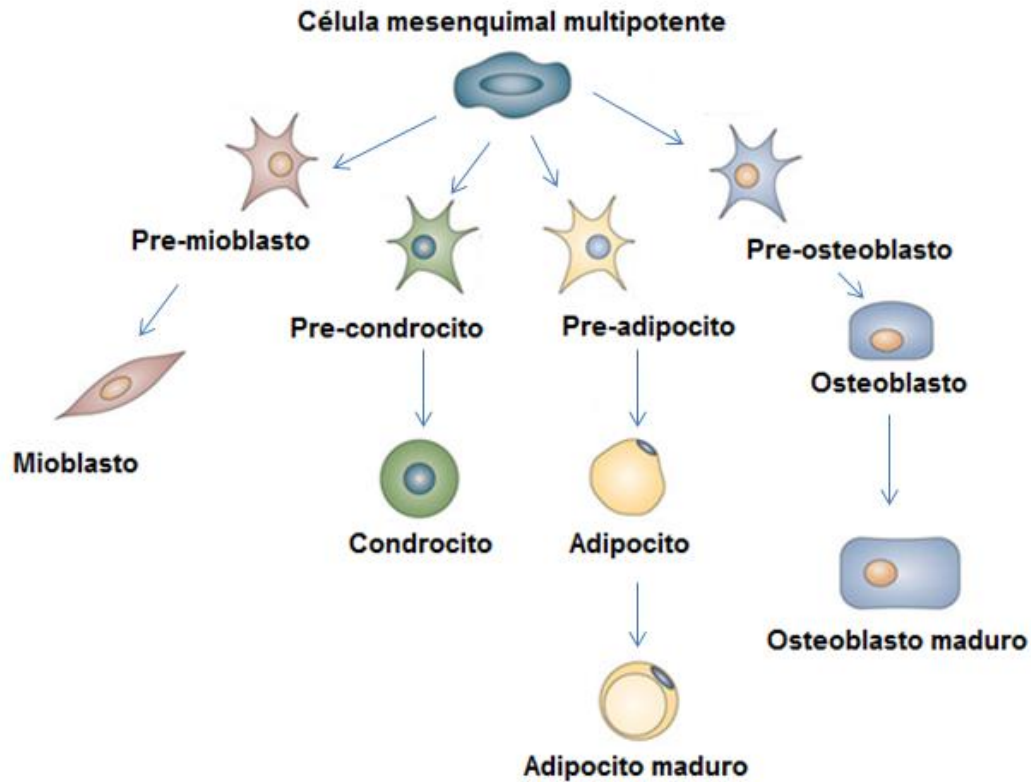
La formación del tejido adiposo comienza antes del nacimiento y la mayor expansión tiene lugar en etapas postnatales. En el adulto, se incrementa la producción de nuevas células adiposas (hiperplasia) en un proceso denominado adipogénesis. Esta capacidad de formación de nuevos adipocitos se mantiene durante toda la vida del individuo (Gregoire et al., 1998). A este respecto, la caracterización de los procesos moleculares que regulan esta diferenciación ha sido motivo de numerosas investigaciones durante los últimos 20 años.

### ***Adipogénesis***

Aunque el origen embrionario de las células grasas no es del todo conocido, varios estudios han sugerido que la línea adipocitaria se deriva de un precursor embrionario multipotente, que posee la capacidad para diferenciarse en células unipotentes y comprometidas hacia el desarrollo de varios tipos celulares como condrocitos, osteoblastos, miocitos y adipocitos (Dani et al., 1997; Kawaguchi et al., 2005; Takashima et al., 2007) (Figura 1).

Generalmente la adipogénesis se describe en dos etapas: la primera etapa comprende la generación de precursores de adipocitos (pre-adipocitos) a partir de

células mesenquimales pluripotenciales y la segunda etapa involucra la diferenciación terminal de estos pre-adipocitos en adipocitos maduros funcionales (Figura 2).



**Figura 1.** Diferenciación celular a partir de una célula mesenquimal multipotente.

### ***Etapas de la adipogénesis***

#### ***Determinación.***

Los adipocitos se originan de células mesenquimales pluripotenciales que se encuentran en el estroma del tejido adiposo. En la etapa de determinación se promueve la transformación de estas células a preadipocitos a través de diversos eventos epigenéticos que causan que los preadipocitos pueden ser diferenciados



en adipocitos maduros o pueden ser mantenidos y amplificados (Rosen et al., 2006).



**Figura 2.** Etapas de diferenciación de adipocitos.

Múltiples señales pueden influenciar la conversión de la célula mesenquimal a adipocito, incluyendo factores extracelulares como BMPs (Huang et al., 2009), TGF- $\beta$  (Zamani et al., 2010), IGF1 (Kawai et al., 2010), IL-17 (Zúñiga et al., 2010), FGF1 (Widberg et al., 2009), FGF2 (Xiao et al., 2010) y activina (Zaragosi et al., 2010). Se ha demostrado, tanto *in vivo* como *in vitro*, la importancia de la ruta de señalización WNT en el desarrollo del adipocito ya que la supresión de esta ruta es esencial para que la adipogénesis proceda (Christodoulides et al., 2009; Prestwich et al., 2007).

### *Diferenciación terminal*

La diferenciación de los adipocitos *in vitro* es un proceso complejo que sigue una secuencia de pasos bien caracterizados, en el que los pre-adipocitos interrumpen su crecimiento, normalmente mediante procesos de inhibición por contacto. Este proceso de diferenciación supone cambios cronológicos en la expresión de numerosos genes a través de la activación de la cascada transcripcional. De esta manera se activan los genes característicos de los adipocitos, al mismo tiempo que se reprimen genes que son inhibitorios para la adipogénesis o que son innecesarios para la función del adipocito maduro (Rosen et al., 2006).

### ***Cascada transcripcional en la diferenciación terminal***

Gracias a los estudios realizados con líneas celulares *in vitro*, ha sido posible identificar muchos de los factores que se encuentran involucrados en la diferenciación de adipocitos. La línea celular de preadipocitos 3T3-L1 puede ser inducida a diferenciarse con la adición de mitógenos y agentes hormonales que promueven a los preadipocitos a llevar a cabo una o dos rondas de expansión clonal antes de iniciarse los procesos de activación transcripcional de genes marcadores del adipocito y la adquisición del fenotipo adipocitario.

El proceso de adipogénesis habitualmente se describe como una cascada de eventos genéticos. La primera fase de dicha cascada incluye a las proteínas de unión a CCAAT/enhancer  $\beta$  (C/EBP $\beta$ ) y C/EBP $\delta$ ; estos son factores de transcripción que a su vez son los responsables del inicio de la segunda fase: La activación de los factores de transcripción PPAR $\gamma$  (Peroxisome Proliferator

Activated Receptor  $\gamma$ ) y C/EBP $\alpha$ , los genes maestros de todo el proceso de diferenciación (Tang et al., 2003; Rosen et al., 2000; MacDougald et al., 1995).

Durante la primera fase, las células fibroblásticas se redondean y se incrementan los niveles de los mRNA de marcadores adipogénicos como la LPL (MacDougald et al., 1995; Darlington et al., 1998). La aparición de PPAR $\gamma$  y C/EBP $\alpha$  activa la expresión de los genes que caracterizan al fenotipo adipocitario, como son la FAS, la glicerofosfato deshidrogenasa, la ACO, el transportador de glucosa GLUT 4, el receptor de insulina y la proteína aP2/FABP entre otros (Spiegelman et al., 1993).

A través de este proceso, en el citoplasma de la célula van apareciendo gotas lipídicas y a lo largo del tiempo, éstas irán incrementando y fusionándose hasta formar una o dos grandes gotas lipídicas que ocuparán gran parte del citoplasma.

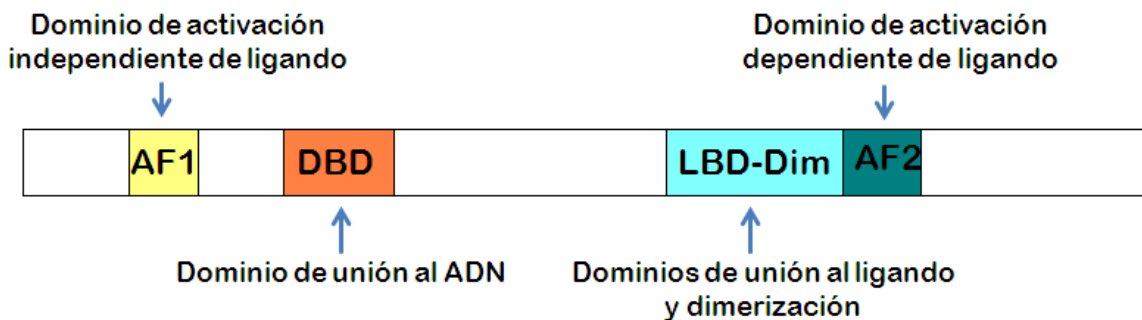
Por otro lado, C/EBP $\beta$  es capaz de inducir la expresión de C/EBP $\alpha$ , incluso en ausencia de PPAR $\gamma$  (Kubota et al., 1999a), aunque este hecho es controvertido (Rosen et al., 1999). PPAR $\gamma$  y C/EBP $\alpha$  a su vez inducen la expresión de sí mismos y de uno del otro.

La expresión forzada de PPAR $\gamma$  (en presencia de sus ligandos) y C/EBP $\alpha$  estimula la adipogénesis aún en ausencia de agentes inductores exógenos. Aunque PPAR $\gamma$  es suficiente para inducir la expresión de la mayoría de los genes adipocitarios, C/EBP $\alpha$  es necesario para conferir al adipocito sensibilidad a la insulina (Wu et al., 1999).

## Familia PPARs

Los *PPARs* son factores de transcripción que pertenecen a la superfamilia de receptores nucleares. Estructuralmente poseen regiones canónicas comunes para otros miembros de la familia de receptores nucleares, incluyendo la región de transactivación amino-terminal AF-1. Poseen una región de unión al ADN y una región de dimerización y unión al ligando con una función de transactivación dependiente del ligando AF-2, localizada en el carboxilo-terminal (Zoete et al., 2007) (Figura 3). Esta familia de receptores nucleares puede ser activada por ácidos grasos y por sus derivados metabólicos en el cuerpo, controlando rutas de señalización de genes blanco del metabolismo (Chawla et al., 2001).

La familia de *PPARs* se encuentra formada por tres miembros: *PPAR $\alpha$* , *PPAR $\delta$*  y *PPAR $\gamma$* .



**Figura 3.** Estructura general de los miembros de la familia *PPAR*.

### *PPAR $\gamma$*

Esta variante fue primero clonada de una librería de ADNc de *Xenopus*, junto con las variantes alfa y beta (Dreyer et al., 1992). Después, una versión murina de la

variante gamma fue clonada (*mPPAR $\gamma$ 1*) (Chen et al., 1993), seguida por una segunda forma murina (*mPPAR $\gamma$ 2*) la cual fue descubierta por ser parte de un heterodímero necesario para la transcripción de aP2, una lipoproteína expresada sólo en adipocitos (Tontonoz et al., 1994). El mismo estudio encontró que la expresión de ARNm de *mPPAR $\gamma$ 2* es al menos 20 veces más elevada en el tejido adiposo murino que en otros órganos. Más tarde se demostró que los fibroblastos murinos podían ser diferenciados a adipocitos in vitro a través de la expresión retroviral de *mPPAR $\gamma$ 2* (Tontonoz et al., 1994b).

PPAR $\gamma$ 1 y PPAR $\gamma$ 2, los cuales provienen de promotores separados en el mismo gen, además se encuentran presentes en humanos (Stanton et al., 2010). Mientras que *PPAR $\gamma$ 1* es encontrado en numerosos tejidos, la expresión de *PPAR $\gamma$ 2* se encuentra restringida en tejido adiposo blanco y pardo (Escher et al., 2001). PPAR $\gamma$ 2 posee 30 aminoácidos adicionales, lo cual favorece que su dominio de transactivación amino-terminal sea más activo (Fajas et al., 1997; Werman et al., 1997). Por lo tanto, aunque ambas isoformas puedan inducir la adipogénesis, PPAR $\gamma$ 2 tiene un papel dominante en este proceso (Mueller et al., 1992; Zhang et al., 2004).

PPAR $\gamma$  heterodimeriza con RXR y regula la expresión de genes blanco dando como resultado la formación de adipocitos diferenciados (Jugue-Aubry et al., 1995; Schoonjans et al., 1996).

### ***Familia C/EBPs***

La primera proteína C/EBP identificada fue caracterizada como un factor capaz de interactuar con el motivo CCAAT presente en varios promotores de genes celulares (Johnson, 1989). El gen *C/EBP* fue clonado en 1988 (Landschulz et al., 1988) y se descubrió que la proteína codificada contiene una región de dimerización y unión al ADN denominado cierre básico-leucina (bZIP, por sus siglas en inglés) (Landschulz et al., 1988; Landschulz et al., 1989; Vinson et al., 1989; Agre et al., 1989), el cual se encuentra presente en otros factores de transcripción (Hurst, 1995). Las seis isoformas de C/EBPs comparten más del 90% de identidad en los 55-65 residuos de aminoácidos que conforman el carboxilo-terminal, donde se encuentra la región bZIP (Landschulz et al., 1988; Landschulz et al., 1989; Vinson et al., 1989; Agre et al., 1989; Hurst, 1995; Williams et al., 1991).

La dimerización es un prerequisite para la unión al ADN, el cual se encuentra mediado por la región básica que asume una estructura  $\alpha$ -hélice (Vinson et al., 1989; Agre et al., 1989; Hurst, 1995).

Por otro lado, la región amino-terminal presenta menos del 20% de identidad entre los miembros de la familia C/EBP, excepto para tres subregiones cortas que se encuentran conservadas (Williams et al., 1995; Nerlov et al., 1994; Williamson et al., 1998; Angerer et al., 1999; Tang et al., 2001; Cooper et al., 1995). Estas tres subregiones representan las regiones de activación que interactúan con componentes del aparato de transcripción basal y estimulan la transcripción

(Williams et al., 1995; Nerlov et al., 1994; Williamson et al., 1998; Angerer et al., 1999; Tang et al., 2001).

Los factores de transcripción C/EBPs fueron la primer familia en la que se demostró un papel crítico en la diferenciación de adipocitos *in vitro*. En células 3T3-L1 la expresión ectópica de C/EBP $\alpha$  y C/EBP $\beta$  es capaz de iniciar el programa de diferenciación en ausencia de hormonas adipogénicas, mientras que la sobreexpresión de C/EBP $\delta$  acelera el proceso iniciado por estas hormonas (Freytag et al., 1994; Lin et al., 1994; Yeh et al., 1994). Además se demostró que ratones transgénicos sin C/EBP $\beta$  y C/EBP $\delta$  ó C/EBP $\alpha$  tienen deficiencias en la diferenciación de adipocitos (Tanaka et al., 1997; Wang et al., 1995).

Debido a que C/EBP $\alpha$  es considerada una proteína anti-mitótica, su prematura expresión podría bloquear la expansión mitótica clonal que es vital para la diferenciación; por ello al comienzo del programa de diferenciación y a lo largo de la expansión clonal, C/EBP $\beta$  y C/EBP $\delta$  son expresados (Lane et al., 1999).

Una vez activados, PPAR $\gamma$  y C/EBP $\alpha$  se regulan uno al otro manteniendo su expresión a pesar de la desaparición de C/EBP $\beta$  y C/EBP $\delta$  (Schwarz et al., 1997; Shao et al., 1997). Además, C/EBP $\alpha$  tiene la capacidad de autorregular su propia expresión. Caso contrario, en fibroblastos deficientes de C/EBP $\alpha$  la expresión ectópica de PPAR $\gamma$  no ha sido capaz de activar su propia expresión (Wu et al., 1999).

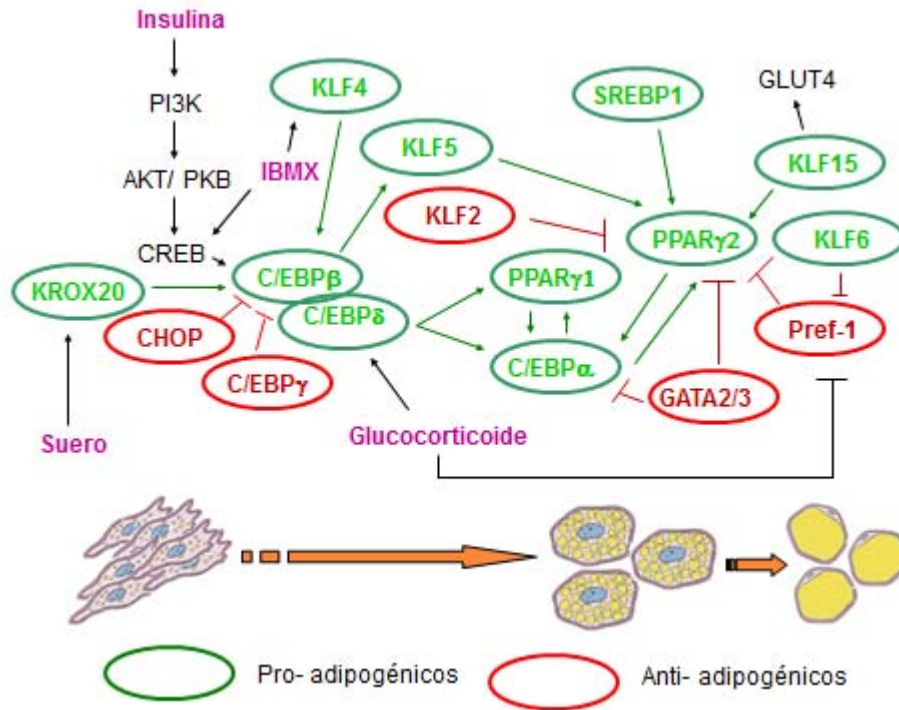
## **NF- $\kappa$ B**

Los factores de transcripción NF- $\kappa$ B existen en las células como homodímeros o heterodímeros unidos a proteínas de la familia de I $\kappa$ B. Las proteínas NF- $\kappa$ B se caracterizan por la presencia de una región conservada de homología Rel (RHD) constituida por 300 aminoácidos. Esta región se encuentra ubicada en el extremo amino terminal y es responsable de la dimerización, la interacción con I $\kappa$ Bs, y la unión a ADN (para revisión consultar Hayden, Ghosh, 2004 y 2008). La unión de I $\kappa$ B impide la translocación al núcleo del complejo NF- $\kappa$ B: I $\kappa$ B, manteniendo a NF- $\kappa$ B inactivo.

Estudios realizados *in vitro* han demostrado que la activación de NF- $\kappa$ B por TNF- $\alpha$  causa des-diferenciación de adipocitos, un efecto específicamente antagonizado por el factor de transcripción PPAR $\gamma$  (Ruan et al., 2002 y 2003). Otro estudio realizado con pre-adipocitos 3T3-L1 demostró que, a través de la activación de NF- $\kappa$ B y la inhibición de AMPK, el lipopolisacárido suprime la unión de C/EBP $\alpha$  al ADN y por lo tanto la expresión del marcador de diferenciación PPAR $\gamma$  (Wang et al., 2013).

Muchas de las proteínas que permiten diferenciar al adipocito ven regulada su expresión por factores de transcripción que actúan como reguladores de la expresión génica. El destino de los pre-adipocitos dependerá de las señales pro-adipogénicas y anti-adipogénicas que determinarán que dichas células se mantengan quiescentes, se dividan o se diferencien (Figura 4).





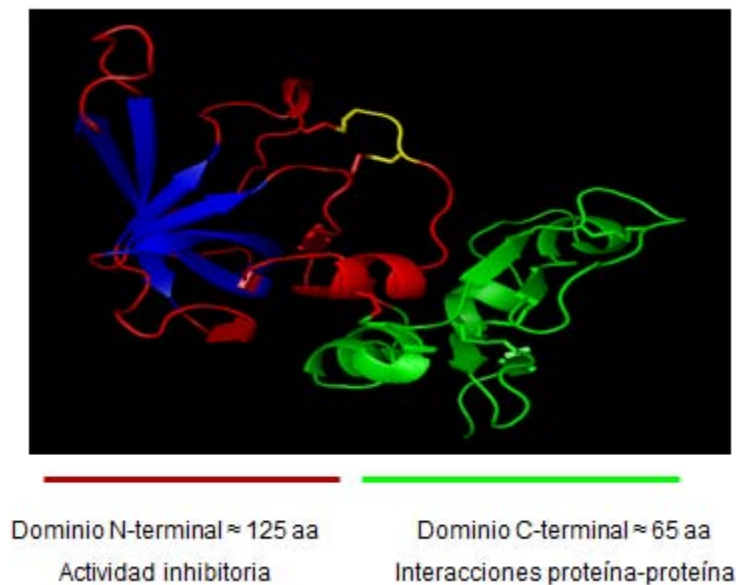
**Figura 4.** Cascada de señalización en adipogénesis.

Además de la regulación de la transcripción, durante la adipogénesis se ha demostrado que existen otros factores que pueden repercutir en la diferenciación terminal. Entre estos factores se encuentra el remodelamiento de la matriz extracelular a través de la expresión de metaloproteinasas de matriz (MMPs). Debido a que se ha considerado este evento como fundamental (Chavey et al., 2003; Croissandeau et al., 2002; Bouloumie et al., 2001), no se descarta que sus inhibidores naturales también desempeñen un papel importante en dicho proceso.

### ***Inhibidores tisulares de metaloproteasas (TIMPs)***

Los TIMPs son una familia de cuatro proteínas secretadas (TIMP-1 a TIMP-4) que inhiben selectivamente a las metaloproteasas. Poseen dos regiones: una región

N-terminal de aproximadamente 125 aminoácidos el cual es homóloga entre los cuatro TIMPs y necesaria para la inactivación de las MMPs y una región C-terminal compuesta por aproximadamente 65 aminoácidos, la cual es importante para las interacciones proteína–proteína y la unión a pro-MMPs (Figura 5).



**Figura 5.** Estructura general de los TIMPs (Imagen obtenida en [www.pymol.org](http://www.pymol.org) de la secuencia reportada en Protein Data Bank).

Los TIMP's pueden ser regulados a nivel transcripcional por varias citocinas y factores de crecimiento, resultando en una expresión tejido específica ya sea en forma constitutiva o inducible (Clark et al., 2007). TIMP-1 es expresado en los órganos reproductores, TIMP-2 se expresa de manera constitutiva en todo el cuerpo, TIMP-3 en corazón, riñón y timo (Baker et al., 2002), mientras que TIMP-4 se expresa selectiva y predominantemente en riñón, páncreas, colon, cerebro, corazón y tejido adiposo (Greene et al., 1996; Nuttall et al., 2004).

## ***TIMP-4***

Este miembro es el más recientemente identificado y menos estudiado. Inicialmente fue clonado en humanos y más tarde en ratón. Es una proteína no glicosilada conformada por 195 aminoácidos, lo que la convierte en el miembro más largo de la familia (Melendez-Zajgla et al., 2008).

Como se mencionó con anterioridad, la expresión de TIMP4 se encuentra restringida a algunos órganos, por lo que se sugiere que presenta funciones fisiológicas específicas; sin embargo el papel de esta proteína aún no es claro.

### ***Actividades biológicas de los TIMPs***

Adicionalmente a la habilidad caracterizada de los TIMPs para inhibir la actividad de las metaloproteasas, estos inhibidores presentan actividades biológicas que apenas están siendo reconocidas y caracterizadas. Por ejemplo, existe evidencia de que los TIMPs pueden interactuar con moléculas de adhesión celular o receptores de factores de crecimiento y activar o regular rutas de señalización como PI-3K, FAK, Erk y NF- $\kappa$ B, las cuales se encuentran involucradas en procesos celulares como apoptosis, crecimiento celular, migración y metabolismo (Jung et al., 2006; Stetler-Stevenson, 2008; Chirco et al., 2006; Sun et al., 2009).

Otra actividad de los TIMPs recientemente estudiada es durante el proceso de adipogénesis. Un estudio realizado con ratones deficientes de *TIMP-3* demostró que existe una reconstitución adiposa acelerada durante la involución mamaria (Fata et al., 2001). Otro estudio demostró que la sobreexpresión de TIMP-1

resultó en un aumento en la adipogénesis durante la involución (Alexander et al., 2001).

De los miembros de esta familia de inhibidores, TIMP-4 es el más recientemente descrito y por lo tanto del que menos conocimiento se tiene. Aunque presenta una alta expresión en la grasa, el papel de este inhibidor en el tejido adiposo es desconocida, por lo que en el presente proyecto se determinó la función de TIMP-4 durante el proceso de diferenciación de adipocitos en un modelo *in vitro*.

## **HIPÓTESIS**

- La inhibición de TIMP4 repercutirá en el proceso de diferenciación terminal del adipocito.

## **OBJETIVOS**

### **OBJETIVO GENERAL**

- Determinar la función de TIMP-4 durante el proceso de diferenciación de adipocitos.

### **OBJETIVOS PARTICULARES**

- Determinar si durante el proceso de diferenciación de adipocitos se regula la expresión de TIMP4.
- Determinar si el TIMP-4 es indispensable para la diferenciación de adipocitos.
- Determinar si el TIMP-4 activa la ruta de señalización de NF- $\kappa$ B durante la diferenciación de adipocitos.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### ***Cultivo celular***

Preadipocitos murinos 3T3-L1 se cultivaron, mantuvieron y diferenciaron mediante un kit comercial (Mesenchymal Stem cell Adipogenesis kit, Chemicon International, No. Cat. SCR020). Brevemente, las células se sembraron en placas de 6 pozos y se cultivaron durante 2 días post-confluencia en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (Gibco BRL, Gran Island, NY, EE.UU.) suplementado con suero fetal bovino al 10%. La diferenciación fue entonces inducida (Día 0) cambiando el medio a DMEM que contenía 10% de suero fetal bovino, 3-isobutil-1-metilxantina 0.5 mM, dexametasona 1  $\mu$ M, indometacina 100  $\mu$ M e insulina 10  $\mu$ g / ml. Se añadió el medio de inducción a las células cada tercer día por un período de seis días. El día siete, se sustituyó el medio con DMEM que contenía suero fetal bovino al 10% y 10  $\mu$ g / ml de insulina y al día nueve se les adicionó medio de inducción por cinco días más.

### ***Tinción rojo oleoso (Oil Red O) de los preadipocitos 3T3-L1***

Las células diferenciadas (día 15) se lavaron dos veces con PBS (NaCl 140 mM, KCl 2.7 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.5 mM,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  8.1 mM, pH 7,4) y después se incubaron durante 20 min a temperatura ambiente en paraformaldehído al 4% preparado en PBS. Después de lavar las células tres veces durante 5 min en agua, se añadió solución de rojo oleoso y las células se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente. Las células a continuación, se lavaron con agua tres veces durante 5 minutos cada vez. Las fotografías fueron tomadas con un objetivo de 40x en un microscopio de luz (Axiovert 40 CFL, Zeiss). La tinción fue cuantificada usando el software FIJI [26]. Los datos de rojo oleoso fueron analizados por una ANOVA factorial de dos colas y las diferencias entre las medias de grupos individuales fueron analizadas por una prueba de Fisher LSD post hoc. Un valor de  $p < 0.05$  fue considerado estadísticamente significativo.

### ***Transfección de preadipocitos 3T3-L1 con shRNA.***

Se utilizaron plásmidos SureSilencing™ shRNA obtenidos de SA Bioscience (Frederick, MD, EE.UU.), los cuales están diseñados para disminuir específicamente la expresión de genes individuales a través de ARN de interferencia (shRNA) por transfección estable y selección con puromicina. Cada vector contiene el shRNA bajo el control del promotor U1 y el gen de resistencia a la puromicina para la selección de células transfectadas de manera estable. El kit consta de 4 plásmidos con diferentes diseños para shRNA específicos para *TIMP-4*, asegurando que 2 de los plásmidos suprimen la expresión del gen un 70%.

Las células 3T3-L1 fueron transfectadas de forma estable usando el reactivo Lipofectamina™ (Invitrogen, Carlsbad, CA.) de acuerdo al protocolo del

fabricante. Las células se seleccionaron con 2µg / ml de puromicina durante 15 días; a continuación, las células se diferenciaron como se describió anteriormente. Las líneas celulares se denominaron en adelante shRNA-Control (negativo) y shRNA-Timp-4.

### **Análisis de la expresión de ARNm**

El ARN celular total se aisló utilizando el reactivo TRIzol™ (Invitrogen, Carlsbad, CA). Los ADNc fueron generados utilizando el kit High Capacity cDNA Reverse Transcription™ (Applied Biosystems, US). Las secuencias de los primers fueron las siguientes:

|               | <b>Forward</b>              | <b>Reverse</b>              |
|---------------|-----------------------------|-----------------------------|
| <i>Timp-4</i> | 5'-TCCGGTATGAAATCAAACAGA-3' | 5'-GTGGTAGTGATGATTCAGGCT-3' |
| <i>Pparγ</i>  | 5'-ATGGAAGACCACTCGCATTC-3'  | 5'-AACCATTGGGTCAGCTCTTG-3'  |
| <i>C/ebpα</i> | 5'-GCTTTTTGCACCTCCACCTA-3'  | 5'-CTCTGGGATGGATCGATTGT-3'  |
| <i>Pref-1</i> | 5'-AGCTGGCGGTCAATATCATC-3'  | 5'-CGTTCACCTCGATTCCTCACA-3' |
| <i>Hprt</i>   | 5'-AGTGATAGATCCATTCCTATG-3' | 5'-CAACAACTTGTCTGGAATT-3'   |

Los productos de PCR se sometieron a electroforesis en un gel de agarosa al 1% y luego se visualizaron con tinción SYBR safe. La normalización de datos se realizó utilizando el gen control endógeno hipoxantina fosforribosiltransferasa (HPRT).

### **Preparación de extractos celulares totales**



En los tiempos indicados (0, 3, 6, 12 y 15 días), las células cultivadas en placas de 6 pozos se enjuagaron con PBS y después se recolectaron en 250 µl de buffer enfriado con hielo que contenía Tris 50mM(pH 7.4), NaCl 100 mM, 1% de desoxicolato de sodio, 4% Nonidet P-40, 0.4% SDS, aprotinina 5 mM y leupeptina 50 mM. Los lisados se agitaron durante 1 min, se incubaron durante 20 min en hielo y se centrifugaron durante 15 min a 13,000 rpm (1577.66 g). Los sedimentos se descartaron y los sobrenadantes se almacenaron a -20 ° C. El contenido de proteína en los sobrenadantes se determinó utilizando el kit de ensayo de proteínas DC (Bio-Rad Laboratorios, PA, EE.UU.).

### ***Electroforesis en gel e inmunotransferencia***

Veinte microgramos de proteína total fueron separados por geles de poliacrilamida SDS-PAGE al 15% y transferidos a una membrana de difluoruro de polivinilideno (Bio-Rad, Laboratorios, PA, EE.UU.) con Tris 25 mM, glicina 192 mM durante 20 min. Después de la transferencia, la membrana se bloqueó con leche en polvo descremada al 5% en PBST (PBS+ 0.05% de Tween 20) durante 1 hora, después la membrana se lavó tres veces con PBST y se dejó incubando toda la noche a 4°C con el anticuerpo primario. Al día siguiente se lavó la membrana 3 veces con PBST y se incubó con el anticuerpo secundario unido a peroxidasa de rábano. Para la detección de las proteínas se utilizó el reactivo *enhanced chemiluminescence*<sup>™</sup> (Millipore, EE.UU.)

Los anticuerpos primarios utilizados fueron los siguientes:

Anti-TIMP4, anticuerpo monoclonal para ratón, rata y humano (Sta. Cruz Biotech, sc-9374); Anti-actina, anticuerpo policlonal para ratón, rata y humano (Sta. Cruz Biotech, sc-10731); Anti-I $\kappa$ B $\alpha$ , anticuerpo policlonal para ratón, rata, humano y bovino (Cell signaling, #9242); Anti-tubulina, anticuerpo policlonal para ratón, rata y humano (Cell signaling, # 2146).

#### ***Tratamiento con TIMP-4 recombinante.***

Preadipocitos murinos 3T3-L1 shRNA-Timp-4 se cultivaron, mantuvieron y diferenciaron tal como se describe previamente durante 12 días. En este tiempo, las células se estimularon con 2.4 ng/ml y 24 ng/ml de rhTIMP4 (R&D, No. Cat. 974-TSF-010). Las células 3T3-L1 shRNA-control no se estimularon.

Las células diferenciadas se tiñeron con rojo oleoso. Todas las fotografías fueron tomadas con un objetivo 40x en un microscopio de luz (Axiovert 40 CFL, Zeiss).

#### ***Ensayos de luciferasa.***

Preadipocitos 3T3-L1 shRNA-Control y 3T3-L1 shRNA-Timp-4 se cotransfectaron con un vector reportero de NF $\kappa$ B con luciferasa (Biomyx Technology) que contiene un gen de resistencia a genética. Las células resistentes fueron probadas para la actividad basal de luciferasa y para la capacidad de respuesta de NF $\kappa$ B a la inducción con TNF- $\alpha$ . Después del correspondiente tratamiento, las células se sometieron a lisis utilizando el protocolo del Dual-Luciferase reporter assay system<sup>TM</sup> (Promega, WI, USA, No. Cat. E1910) con 100  $\mu$ l de buffer de lisis pasiva, de los cuales 20  $\mu$ l se utilizaron para medir la actividad de luciferasa.

### ***Análisis estadístico***

Todos los experimentos fueron realizados por triplicado en ensayos independientes, incluyendo las transfecciones y diferenciación. Los resultados fueron expresados como la media  $\pm$  error estándar (SE). La prueba t-Student o ANOVA fue utilizada para comparar los datos cuantitativos. Un valor de  $p < 0.05$  fue considerado estadísticamente significativo.

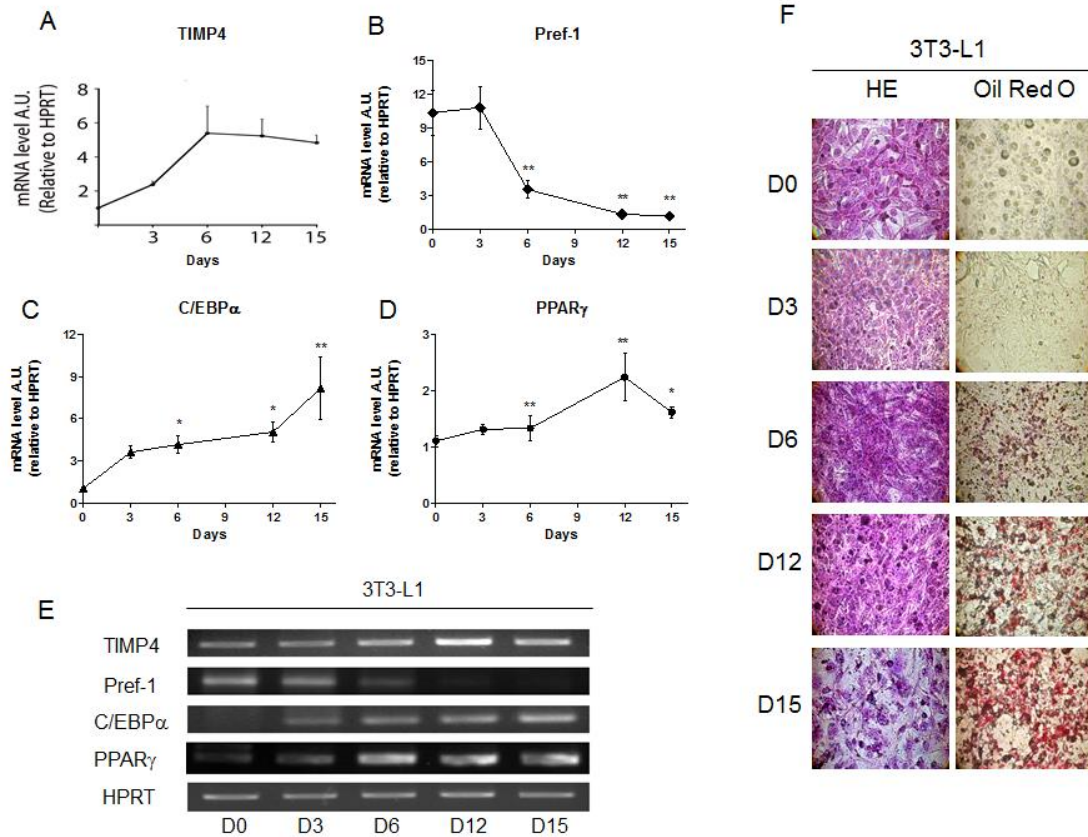
## RESULTADOS

### ***Expresión de TIMP4 durante el proceso de diferenciación terminal en pre-adipocitos 3T3-L1***

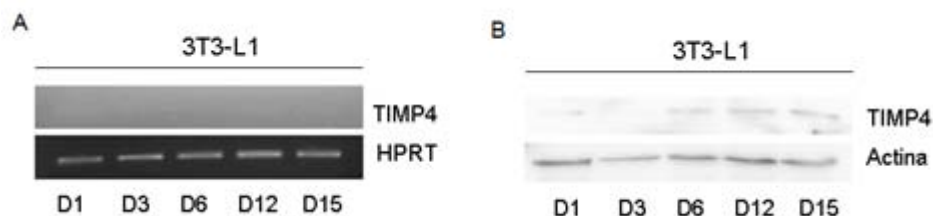
En base a tres experimentos realizados independientemente, pudimos observar que existe un aumento en la expresión de TIMP-4 a medida que el proceso de diferenciación terminal transcurre, alcanzando su máxima expresión al D12. En cuanto a la expresión de los marcadores de diferenciación, como se esperaba los niveles de C/EBP $\alpha$  y PPAR $\gamma$  aumentaron a medida que el adipocito maduraba, mientras que Pref-1 disminuyó (Figura 6B, C, D y E).

Adicionalmente el cambio en la morfología celular durante el proceso de diferenciación terminal, se pudo observar a través de la tinción de hematoxilina-eosina (HE) y la acumulación de lípidos intracelulares a través de la tinción de rojo oleoso. A medida que el pre-preadipocito se diferenciaba, se observó un cambio de una forma tipo fibroblasto a una célula redondeada con un visible aumento en la acumulación de lípidos intracelulares (Figura 6F).

Para asegurarnos de que este cambio en el nivel de expresión de TIMP4 era dependiente de la diferenciación de pre-adipocitos, se evaluaron células 3T3-L1 sembradas únicamente en medio de cultivo sin inducción. A estas células se les extrajo ARN y proteínas totales a los D0, D3, D6, D12 y D15 no encontrándose un aumento en la expresión de TIMP4 (Figura 7).



**Figura 6. Expresión de marcadores de diferenciación terminal.** Preadipocitos 3T3-L1 fueron cultivados durante 15 días en medio de diferenciación y la expresión de A) TIMP4, B) Pref-1, C) C/EBP $\alpha$  y D) PPAR $\gamma$  fue determinada por PCR unto final en los días 0, 3, 6, 12 y 15. E) Imagen representativa de la expresión de los marcadores de diferenciación. F) Tinción celular con hematoxilina-eosina (HE) para la visualización de la morfología celular y tinción de rojo oleoso (Oil Red O) para visualizar la acumulación de lípidos intracelulares durante el proceso de diferenciación terminal. Todos los experimentos fueron desarrollados por triplicado en ensayos independientes. Los resultados son expresados como la media  $\pm$  error estándar (SE). Un valor de  $p < 0.05$  fue considerado estadísticamente significativo. La intensidad de las bandas se midió utilizando un sistema de imágenes VersaDoc MP 5000.



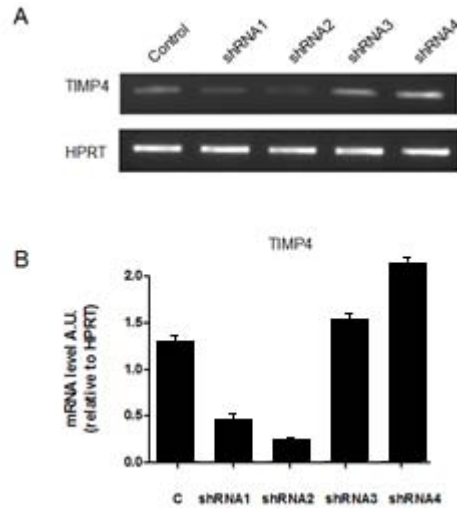
**Figura 7. Expresión de TIMP4 en preadipocitos sin diferenciar.** Células 3T3-L1 fueron cultivadas en medio sin inductores de diferenciación durante 15 días y la expresión de TIMP4 fue analizada a los días 0, 3, 6 12 y 15 mediante A) PCR y B) western blot.

De acuerdo a los resultados obtenidos, pensamos que este inhibidor de metaloproteinasas puede tener un importante papel en la diferenciación terminal de adipocitos.

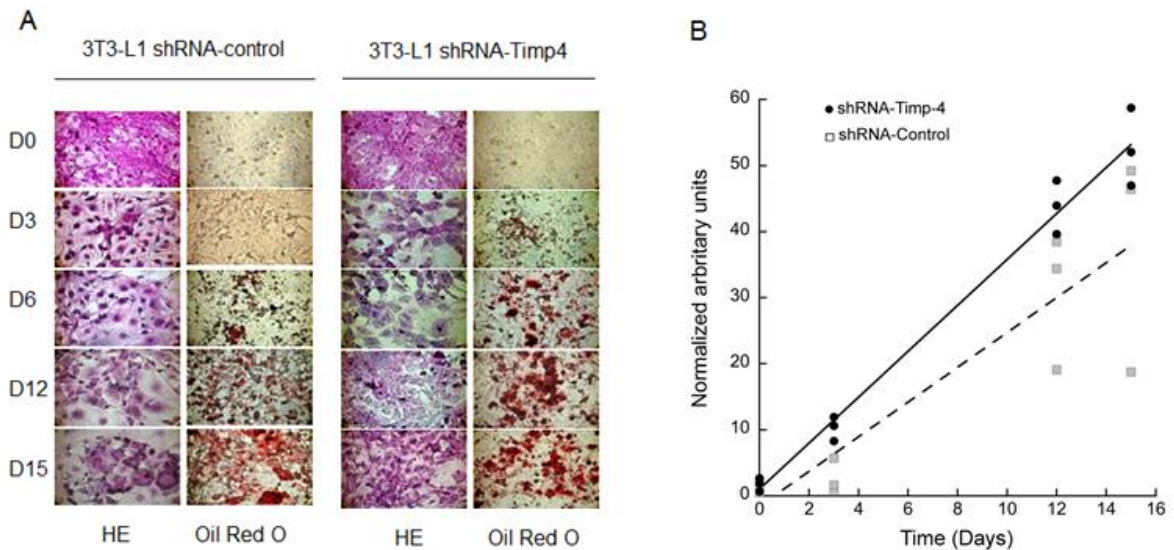
### ***Efecto del silenciamiento de TIMP4 en el proceso de diferenciación terminal de pre-adipocitos 3T3-L1***

Para determinar si el TIMP4 es indispensable en el proceso de diferenciación de adipocitos, se decidió silenciarlo mediante la utilización de siRNA. El modelo utilizado consta de 4 shRNAs dirigidos contra diferentes secuencias de TIMP4 (shRNA 1, shRNA 2, shRNA 3, shRNA 4) y un control negativo (figura 8).

En base a los resultados obtenidos, se optó por utilizar a las células transfectadas con el shRNA2, las cuales fueron nombradas como 3T3-L1 shRNA-Timp-4. Estas células durante la diferenciación terminal alcanzaron una morfología redondeada y acumulación de lípidos intracelulares más pronto en comparación con las 3T3-L1 shRNA- control (Figura 9).



**Figura 8. Silenciamiento de TIMP4.** Células 3T3-L1 fueron transfectadas establemente con cuatro diferentes shRNAs y por A) RT-PCR se comprobó el silenciamiento de TIMP4 con cada shRNA utilizado. B) Expresión relativa de TIMP4 en las células transfectadas con shRNAs. La intensidad de las bandas se midió utilizando un sistema de imágenes VersaDoc MP 5000. Todos los experimentos fueron desarrollados por triplicado en ensayos independientes.



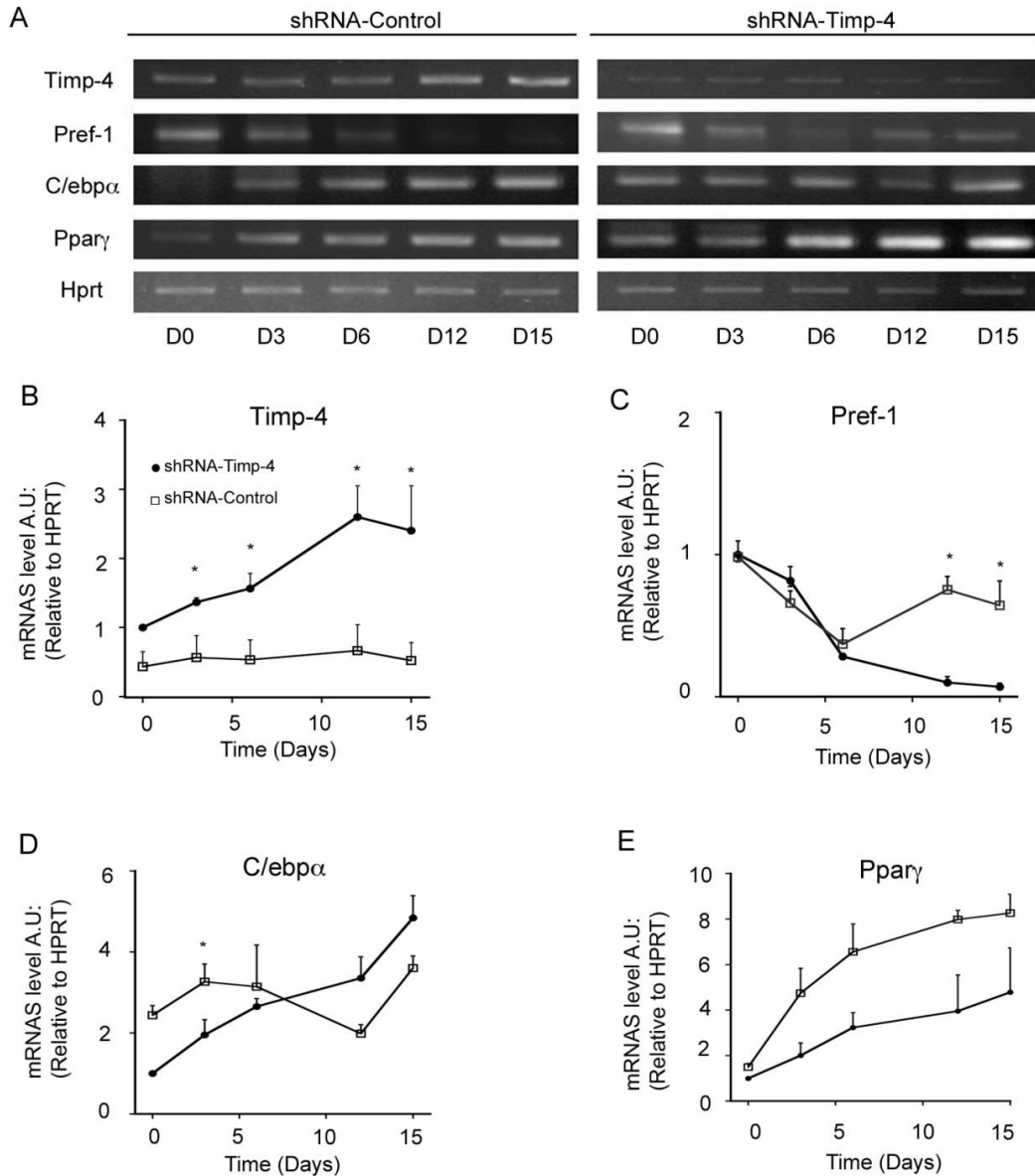
**Figura 9. Acumulación de lípidos intracelulares durante la diferenciación terminal en células 3T3-L1 con TIMP4 silenciado.** A) A los días 0, 3, 6, 12 y 15 células 3T3-L1 shRNA-control y 3T3-L1 shRNA-Timp4 fueron teñidas con hematoxilina-eosina (HE) para visualizar sus cambios morfológicos y con rojo oleoso (Oil Red O) para visualizar la acumulación de lípidos intracelulares. B) Gráfico de dispersión muestra la cuantificación de lípidos, se realizaron comparaciones estadísticas utilizando ANOVA factorial, el efecto del plásmido  $p = 0,010$ , efecto

del tiempo  $p < 0,0001$ . Prueba post hoc confirmó diferencias estadísticas a los 12 y 15 días de diferenciación ( $p = 0,047$  y  $p = 0,031$  respectivamente). La línea de regresión lineal se muestra para células 3T3-L1 shRNA-TIMP-4 y 3T3-L1 shRNA-control. Todos los experimentos fueron desarrollados por triplicado en ensayos independientes.

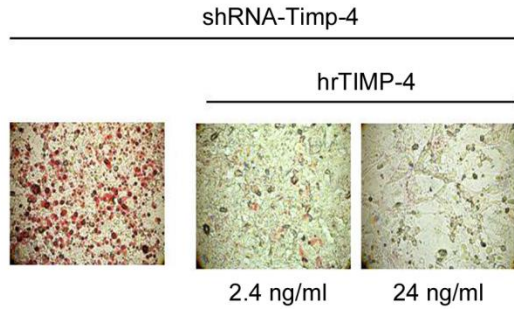
Al comparar el nivel de expresión de los marcadores de diferenciación entre las células 3T3-L1 shRNA-control y las 3T3-L1 shRNA-Timp4 encontramos diferencias. Mientras que en las células 3T3-L1 shRNA-control la expresión de C/EBP $\alpha$  y PPAR $\gamma$  aumenta conforme la diferenciación transcurre, en las células 3T3-L1 shRNA-Timp4 la expresión de C/EBP $\alpha$  sólo aumenta al día 3 y la expresión de PPAR $\gamma$  aumenta al día 12. Respecto a la expresión de Pref-1, mientras que en las células 3T3-L1 shRNA-control disminuye su expresión a medida que la diferenciación se lleva a cabo, en las células 3T3-L1 shRNA-Timp4 a los días 12 y 15 muestra un aumento en su expresión (Figura 10). Los resultados obtenidos sugieren que el TIMP4 puede estar actuando como un regulador durante el proceso de diferenciación, afectando la expresión coordinada de genes considerados clave como son C/EBP $\alpha$ , PPAR $\gamma$  y Pref-1.

Con la finalidad de contrarrestar los efectos del silenciamiento del TIMP4 y corroborar el papel que dicho inhibidor desempeña durante el proceso de diferenciación, células 3T3-L1 shRNA-Timp4 se trataron con rhTIMP4. Al cabo de 12 días de diferenciación las células tratadas con rhTIMP4 no presentaron acumulación de lípidos intracelulares, mientras que células que no fueron tratadas con rhTIMP4 presentaron acumulación de lípidos intracelulares correspondientes al proceso de maduración de adipocitos, los cuales fueron visualizados mediante la tinción de rojo oleoso (Figura 11).





**Figura 10. Expresión de marcadores de diferenciación terminal en células 3T3-L1 con TIMP4 silenciado.** Células 3T3-L1 shRNA-control y 3T3-L1 shRNA-Timp4 fueron cultivadas durante 15 días en medio de diferenciación. A) Imagen representativa del PCR y expresión relativa de B) TIMP4, C) Pref-1, D) C/EBP $\alpha$  y E) PPAR $\gamma$  en los días 0, 3, 6, 12 y 15. Todos los experimentos fueron desarrollados por triplicado en ensayos independientes. La intensidad de las bandas se midió utilizando un sistema de imágenes VersaDoc MP 5000. Los resultados son expresados como la media  $\pm$  error estándar (SE). Un valor de  $p < 0.05$  fue considerado estadísticamente significativo.

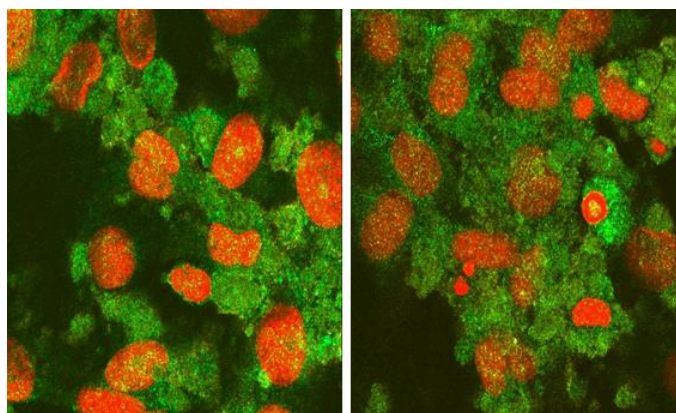


**Figura 11. Efecto del rhTIMP-4 en células transfectadas.** Visualización de lípidos intracelulares mediante la tinción de rojo oleoso en células 3T3-L1 shRNA-Timp4 sin tratar y tratadas con 2.4 ng/ml y 24 ng/ml de hrTIMP-4.

### ***Activación de NF- $\kappa$ B durante la diferenciación terminal de pre-adipocitos***

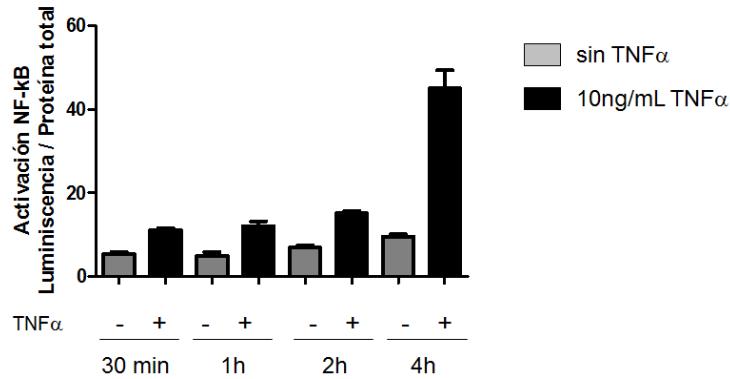
#### ***3T3-L1***

Por microscopía confocal se determinó la localización de TIMP4 en las células al día 6 de diferenciación. Encontramos que en las células 3T3-L1 el TIMP4 se encuentra localizado en el citoplasma (Figura 12), descartando la posibilidad de que pudiera estar interactuando directamente con C/EBP $\alpha$ , por lo que pensamos que el TIMP4 necesita un intermediario para llevar a cabo sus efectos durante la diferenciación terminal.



**Figura 12. Localización de TIMP4 en células 3T3-L1 diferenciadas.** Imágenes de microscopía confocal de células 3T3-L1 al día 6 del proceso de diferenciación terminal, el núcleo celular se muestra en color rojo y el TIMP4 en color verde.

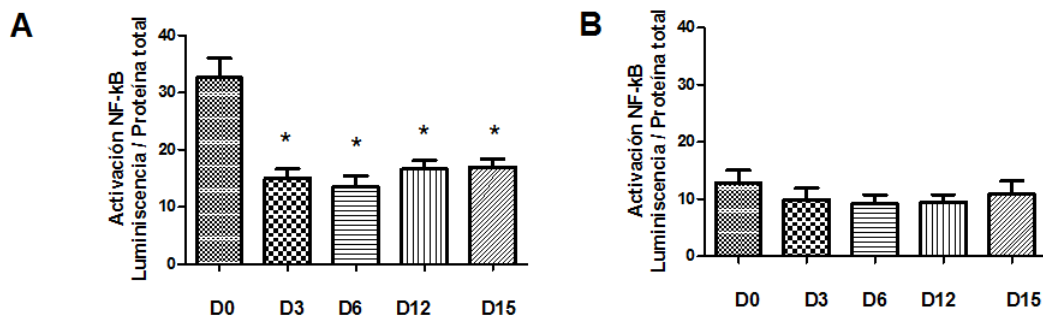
Debido a que se ha demostrado que los miembros de la familia de los TIMPs pueden activar diversas rutas de señalización celular, entre las que destaca NF $\kappa$ B, células 3T3-L1 shRNA-Timp4 y células 3T3-L1 shRNA-control se transfectaron de forma estable con un vector reportero de luciferasa que contiene secuencias de unión para NF- $\kappa$ B y así determinar la activación de esta ruta durante la diferenciación. Para comprobar la efectividad del reportero, en las células transfectadas se realizaron ensayos de activación de NF $\kappa$ B tras el estímulo con TNF- $\alpha$  a diferentes tiempos (Figura 13). Una vez que se comprobó la efectividad del reportero, las células transfectadas fueron sometidas al proceso de diferenciación terminal con el programa previamente establecido, recolectando lisados celulares a los días 0, 3, 6, 12 y 15. Como resultado observamos que a lo largo de dicho proceso, la expresión de NF- $\kappa$ B disminuye, concordando nuestros resultados con reportes previos. Interesantemente en las células 3T3-L1 shRNA-Timp4 no se observó una tendencia clara de disminución de NF $\kappa$ B a medida que la diferenciación transcurre, sino que por el contrario la expresión de este factor desde un principio aparece baja y permanece así durante la diferenciación (Figura 14A).



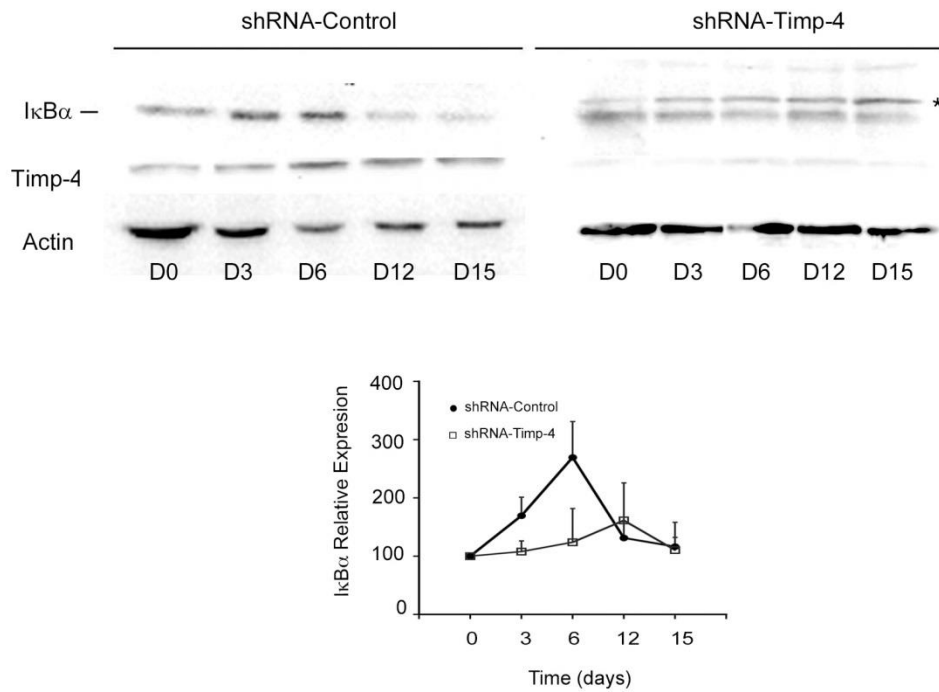
**Figura 13. Activación de NF-κB en células 3T3-L1 shRNA-control estimuladas con TNFα.** La gráfica representa la media ± SD de tres réplicas por punto de células estimuladas con 10 ng/mL de TNFα por 30 minutos, 1h, 2h y 4h.

Apoyando este resultado, se encontró que, el principal inhibidor de NFκB, presenta menores niveles de expresión a través de la diferenciación (Figura 15).

Este inhibidor está regulado por NFκB en un loop auto-regulador.



**Figura 14. Activación de NF-κB durante la diferenciación terminal.** A) Activación de NF-κB en células 3T3-L1shRNA-control y B) células 3T3-L1 shRNA-TIMP4. La gráfica representa la media ± SD de tres réplicas por punto de tres experimentos independientes. \*p<0.05



**Figura 15. Expresión de IκBα y TIMP-4.** En los puntos de tiempo indicados, se extrajeron lisados totales de células 3T3-L1 shRNA-Control y 3T3-L1 shRNA-TIMP-4. Los lisados celulares totales fueron sometidos a análisis de transferencia de Western blot usando anticuerpos para IκBα (la línea indica la principal forma y \* una banda no específica) y para TIMP-4. B) Representación gráfica de la expresión de IκBα. Se muestra la media ± SD de tres experimentos independientes. La intensidad de las bandas se midió utilizando un sistema de imágenes VersaDoc MP 5000.

## DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La adipogénesis es un proceso que implica una serie de pasos por los que una célula se convierte en un adipocito (Rosen et al., 2006; Rosen et al., 2000). La reorganización de la matriz extracelular es un paso crucial en la diferenciación de adipocitos y es controlado por el sistema de MMP / TIMP (Nakajima et al., 1998). En publicaciones anteriores se ha demostrado que la inhibición farmacológica de la actividad de MMP impide la diferenciación del adipocito (Chavey et al., 2003). Además, estudios recientes han demostrado el papel de TIMPs en el proceso de adipogénesis. Meissburger y colaboradores (Meissburger et al., 2011) analizaron la expresión de ARNm TIMP-1 durante la diferenciación de adipocitos 3T3-L1. El ARNm Timp1 se redujo en el momento de la inducción y se mantuvo en niveles muy bajos en preadipocitos 3T3-L1 post-confluentes, lo que sugiere un papel negativo en la adipogénesis. Independientemente, Scroyen y colaboradores (Scroyen et al., 2009) evaluaron el efecto de la sobreexpresión de TIMP-1 en un modelo *in vivo* de adipogénesis. En este estudio, no se observó ningún efecto significativo en la formación *de novo* en las almohadillas de grasa tras la sobreexpresión de TIMP-1, aunque los vasos sanguíneos se ampliaron. Por ello se necesitan realizar más estudios para comprender el papel de TIMP-1 en la adipogénesis. Por otra parte, Bernot y sus colegas (Bernot et al., 2010) mostraron los niveles de ARNm de TIMP's modulados durante el proceso de diferenciación. Curiosamente, se encontró que la expresión de TIMP-3 se regula por Sp1 y que niveles bajos de TIMP-3 son necesarios para la diferenciación de los adipocitos.

En el presente estudio, encontramos que la expresión de Timp-4 aumenta durante la diferenciación de adipocitos, siguiendo un patrón de expresión similar al de PPAR $\gamma$ . Con el fin de dilucidar un papel potencial del Timp-4 en la adipogénesis, se inhibió su expresión con shRNAs específicos y evaluaron los efectos en preadipocitos. Inesperadamente, se observó que tras la inhibición de la expresión de Timp4, la expresión de reguladores clave de la adipogénesis como PPAR $\gamma$  y C/EBP $\alpha$  aumentó en comparación con las células control. Estos resultados sugieren que TIMP-4 podría actuar como un regulador negativo de la adipogénesis.

Para confirmar esta hipótesis, células 3T3-L1 shRNATimp-4 fueron tratadas con rhTIMP-4 y diferenciadas durante 12 días, observándose que estas células no se diferenciaron a adipocitos.

Estudios anteriores han demostrado que los TIMPs activan la vía de señalización de NF $\kappa$ B (Sun et al., 2009; Lizarraga et al., 2004). Por otra parte, NF $\kappa$ B inhibe la unión al ADN de PPAR $\gamma$ , por lo tanto regula negativamente la adipogénesis (Suzawa et al., 2003). De acuerdo con estos hallazgos, nuestros datos actuales muestran que la actividad de NF $\kappa$ B disminuye en células 3T3-L1 shRNA-Timp-4 en comparación con las células 3T3-L1 shRNA-Control antes y durante la diferenciación de los adipocitos. Estos resultados sugieren que durante la adipogénesis, la inhibición de TIMP-4 puede disminuir la actividad de NF $\kappa$ B, y por lo tanto, la activación temprana de la diferenciación de adipocitos.

## CONCLUSIONES

- 1) La expresión de Timp-4 aumenta durante la diferenciación de adipocitos, siguiendo un patrón de expresión similar al de PPAR $\gamma$ .
- 2) La actividad de NF $\kappa$ B disminuye en células 3T3-L1 shRNA-Timp-4 en comparación con las células 3T3-L1 shRNA-Control antes y durante la diferenciación de los adipocitos.
- 3) Durante la adipogénesis, la inhibición de TIMP-4 disminuye la actividad de NF $\kappa$ B, y por lo tanto, la activación temprana de la diferenciación de adipocitos.
- 4) Estos resultados sugieren que TIMP-4 podría actuar como un regulador negativo de la adipogénesis.



## BIBLIOGRAFIA

Agre P, Johnson PF and McKnight SL. Cognate DNA binding specificity retained after leucine zipper exchange between GCN4 and C/EBP. *Science*. 1989; 246: 922-926.

Alexander CM, Selvarajan S, Mudgett J, Werb Z. Stromelysin-1 regulates adipogenesis during mammary gland involution. *J Cell Biol*. 2001; 152: 693–703.

Angerer ND, Du Y, Nalbant D, Williams SC. A short conserved motif is required for repressor domain function in the myeloid-specific transcription factor CCAAT/enhancer binding protein e. *J Biol Chem*. 1999; 274: 4147-4154.

Baker AH, Edwards DR, Murphy G. Metalloproteinase inhibitors: biological actions and therapeutic opportunities. *J Cell Sci*. 2002; 115: 3719–3727.

Benjamini Y, Hochberg Y. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *JR Stat Soc Series B Stat Methodol*. 1995; 57: 289-300.

Bernot D, Barruet E, Poggi M, Bonardo B, Alessi MC, Peiretti F. Down-regulation of tissue inhibitor of metalloproteinase-3 (TIMP-3) expression is necessary for adipocyte differentiation. *J Biol Chem*. 2010; 285: 6508-6514.

Bouloumie A, Sengenè's C, Portolan G, Galitzky J, Lafontan M. Adipocyte produces matrix metalloproteinases 2 and 9: involvement in adipose differentiation. *Diabetes*. 2001; 50: 2080–2086.

Chavey C, Mari B, Monthouel MN, Bonnafous S, Anglard P, Van Obberghen E, Tartare-Deckert S. Matrix metalloproteinases are differentially expressed in adipose tissue during obesity and modulate adipocyte differentiation. *J Biol Chem*. 2003; 278(14): 11888-11896.

Chawla A, Repa JJ, Evans RM, Mangelsdorf DJ. Nuclear receptors and lipid physiology: opening the X-files. *Science*. 2001; 294: 1866–1870.

Chen F, Law SW, O'Malley BW. Identification of two mPPAR related receptors and evidence for the existence of five subfamily members. *Biochem Biophys Res Commun.* 1993; 196: 671–677.

Chirco R, Liu XW, Jung KK, Kim HR. Novel functions of TIMPs in cell signaling. *Cancer Metastasis Rev.* 2006; 25: 99–113.

Christodoulides C, Lagathu C, Sethi JK, Vidal-Puig A. Adipogenesis and WNT signalling. *Trends Endocrinol Metab.* 2009; 20: 16-24.

Clark IM, Swingler TE, Sampieri CL, Edwards DR. The regulation of matrix metalloproteinases and their inhibitors. *Int J Biochem Cell Biol.* 2008; 40 (6-7): 1362-1378.

Cooper C, Henderson A, Artandi S, Avitahl N, Calame K. Ig/EBP (C/EBP $\epsilon$ ) is a transdominant negative inhibitor of C/EBP family of transcriptional activators. *Nucleic Acids Res.* 1995; 23: 4371-4377

Croissandeau G, Chrétien M, Mbikay M. Involvement of matrix metalloproteinases in the adipose conversion of 3T3-L1 preadipocytes. *Biochem J.* 2002; 364: 739-746.

Dani C, Smith AG, Dessolin S, Leroy P, Staccini L, Villageois P, Darimont C, Ailhaud GJ. Differentiation of embryonic stem cells into adipocytes *in vitro*. *Cell Sci.* 1997; 110: 1279–1285.

Darlington GJ, Ross SE, MacDougald OA. The role of C/EBP genes in adipocyte differentiation. *J Biol Chem.* 1998; 273 (46) :30057-30060.

Dreyer C, Krey G, Keller H, Givel F, Helftenbein G, Wahli W. Control of the peroxisomal beta-oxidation pathway by a novel family of nuclear hormone receptors. *Cell.* 1992; 68: 879–887.

Escher P, Braissant O, Basu-Modak S, Michalik L, Wahli W, Desvergne B. Rat PPARs: quantitative analysis in adult rat tissues and regulation in fasting and refeeding. *Endocrinology.* 2001; 142 (10): 4195–4202.

Fajas L, Auboeuf D, Raspé E, Schoonjans K, Lefebvre AM, Saladin R, Najib J, Laville M, Fruchart JC, Deeb S, Vidal-Puig A, Flier J, Briggs MR, Staels B, Vidal H, Auwerx J. The organization, promoter analysis, and expression of the human PPAR $\gamma$  gene. *J Biol Chem.* 1997; 272 (30):18779–18789.

Fata JE, Leco KJ, Voura EB, Yu HE, Waterhouse P, Murphy G, Moorehead RA, Khokha R. Accelerated apoptosis in the Timp-3- deficient mammary gland. *J Clin Invest.* 2001; 108 (6): 831–841.

Freytag SO, Paielli DL, Gilbert JD. Ectopic expression of the CCAAT/enhancer-binding protein  $\alpha$  promotes the adipogenic program in a variety of mouse fibroblastic cells. *Genes Dev.* 1994; 15, 1654-1663.

Greene J, Wang M, Liu YE, Raymond LA, Rosen C, Shi YE. Molecular cloning and characterization of human tissue inhibitor of metalloproteinase 4. *J Biol Chem.* 1996; 271(48): 30375-30380.

Gregoire FM, Smas CM, Sul HS. Understanding adipocyte differentiation. *Physiol Rev.* 1998; 78 (3) :783-809

Hayden MS, Ghosh S. Signaling to NF- $\kappa$ B. *Genes Dev.* 2004; 18: 2195-2224.

Hayden MS, Ghosh S. Shared principles in NF- $\kappa$ B signaling. *Cell.* 2008; 132 (3): 344-362.

Huang H, Song TJ, Li X, Hu L, He Q, Liu M, Lane MD, Tang QQ. BMP signaling pathway is required for commitment of C3H10T1/2 pluripotent stem cells to the adipocyte lineage. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2009; 106: 12670-12675.

Hurst HC. Transcription factors 1: bZIP proteins. *Protein Profile.* 1995; 2: 101-168.

Irizarry RA, Hobbs B, Collin F, Beazer-Barclay YD, Antonellis KJ, Scherf U, Speed TP. Exploration, normalization and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. *Biostatistics.* 2003; 4: 249-264.

Johnson PF, McKnight SL. Eukaryotic transcriptional regulatory proteins. *Annu. Rev. Biochem.* 1989; 58: 799-839.

Jugue-Aubry CE, Gorla-Bajszczak A, Pernin A, Lemberger T, Burger AG, Meier CA. Peroxisome proliferator-activated receptor mediates cross-talk with thyroid hormone receptor by competition for retinoid X receptor. Possible role of a leucine zipper-like heptad repeat. *J. Biol. Chem.* 1995; 270: 18117–18122.

Jung KK, Liu XW, Chirco R, Fridman R, Kim HR. Identification of CD63 as a tissue inhibitor of metalloproteinase-1 interacting cell surface protein. *EMBO J.* 2006; 25 (17): 3934-3942.

Kawai M, Rosen CJ. The IGF-I regulatory system and its impact on skeletal and energy homeostasis. *J. Cell. Biochem.* 2010; 111: 14-19.

Kawaguchi J, Mee PJ, Smith AG. Osteogenic and chondrogenic differentiation of embryonic stem cells in response to specific growth factors. *Bone.* 2005; 36: 758–769.

Kubota N, Terauchi Y, Miki H, Tamemoto H, Yamauchi T, Komeda K, Satoh S, Nakano R, Ishii C, Sugiyama T, Eto K, Tsubamoto Y, Okuno A, Murakami K, Sekihara H, Hasegawa G, Naito M, Toyoshima Y, Tanaka S, Shiota K, Kitamura T, Fujita T, Ezaki O, Aizawa S, Kadowaki T. PPAR gamma mediates high-fat diet-induced adipocyte hypertrophy and insulin resistance. *Mol Cell.* 1999; (4): 597-609.

Landschulz WH, Johnson PF, Adashi EY, Graves BJ and McKnight SL. Isolation of a recombinant copy of the gene encoding C/EBP. *Genes Dev.* 1988; 2: 786-800.

Landschulz WH, Johnson PF, McKnight SL. The DNA binding domain of the rat liver nuclear protein C/EBP is bipartite. *Science.* 1989; 243: 1681-1688.

Lane MD, Tang QQ, Jiang MS. Role of CCAAT enhancer binding proteins (C/EBPs) in adipocyte differentiation. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999; 266: 677-683.

Lin FT, Lane MD. CCAAT/enhancer binding protein  $\alpha$  is sufficient to initiate the 3T3-L1 adipocyte differentiation program. *Proc Natl Acad Sci.* 1994; 91: 8757-8761

Lizarraga F, Maldonado V, Melendez-Zajgla J. Tissue inhibitor of metalloproteinases-2 growth-stimulatory activity is mediated by nuclear factor-kappa B in A549 lung epithelial cells. *Int J Biochem Cell Biol.* 2004; 36:1655-1663.

MacDougald OA, Lane ED. Transcriptional regulation of gene expression during adipocyte differentiation. *Annu Rev Biochem.* 1995; 64: 345-358.

Meissburger B, Stachorski L, Roder E, Rudofsky G, Wolfrum C. Tissue inhibitor of matrix metalloproteinase 1 (TIMP1) controls adipogenesis in obesity in mice and in humans. *Diabetologia.* 2011; 54: 1468-1479.

Melendez-Zajgla J, Del Pozo L, Ceballos G, Maldonado V. Tissue inhibitor of metalloproteinases-4. The road less traveled. *Mol Cancer.* 2008; 7: 85.

Mueller E, Drori S, Aiyer A, Yie J, Sarraf P, Chen H, Hauser S, Rosen ED, Ge K, Roeder RG, Spiegelman BM. Genetic analysis of adipogenesis through peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  isoforms. *J Biol Chem.* 2002; 277 (44): 41925–41930.

Nakajima I, Yamaguchi T, Ozutsumi K, Aso H. Adipose tissue extracellular matrix: newly organized by adipocytes during differentiation. *Differentiation.* 1998; 63:193- 200.

Nerlov C, Ziff EB. Three levels of functional interaction determine the activity of CCAAT/enhancer binding protein-a on the serum albumin promoter. *Genes Dev.* 1994; 8: 350-362.

Nuttall RK, Sampieri CL, Pennington CJ, Gill SE, Schultz GA, Edwards DR. Expression analysis of the entire MMP and TIMP gene families during mouse tissue development. *FEBS Letters.* 2004; 563: 129–134.

Prestwich TC, MacDougald OA. Wnt/ [beta]-catenin signaling in adipogenesis and metabolism. *Curr Opin Cell Biol.* 2007; 19: 612-617.

Rosen ED, Sarraf P, Troy AE, Bradwin G, Moore K, Milstone DS, Spiegelman BM, Mortensen RM. PPAR gamma is required for the differentiation of adipose tissue in vivo and in vitro. *Mol Cell*. 1999; 4(4):611-617.

Rosen ED, MacDougald OA. Adipocyte differentiation from the inside out. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2006; 7(12):885-896.

Rosen ED, Walkey CJ, Puigserver P, Spiegelman BM. Transcriptional regulation of adipogenesis. *Genes Dev*. 2000; 14: 1293–1307.

Ruan H, Hacohen N, Golub TR, Van Parijs L, Lodish HF. Tumor necrosis factor-alpha suppresses adipocyte-specific genes and activates expression of preadipocyte genes in 3T3-L1 adipocytes: nuclear factor-kappaB activation by TNF-alpha is obligatory. *Diabetes*. 2002; 51: 1319–1336.

Ruan H, Pownall HJ, Lodish HF. Troglitazone antagonizes tumor necrosis factor-alpha-induced reprogramming of adipocyte gene expression by inhibiting the transcriptional regulatory functions of NF-kappaB. *J Biol Chem*. 2003; 278: 28181–28192.

Schoonjans K, Staels B, Auwerx J. The peroxisome proliferator activated receptors (PPARS) and their effects on lipid metabolism and adipocyte differentiation. *Biochim Biophys Acta*. 1996; 1302: 93–109.

Schwarz EJ, Reginato MJ, Shao D, Krakow SL, Lazar MA. Retinoic acid blocks adipogenesis by inhibiting C/EBPbeta-mediated transcription. *Mol Cell Biol*. 1997; 17: 1552–1561

Scroyen I, Cosemans L, Lijnen HR. Effect of tissue inhibitor of matrix metalloproteinases-1 on in vitro and in vivo adipocyte differentiation. *Thromb Res*. 2009; 124: 578-583.

Shao D, Lazar MA. Peroxisome proliferator activated receptor gamma, CCAAT/enhancer-binding protein alpha, and cell cycle status regulate the commitment to adipocyte differentiation. *J Biol Chem*. 1997; 272: 21473–21478.

Spiegelman BM, Choy L, Hotamisligil GS, Graves RA, Tontonoz P. Regulation of adipocyte gene expression in differentiation and syndromes of obesity/diabetes. *J Biol Chem.* 1993; 268(10):6823-6826.

Stanton LA, Li JR, Beier F. PPARgamma2 expression in growth plate chondrocytes is regulated by p38 and GSK-3. *J Cell Mol Med.* 2010; 14: 242–256.

Stetler-Stevenson WG. Tissue inhibitors of metalloproteinases in cell signaling: metalloproteinase-independent biological activities. *Sci Signal.* 2008; 1(27).

Sun J, Stetler-Stevenson WG. Overexpression of tissue inhibitors of metalloproteinase 2 up-regulates NF- $\kappa$ B activity in melanoma cells. *J Mol Sig.* 2009; 4:4.

Suzawa M, Takada I, Yanagisawa J, Ohtake F, Ogawa S, Yamauchi T, Kadowaki T, Takeuchi Y, Shibuya H, Gotoh Y, Matsumoto K, Kato S. Cytokines suppress adipogenesis and PPAR-gamma function through the TAK1/TAB1/NIK cascade. *Nat Cell Biol.* 2003; 5: 224-230.

Takashima Y, Era T, Nakao K, Kondo S, Kasuga M, Smith AG, Nishikawa S. Neuroepithelial cells supply an initial transient wave of MSC differentiation. *Cell.* 2007; 129: 1377–1388.

Tanaka T, Yoshida N, Kishimoto T, Akira S. Defective adipocyte differentiation in mice lacking the C/EBPbeta and/or C/EBPdelta gene. *EMBO J.* 1997; 16 (24): 7432–7443.

Tang JG, Koeffler HP. Structural and functional studies of CCAAT/enhancer-binding protein e. *J. Biol. Chem.* 2001; 276: 17739-17746.

Tang QQ, Otto TC, Lane MD. CCAAT/ enhancer-binding protein  $\beta$  is required for mitotic clonal expansion during adipogenesis. *Proc Natl Acad Sci.* 2003; 100: 850- 855.

Tontonoz P, Hu E, Graves RA, Budavari AI, Spiegelman BM. mPPAR gamma 2: tissue-specific regulator of an adipocyte enhancer. *Genes Dev.* 1994; 8:1224-1234.

Tontonoz P, Hu E, Spiegelman BM. Stimulation of adipogenesis in fibroblasts

by PPAR gamma 2, a lipid-activated transcription factor. *Cell*. 1994b; 79:1147–1156.

Vinson CR, Sigler PB and McKnight SL. Scissors-grip model for DNA recognition by a family of leucine zipper proteins. *Science*. 1989; 246: 911-916.

Wang L, Li L, Ran X, Long M, Zhang M, Tao Y, Luo X, Wang Y, Jiao Y, Mao X, Ren J. Lipopolysaccharides reduce adipogenesis in 3T3-L1 adipocytes through activation of NF- $\kappa$ B pathway and downregulation of AMPK expression. *Cardiovasc Toxicol*. 2013; 13 (4): 338-346.

Wang ND, Finegold MJ, Bradley A, Ou CN, Abdelsayed SV, Wilde MD, Taylor LR, Wilson DR, Darlington GJ. Impaired energy homeostasis in C/EBP alpha knockout mice. *Science*. 1995; 269 (5227): 1108–1112.

Werman A, Hollenberg A, Solanes G, Bjørbæk C, Vidal- Puig AJ, Flier JS. Ligand independent activation domain in the N terminus of peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ). Differential activity of PPAR $\gamma$ 1 and -2 isoforms and influence of insulin. *J Biol Chem*. 1997; 272 (32): 20230–20235.

Widberg CH, Newell FS, Bachmann AW, Ramnoruth SN, Spelta MC, Whitehead JP, Hutley LJ, Prins JB. Fibroblast growth factor receptor 1 is a key regulator of early adipogenic events in human preadipocytes. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2009; 296: 121-131.

Williams SC, Cantwell CA, Johnson PF. A family of C/EBP related proteins capable of forming covalently linked leucine zipper dimers *in vitro*. *Genes Dev*. 1991; 5: 1553-1567.

Williams SC, Baer M, Dillner AJ, Johnson PF. CRP2 (C/EBPb) contains a bipartite regulatory domain that controls transcriptional activation, DNA binding and cell specificity. *EMBO J*. 1995; 14: 3170-3183.

Williamson EA, Xu HN, Gombart AF, Verbeek W, Chumakov AM, Friedman AD, Koeffler HP. Identification of transcriptional activation and repression domains in human CCAAT/enhancer-binding protein e. *J Biol Chem*. 1998; 273: 14796-14804.



Wu Z, Rosen ED, Brun R, Hauser S, Adelmant G, Troy AE, McKeon C, Darlington GJ, Spiegelman BM. Cross-regulation of C/EBP alpha and PPAR gamma controls the transcriptional pathway of adipogenesis and insulin sensitivity. *Mol Cell*. 1999; 3(2):151-158.

Xiao L, Sobue T, Esliger A, Kronenberg MS, Coffin JD, Doetschman T, Hurley MM. Disruption of the *Fgf2* gene activates the adipogenic and suppresses the osteogenic program in mesenchymal marrow stromal stem cells. *Bone*. 2010; 47: 360-370.

Yeh WC, Cao Z, Classon M, McKnight SL. Cascade regulation of terminal adipocyte differentiation by three members of the C/EBP family of leucine zipper proteins. *Genes Dev*. 1994; 9: 168-181.

Zamani N, Brown CW. Emerging roles for the transforming growth factor-beta superfamily in regulating adiposity and energy expenditure. *Endocr Rev*. 2010; 32: 387-403.

Zaragosi LE, Wdziekonski B, Villageois P, Keophiphath M, Maumus M, Tchkonja T, Bourlier V, Mohsen-Kanson T, Ladoux A, Elabd C. Activin A plays a critical role in proliferation and differentiation of human adipose progenitors. *Diabetes*. 2010; 59: 2513-2521.

Zhang J, Fu M, Cui T, Xiong C, Xu K, Zhong W, Xiao Y, Floyd D, Liang J, Li E, Song Q, Chen YE. Selective disruption of PPAR $\gamma$ 2 impairs the development of adipose tissue and insulin sensitivity. *Proc Natl Acad Sci*. 2004; 101(29):10703–10708.

Zoete V, Grosdidier A, Michielin O. Peroxisome proliferator activated receptor structures: Ligand specificity, molecular switch and interactions with regulators. *Biochem Biophys Acta*. 2007; 1771:915–925.

Zúñiga LA, Shen WJ, Joyce-Shaikh B, Pyatnova EA, Richards AG, Thom C, Andrade SM, Cua DJ, Kraemer FB, Butcher EC. IL-17 regulates adipogenesis, glucose homeostasis, and obesity. *J Immunol*. 2010; 185: 6947-6959.

**PUBLICACIÓN**

Available online at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)

ScienceDirect

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/yexcr](http://www.elsevier.com/locate/yexcr)

## Research Article

# Tissue inhibitor of metalloproteases-4 (TIMP-4) modulates adipocyte differentiation *in vitro*

Luz María Mejía-Cristobal, Erika Reus, Floria Lizarraga, Magali Espinosa, Gisela Ceballos-Cancino, Tania V. López, Sergio Garay, Vilma Maldonado, Jorge Melendez-Zajgla\*

Basic Research Subdirection, National Institute of Genomic Medicine, Functional Genomics Laboratory, Periferico Sur 4809, Col. Arenal Tepepan, Del. Tlalpan, Mexico D.F. 14610, Mexico

## ARTICLE INFORMATION

## Article Chronology:

Received 16 December 2014

Received in revised form

6 May 2015

Accepted 8 May 2015

Available online 19 May 2015

## Keywords:

Adipogenesis

TIMP-4

NFκB

## ABSTRACT

Tissue inhibitors of metalloproteases (TIMPs) are multifunctional proteins that inhibit matrix metalloproteases (MMPs). The latest described member of the family, TIMP-4, is expressed mainly in adipose tissue, with detectable levels in the brain and heart. Besides its high expression in fat, the role of this inhibitor in adipose tissue is unknown. In order to study the role of TIMP-4 during adipogenesis *in vitro*, 3T3-L1 cells were stably transfected with a TIMP-4 specific shRNA or a control shRNA. Unexpectedly, upon TIMP-4 knockdown, 3T3-L1 cells differentiated faster into mature adipocytes. To get better insight of TIMP-4's role in adipogenesis, microarray expression analyses were performed. Network enrichment analyses uncovered 25 significant upstream signaling pathways, among which the NFκB cascade was found. Previous works have shown that NFκB is a key regulator of adipogenesis. In accordance, we found that TIMP-4 knockdown decreased NFκB activity during adipogenesis. The present work suggests that TIMP-4 might act as a negative regulator of adipogenesis through NFκB cascade modulation.

© 2015 Elsevier Inc. All rights reserved.

## Introduction

Tissue Inhibitors of metalloproteases (TIMPs) comprise a family of four secreted proteins (TIMP-1 to TIMP-4) that selectively inhibit matrix metalloproteases (MMP) family members. These inhibitors

are regulated at the transcriptional level by various cytokines and growth factors, resulting in tissue-specific expression [1]. TIMP-1 is expressed in reproductive organs; TIMP-2 is expressed constitutively throughout the body; TIMP-3 in heart, kidney and thymus [2], while TIMP-4 is predominantly and selectively expressed in

Abbreviations: C/EBP, CCAAT/Enhancer Binding Proteins; ECM, Extracellular matrix; Hprt, Hypoxanthine phosphoribosyltransferase; rhTIMP-4, recombinant human TIMP-4; IκBα, Inhibitor of NFκB subunit α; IPA, Ingenuity Pathway Analysis; MMP, matrix metalloproteases; NFκB, Nuclear Factor κ B; PPARγ, Peroxisome Proliferator Activated Receptor γ; Pref-1, Preadipocyte factor 1; TIMP, Tissue inhibitor of metalloproteases

\*Corresponding author. Tel.: +52 5553501920.

E-mail addresses: [luz.mejiac@gmail.com](mailto:luz.mejiac@gmail.com) (L.M. Mejía-Cristobal), [reus.erika@gmail.com](mailto:reus.erika@gmail.com) (E. Reus), [fjizarraga@inmegen.gob.mx](mailto:fjizarraga@inmegen.gob.mx) (F. Lizarraga), [mepinosa@inmegen.gob.mx](mailto:mepinosa@inmegen.gob.mx) (M. Espinosa), [gceballos@inmegen.gob.mx](mailto:gceballos@inmegen.gob.mx) (G. Ceballos-Cancino), [tvlopez@inmegen.gob.mx](mailto:tvlopez@inmegen.gob.mx) (T.V. López), [sags789@gmail.com](mailto:sags789@gmail.com) (S. Garay), [vmaldonado@inmegen.gob.mx](mailto:vmaldonado@inmegen.gob.mx) (V. Maldonado), [jmelendez@inmegen.gob.mx](mailto:jmelendez@inmegen.gob.mx) (J. Melendez-Zajgla).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.yexcr.2015.05.006>

0014-4827/© 2015 Elsevier Inc. All rights reserved.

adipose tissue, with lower levels of expression in the brain and heart [3,4].

In addition to the marked ability of TIMPs to inhibit the activity of metalloproteases, these inhibitors have additional biological activities that are just now being recognized and characterized. For example, there is evidence that TIMPs can interact with cell adhesion molecules or growth factor receptors and activate or regulate signaling pathways, such as PI-3K, FAK, ERK and NF $\kappa$ B, which are involved in cellular processes like apoptosis, cell growth and migration [5–8].

Adipocyte differentiation is a complex process with two stages: the first involves the generation of adipocyte precursors (pre-adipocytes) from mesenchymal stem cells, whereas the second leads these cells to terminal differentiation into mature functional adipocytes. This process involves chronological upregulation of numerous characteristic genes [9], with an important repression of inhibitory or unnecessary adipogenesis genes [10]. The main proteins identified as regulators of adipogenesis are CCAAT/Enhancer Binding Proteins (C/EBPs) and Peroxisome Proliferator Activated Receptor  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) [11–13].

PPAR $\gamma$  is a member of the nuclear-receptor superfamily that is not only key for adipogenesis [12], but also needed for maintenance of the differentiated state. Adenoviral-mediated expression of a dominant-negative PPAR $\gamma$  in mature 3T3-L1 adipocytes causes dedifferentiation with loss of lipid accumulation and reduced expression of adipocyte markers [14]. On the other hand, C/EBP $\beta$  transcription factors induce many adipocyte genes directly. Analysis of *C/ebp $\alpha$ –/–* mice demonstrated that they are almost completely devoid of white-adipose tissue (except within the mammary gland) [15]. In addition, expression of exogenous PPAR $\gamma$  in C/EBP $\beta$  deficient cells showed that C/EBP $\beta$  is not required for accumulation of lipid and the expression of several adipocyte genes, although it is necessary for insulin sensitivity [16].

Previous work has demonstrated the importance of NF $\kappa$ B during adipogenesis. It has been shown that NF $\kappa$ B inhibits adipogenesis by reducing the expression of PPAR $\gamma$  [17]. In addition, Suzawa and collaborators showed that NF $\kappa$ B inhibits PPAR $\gamma$  binding to DNA by forming a complex with it and its AF-1-specific co-activator PGC2 [18]. Since PPAR $\gamma$  is a key protein for adipogenesis, impairment of its function inhibits this process.

During adipogenesis, fibroblastic preadipocytes begin to grow and store lipids; the cell changes shape as a result of alterations in the expression and arrangement of cytoskeletal components. Additionally, changes in gene expression trigger a transition of extracellular matrix (ECM) composition from fibrillar to laminar ECM. As preadipocytes differentiate there is a shift in MMP/TIMP ratio. *In vivo* and *in vitro* adipogenesis models demonstrate increased MMP and TIMP mRNA levels as well as enhanced MMP enzymatic activity [19]. Furthermore, the importance of MMP activity during adipogenesis in these models is emphasized by the fact that pharmacological MMP inhibitors affect preadipocyte differentiation. At an early stage of this process, pharmacological inhibition of MMPs decreases C/EBP $\beta$  DNA-binding capacity and reduces PPAR $\gamma$  expression, resulting in the arrest of adipocyte differentiation [20]. Several *in vitro* and *in vivo* studies have shown that the TIMPs also participate in adipogenesis. For example, TIMP-3 deficient mice present an accelerated adipose reconstitution during mammary involution [21]. Similarly, over-expression of TIMP-1 resulted in an enhancement of involutinal

adipogenesis [22]. *In silico* expression analysis of various tissues showed that the highest levels TIMP-4 expression is found in adipose tissue [23]. Moreover, Maquoi et al. showed that TIMP-4 mRNA expression increases during adipocyte differentiation [24]. In addition, a previous report showed that TIMP-4 mRNA levels decrease in a mouse model of nutritionally-induced obesity [25]. Nevertheless, the role of this inhibitor in adipogenesis is currently unknown. Therefore in the present study we investigated the role of TIMP-4 during adipocytes terminal differentiation with a widely used *in vitro* model.

---

## Experimental procedures

### Cell culture

Murine 3T3-L1 preadipocytes were cultured, maintained and differentiated using a commercial kit (Mesenchymal Stem cell Adipogenesis kit, Chemicon International, No. Cat. SCR020). Briefly, cells were plated in 6-well plates and grown for 2 days post-confluence in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (GIBCO BRL, Grand Island, NY, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum. Differentiation was then induced (Day 0) by changing the medium to DMEM containing 10% fetal bovine serum, 0.5 mM 3-isobutyl-1-methylxanthine, 1 mM dexamethasone, 100 mM indomethacin, and 10 mg/ml insulin. The induction medium was added to the cells every third day for a period of six days. On day seven, medium was replaced with DMEM containing 10% fetal bovine serum and 10 mg/ml insulin. From day nine until day fifteen induction medium was added to the cells every third day.

### Oil Red O staining of 3T3-L1 preadipocytes

Differentiated cells (day 15) were washed twice with phosphate-buffered saline (PBS) pH 7.4, and then incubated for 20 min at room temperature in 4% paraformaldehyde prepared in phosphate-buffered saline. After washing the cells three times for 5 min in water, Oil Red O solution was added and cells were incubated for 1 h at room temperature. Cells were then washed with water for three times for 5 min each time. Photographs were taken using a 40 $\times$  objective on a light microscope (Axiovert 40 CFL, Zeiss). Staining was quantified using Fiji software [26] with the trainable WEKA segmentation plugin [27]. Oil red data were analyzed by two-way factorial ANOVA and differences between individual group means were analyzed by the Fisher LSD post hoc test. A value of  $p < 0.05$  was considered statistically significant.

### shRNA transfection

The SureSilencing shRNA plasmids for TIMP-4 and negative control shRNA were purchased from SA Bioscience (Frederick, MD, USA). Cells were stably transfected using the Lipofectamine reagent (Invitrogen, CA, USA) according to the manufacturer's protocol. Cells were selected with 2  $\mu$ g/ml of puromycin for 15 days; then cells were differentiated as described previously. Cell lines are hereafter-named shRNA-Control (negative) and shRNA-TIMP-4.

## mRNA expression analysis

Total cellular RNA was isolated using TRIzol reagent (Invitrogen, CA, USA). cDNAs were generated using a High Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems, USA). The sequences of the primers employed in this work are described in [Supplementary Table 1](#). PCR products were electrophoresed on a 1% agarose gel and then visualized with SYBR safe staining. Data normalization was done using the endogenous control gene hypoxanthine phosphoribosyltransferase (*Hprt*).

## Preparation of whole cell extracts

At the indicated times (0, 3, 6, 12 and 15 days), cultured cells grown in 6-well plates were rinsed with PBS (140 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 1.5 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 8.1 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , pH 7.4) and then harvested in 250  $\mu\text{l}$  of ice-cold buffer containing 50 mM Tris (pH 7.4), 100 mM NaCl, 1% sodium deoxycholate, 4% Nonidet P-40, 0.4% SDS, 5 mM aprotinin, and 50 mM leupeptin. Lysates were vortexed for 1 min, incubated for 20 min in ice and centrifuged for 15 min at full speed (13,000 rpm) in a microcentrifuge. Pellets were discarded and supernatants stored at  $-20^\circ\text{C}$ . Protein content of supernatants was determined using a DC protein assay kit (Bio-Rad Laboratories, PA, USA).

## Gel electrophoresis and immunoblotting

Twenty micrograms of total protein were separated by SDS-PAGE on 15% polyacrylamide gels, transferred to polyvinylidene difluoride membrane (Bio-Rad, Laboratories, PA, USA) with 25 mM Tris, 192 mM glycine for 20 min. After transfer, the membrane was blocked with 5% nonfat dry milk in PBS-Tween for 1 h at room temperature. After incubation with the primary antibodies, horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies and an enhanced chemiluminescent substrate kit (Millipore, USA) were used for detection.

The primary antibodies were as follows: anti-TIMP4, monoclonal antibody for mouse, rat and human (Santa Cruz Biotech, sc-9374); anti-actin, polyclonal antibody for mouse, rat and human (Santa Cruz Biotech, sc-10731); anti-IkBa, polyclonal antibody for mouse, rat, human and bovine (Cell signaling, #9242); anti-PPAR $\gamma$  polyclonal antibody for human, mouse and rat (Santa Cruz Biotechnologies, # 7196) and anti-tubulin, polyclonal antibody for mouse, rat and human (Cell signaling, # 2146).

## Recombinant TIMP-4 treatment

Murine shRNA-TIMP-4 3T3-L1 preadipocytes were cultured, maintained and differentiated as previously described for 12 days. During this time, cells were stimulated with 2.4 ng/ml and 24 ng/ml of rhTIMP-4 (R&D, No. Cat. 974-TSF-010). Control shRNA-TIMP-4 3T3-L1 cells were not stimulated with rhTIMP-4. Differentiated cells were stained with Oil Red O. All photographs were taken using a 40 $\times$  lens on a light microscope (Axiovert 40 CFL, Zeiss).

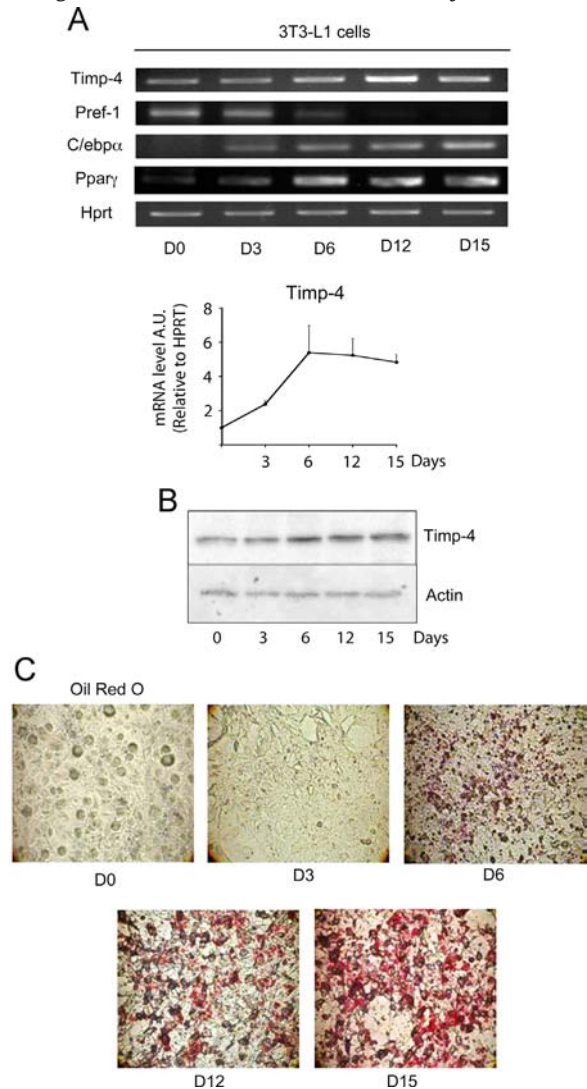
## Luciferase assays

shRNA-Control and shRNA-TIMP-4 3T3-L1 preadipocytes were cotransfected with an NF $\kappa$ B responsive luciferase reporter construct

(Biomyx Technology) containing a geneticin resistance gene. Resistant cells were screened for both baseline luciferase activity and NF $\kappa$ B responsiveness to TNF- $\alpha$  induction. After the corresponding treatment, cells were subjected to lysis in 100  $\mu\text{l}$  of passive lysis buffer, 20  $\mu\text{l}$  of which were used to measure luciferase activity according to the Dual-Luciferase reporter assay system (Promega, WI, USA, No. Cat. E1910).

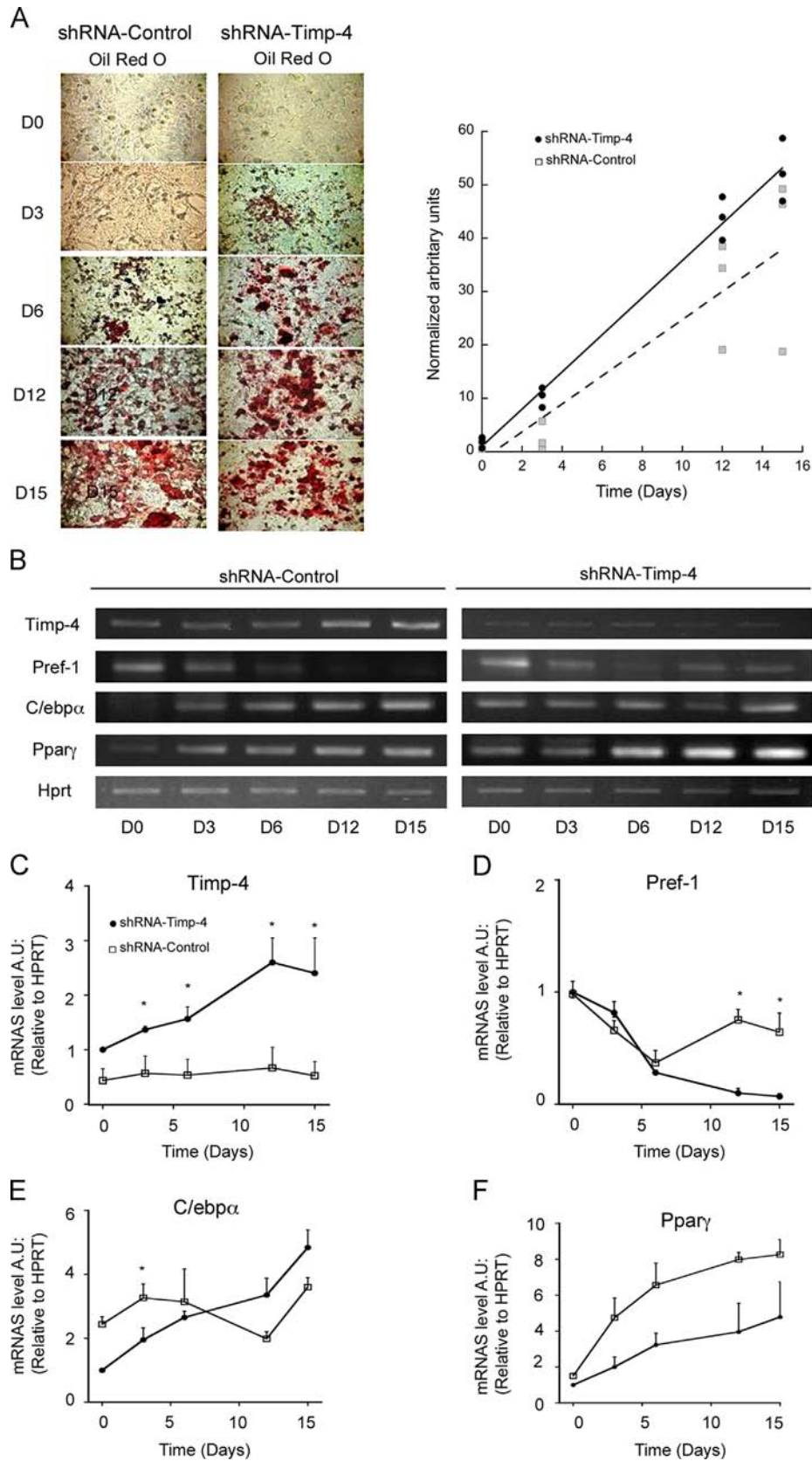
## Statistical analysis

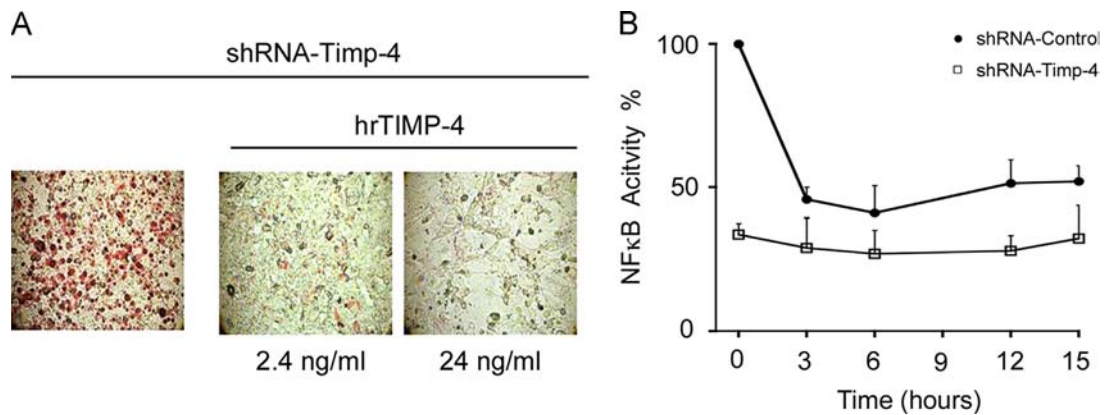
All experiments were performed in triplicated independent assays, including transfections and differentiation analyses. Results are



**Fig. 1 – Differentiation of 3T3-L1 preadipocytes. (A) Total RNA was isolated and subjected to RT-PCR analysis using TIMP-4, Pref-1, C/EBP $\alpha$  and PPAR $\gamma$  primers during the process of cell differentiation on days 0, 3, 6, 12 and 15. Graph shows quantification of TIMP-4 expression changes during adipogenesis of three independent experiments. (B) Total protein was isolated from preadipocytes and subjected to Western Blot analysis as described in Material and Methods. Actin was used as a loading control. (C) Morphological changes and lipid accumulation during cell differentiation were visualized via Oil Red O staining on days 0, 3, 6, 12 and 15.**







**Fig. 3 – TIMP-4 exerts its effects through the NFκB pathway during cell differentiation. (A)** shRNA-TIMP-4 3T3-L1 cells were cultured with adipocyte differentiation medium, treated or not (shRNA-TIMP-4 3T3-L1 control cells) with rhTIMP4 for 12 days and stained with Oil Red O. **(B)** shRNA-TIMP-4 3T3-L1 preadipocytes were cotransfected with an NFκB responsive luciferase reporter construct. At the indicated time points, cells were harvested and cell lysates were prepared. Total cell lysates were used to measure luciferase activity according to Dual-Luciferase reporter assay system.

expressed as mean ± standard error (SE). The Student's *t* test or ANOVA was used to compare quantitative data. A value of  $p < 0.05$  was considered statistically significant.

### Genome-wide microarray analysis

In a 6-well plate, three biological replicates of each cell type were seeded: shRNA-Control cells and shRNA-TIMP-4 cells, for 3 days in DMEM with 5% FBS. RNA was extracted using a RNAqueous-Micro kit (Applied Biosystem, US) following manufacturer instructions. The RNA samples were hybridized to Affymetrix Gene Chip® Mouse Exon array, following protocols by Affymetrix.

Data were normalized using the RMA method [28], and gene expression calculated using an ANOVA test for each pairwise comparison and adjusted by the Benjamini–Hochberg method [29]. Ingenuity pathway analysis software was used to find enriched pathways and upstream regulators. Enrichment was discovered using a right-tailed Fisher's exact test.

## Results

### TIMP-4 expression increases during terminal differentiation of preadipocytes

Preadipocyte terminal differentiation has been extensively studied [9,30]. It has been observed that in order to be successful, both a decrease in the expression of Pref-1 and a concomitant

increase in the expression of PPARγ and C/EBPα are needed. Based on these reports, we first compared the expression of these proteins and TIMP-4 using the murine 3T3-L1 adipogenesis model. As shown in Fig. 1A, we found an increase in the expression of TIMP-4 as terminal differentiation takes place, reaching its highest expression at day 12. To ensure that this change in expression level was not a consequence of preadipocytes culture conditions, 3T3-L1 cells seeded in culture medium alone without induction were subjected to evaluation using the same time points. As expected, TIMP-4 protein expression in control cultures did not change (Supplementary Fig. 1). During the differentiation, the levels of C/EBPα and PPARγ increased as the adipocyte matured, whereas Pref-1 decreased. It is interesting to note that TIMP-4 changes in expression during differentiation were similar to those of PPARγ, perhaps reflecting a direct regulation by this transcription factor. Additionally, we assessed adipocyte morphology by Oil Red O staining during differentiation (Fig. 1B).

### TIMP-4 silencing accelerates preadipocytes terminal differentiation

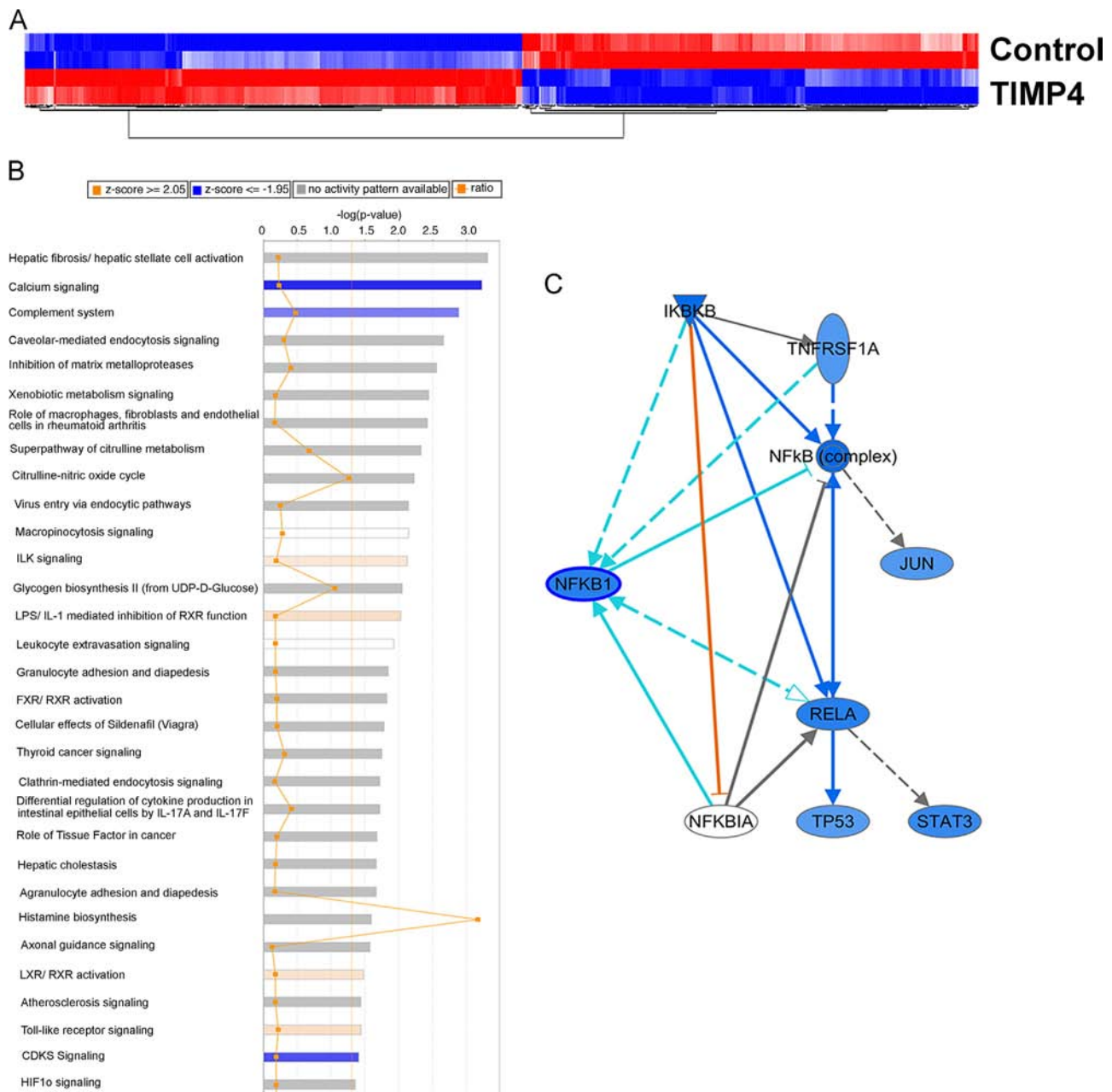
Since we found that TIMP-4 is regulated during adipogenesis, we sought to determine its role in the differentiation process by using short-hairpin RNAs (shRNA). We used 4 different shRNAs directed against TIMP-4 sequences (shRNA1, shRNA2, shRNA3, shRNA4) and a negative control. 3T3-L1 cells were stably transfected with different

**Fig. 2 – TIMP-4 silencing accelerates differentiation of 3T3-L1 preadipocytes. (A)** Left panel. shRNA-Control and shRNA-TIMP-4 3T3-L1 preadipocyte cells were cultured in differentiation medium for 15 days. Images show intracellular accumulation of lipids by Oil Red O staining. Right panel. Graph shows quantification of lipid accumulation during adipogenesis in both cell lines of three independent experiments. Scatter plot shows oil red staining quantification, statistical comparisons were performed using factorial ANOVA, plasmid effect  $p = 0.010$ , time effect  $p < 0.0001$ . Post hoc test confirmed statistical differences at 12 and 15 days of differentiation ( $p = 0.047$  and  $p = 0.031$ , respectively). Linear regression line is shown for shRNA-Control and shRNA-TIMP-4 cell lines. **(B)** Total RNA was isolated from shRNA-Control and shRNA-TIMP-4 3T3-L1 cells and subjected to RT-PCR analysis using TIMP-4, Pref-1, C/EBPα, and PPARγ primers during the process of cell differentiation on days 0, 3, 6, 12, and 15. **(C)** mRNA expression levels of TIMP-4, **(D)** Pref-1, **(E)** C/EBPα, and **(F)** PPARγ during the process of cell differentiation on days 0, 3, 6, 12, and 15. Experiments were performed in triplicate. Mean data are represented ± SE.

shRNAs and silencing of TIMP-4 was confirmed by RT-PCR. Based on the silencing efficiency of the constructs, we decided to use the cells transfected with shRNA2 (Supplementary Fig. 2), hereafter named shRNA-TIMP-4 cells. As expected, shRNA-TIMP-4 cells showed permanent low expression levels of TIMP-4 during differentiation, as compared to shRNA-Control cells (Fig. 2B and C). In contrast, notable differences were found in Pref-1, PPAR $\gamma$  and C/EBP $\alpha$ . C/EBP $\alpha$  levels in shRNA-TIMP-4 cells were elevated from the start of the terminal differentiation (Fig. 2B–F). Strikingly, PPAR $\gamma$  expression occurred sooner in shRNA-TIMP4 cells in comparison to shRNA-Control cells

(Fig. 2F). On the other hand, Pref-1 expression increased in shRNA-TIMP-4 cells only at the end of the differentiation process. These gene expression changes are consistent with the observation that shRNA-TIMP-4 cells reached the classic rounded morphology and the accumulation of intracellular lipids three days before the control cells (Fig. 2A; Factorial ANOVA time effect  $p < 0.0001$ ).

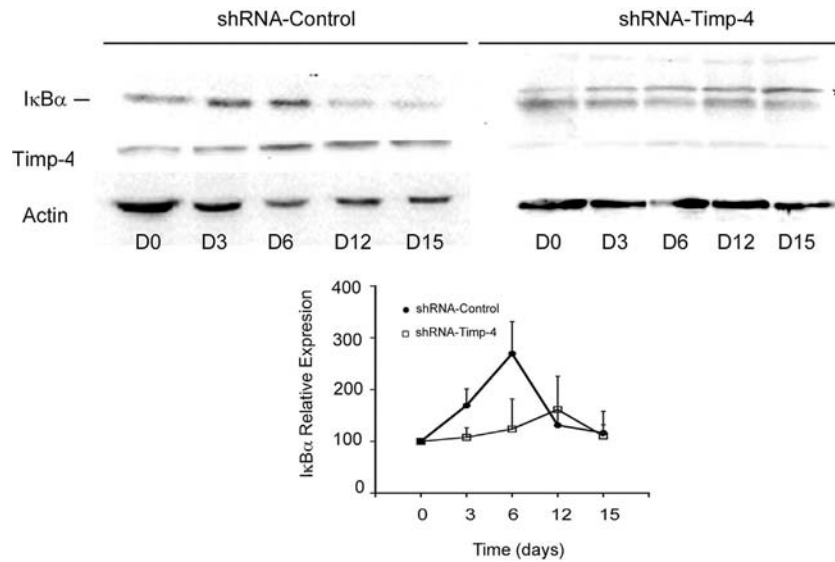
To further confirm the role of TIMP-4 during the differentiation process, shRNA-TIMP-4 cells were exposed to rhTIMP-4 and were differentiated as before. After 12 days of differentiation, the cells treated with rhTIMP-4 showed no intracellular accumulation of lipids,



**Fig. 4 – Microarray global expression analysis.** Affymetrix Mouse GeneChip ST 1.0 arrays were used to analyze the genome-wide expression of 3T3 cells exposed to rhTIMP-4. Network analyses were carried out using Ingenuity Pathway Analysis software.

(A) Heatmap of the 625 genes regulated in TIMP-4-knockdown cells. Upregulated genes marked in red and downregulated in blue. (B) Statistically significant ( $-\log p$  value  $< 0.05$ ) canonical pathways found. In blue a predicted decrease in activation ( $z\text{-score} \leq 2.0$ ) and in orange predicted increase in activation ( $z\text{-score} \geq 1.9$ ) (C) NF $\kappa$ B network is negatively regulated by TIMP-4. Genes regulated are colored. Blue represents downregulation.





**Fig. 5 – IκBα and TIMP-4 Western blot analysis.** At the indicated time points, shRNA-Control and shRNA-TIMP-4 3T3-L1 cells were lysed and total cell lysates were subjected to Western blot analysis using IκBα (the line indicates the major form and \* a non-specific band) and TIMP-4 antibodies. The intensity of bands was measured using a VersaDoc MP 5000 Imaging system. Graph represents the mean ± SE of three independent experiments.

whereas control cells presented differentiated adipocytes (Fig. 3A). This was reflected in PPAR $\gamma$  protein expression (Supplementary Fig. 1B). Altogether, these results suggest that TIMP-4 is a negative regulator during adipocyte terminal differentiation.

### Global expression analysis in 3T3-L1 cells

To provide more insight into the mechanisms through which TIMP-4 functions, we performed a whole-genome expression analysis of shRNA-TIMP-4 cells and control cells using the Affymetrix gene-chip platform. Applying a cut-off of fold change >2 and a  $p$  value <0.05, we found 274 upregulated and 351 downregulated protein-coding genes in shRNA-TIMP-4 cells (Fig. 4A, Supplementary Table 2 and Supplementary Fig. 3). Enrichment analysis of networks using the Ingenuity Pathway Analysis software showed 25 significant canonical pathways. These included glycogen biosynthesis, LXR and RXR activation, and, as expected, inhibition of matrix metalloproteases (Fig. 4B). More importantly, the NFκB canonical and non-canonical pathways were found among the top upstream signaling regulators (Fig. 4C).

### TIMP-4 knockdown decreases the activation of NFκB contributing to the terminal differentiation burst

Our microarray analyses showed that one of the main transduction pathways regulated by TIMP-4 was NFκB. It has been shown that TIMP family members are able to modulate this cascade [5,7,8,31]. To test if this transduction pathway could be involved, we used stably transfected cells with a reporter containing binding sequences for NFκB to determine the activation of this pathway during differentiation. During adipogenesis, NFκB activity decreased after three days (Fig. 3B). Interestingly, in shRNA-TIMP-4 cells the activity of this transcription factor was low from the beginning of the differentiation process (day 0) and remains poorly activated during the remaining of adipocyte differentiation. Supporting this result, we found that IκBα, the main NFκB inhibitor, presented a decreased induction through

differentiation (Fig. 5). This inhibitor is regulated by NFκB in an auto-regulatory loop [32].

## Discussion

Adipogenesis is a process that involves a series of steps by which a cell becomes specialized [10,12]. Extracellular matrix reorganization is a crucial step of adipocyte differentiation and is controlled by the MMP/TIMP system [33]. Previous reports have shown that pharmacological inhibition of MMP activity prevents adipocyte differentiation [19]. Additionally, recent studies have shown the role of TIMPs in the adipogenesis process. Meissburger et al. analyzed TIMP-1 mRNA expression during 3T3-L1 adipocyte differentiation. TIMP-1 mRNA dropped at the time of induction and remained at very low levels in post-confluent differentiating 3T3-L1 preadipocytes, suggesting a negative role in adipogenesis [34]. Independently, Scroyen et al. evaluated the effect of TIMP-1 overexpression in an *in vivo* model of adipogenesis. In this study, no significant effect on the mass of *de novo* formed fat pads was observed upon TIMP-1 overexpression, although the blood vessels were enlarged [35]. Therefore, further studies are needed to understand the implication of TIMP-1 in adipogenesis. On the other hand, Bernot and colleagues showed that TIMP's mRNA levels were modulated during the differentiation process [36]. Interestingly, they found that TIMP-3 expression is regulated by Sp1 transcription factor and that low TIMP-3 levels are required for adipocyte differentiation.

In the present study, we found that TIMP-4 expression increases during adipocyte differentiation, following a similar expression pattern as PPAR $\gamma$ . In order to elucidate a potential TIMP-4 role in adipogenesis, we knocked-down its expression with specific shRNAs and observed the effects in preadipocytes. Unexpectedly, we observed that upon TIMP-4 inhibition, the expression of the adipogenesis key regulators PPAR $\gamma$  and C/EBP $\alpha$  is increased in comparison to control cells. These results suggested that TIMP-4 might act as a negative regulator of adipogenesis *in vitro*. To

confirm this hypothesis, shRNA-TIMP-4 cells were treated with rTIMP-4 and differentiated as previously for 12 days. In agreement with this idea, we observed that shRNA-TIMP-4 cells treated with rTIMP-4 did not differentiate to adipocytes.

We performed a whole-genome expression study using the Affymetrix microarray platform. As expected, due to the reported biological effect of TIMP-4, enrichment for inhibition of matrix metalloproteinases and fibrosis was found. In addition, among the top upstream regulators, NF $\kappa$ B pathway was consistently present. Earlier studies have shown that TIMPs activate the NF $\kappa$ B signaling pathway [8,31]. On the other hand, NF $\kappa$ B inhibits PPAR $\gamma$  DNA binding and therefore it negatively regulates adipogenesis [18]. Consistent with these findings, our present data show that NF $\kappa$ B activity is diminished in shRNA-TIMP-4 compared to shRNA-Control cells before and during adipocyte differentiation. These results suggest that during adipogenesis, TIMP-4 knockdown may diminish the activity of NF $\kappa$ B, therefore triggering earlier adipocyte differentiation.

## Conclusions

In a 3T3-L1 model, TIMP-4 acts as a positive regulator of the NF $\kappa$ B signaling pathway, and thus, reduces the rate of adipocyte terminal differentiation. Further *in vivo* analyses are required to uncover the full physiological role of TIMP-4 in adipogenesis.

## Acknowledgments

Luz Maria Mejia-Cristobal was supported by a fellowship from CONACyT, (171568). The present work was part of Luz Maria Mejia-Cristobal doctoral thesis for the Biomedical Sciences Doctorate Program, Faculty of Medicine, Universidad Nacional Autonoma de Mexico. This work was supported by grant 132931 from CONACyT to Jorge Melendez-Zajgla.

## Appendix A. Supporting information

Supplementary data associated with this article can be found in the online version at <http://dx.doi.org/10.1016/j.yexcr.2015.05.006>.

## REFERENCES

- I.M. Clark, T.E. Swinger, C.L. Sampieri, D.R. Edwards, The regulation of matrix metalloproteinases and their inhibitors, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 40 (2008) 1362–1378.
- A.H. Baker, D.R. Edwards, G. Murphy, Metalloproteinase inhibitors: biological actions and therapeutic opportunities, *J. Cell Sci.* 115 (2002) 3719–3727.
- J. Greene, M. Wang, Y.E. Liu, L.A. Raymond, C. Rosen, Y.E. Shi, Molecular cloning and characterization of human tissue inhibitor of metalloproteinase 4, *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 30375–30380.
- R.K. Nuttall, C.L. Sampieri, C.J. Pennington, S.E. Gill, G.A. Schultz, D.R. Edwards, Expression analysis of the entire MMP and TIMP gene families during mouse tissue development, *FEBS Lett.* 563 (2004) 129–134.
- R. Chirco, X.W. Liu, K.K. Jung, H.R. Kim, Novel functions of TIMPs in cell signaling, *Cancer Metastasis Rev.* 25 (2006) 99–113.
- K.K. Jung, X.W. Liu, R. Chirco, R. Fridman, H.R. Kim, Identification of CD63 as a tissue inhibitor of metalloproteinase-1 interacting cell surface protein, *EMBO J.* 25 (2006) 3934–3942.
- W.G. Stetler-Stevenson, Tissue inhibitors of metalloproteinases in cell signaling: metalloproteinase-independent biological activities, *Sci. Signal.* 1 (2008) re6.
- J. Sun, W.G. Stetler-Stevenson, Overexpression of tissue inhibitors of metalloproteinase 2 up-regulates NF-kappaB activity in melanoma cells, *J. Mol. Signal.* 4 (2009) 4.
- A.T. Ali, W.E. Hochfeld, R. Myburgh, M.S. Pepper, Adipocyte and adipogenesis, *Eur. J. Cell Biol.* 92 (2013) 229–236.
- E.D. Rosen, O.A. MacDougald, Adipocyte differentiation from the inside out, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7 (2006) 885–896.
- O.A. MacDougald, M.D. Lane, Transcriptional regulation of gene expression during adipocyte differentiation, *Annu. Rev. Biochem.* 64 (1995) 345–373.
- E.D. Rosen, C.J. Walkey, P. Puigserver, B.M. Spiegelman, Transcriptional regulation of adipogenesis, *Genes Dev.* 14 (2000) 1293–1307.
- Q.Q. Tang, T.C. Otto, M.D. Lane, CCAAT/enhancer-binding protein beta is required for mitotic clonal expansion during adipogenesis, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 100 (2003) 850–855.
- Y. Tamori, J. Masugi, N. Nishino, M. Kasuga, Role of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma in maintenance of the characteristics of mature 3T3-L1 adipocytes, *Diabetes* 51 (2002) 2045–2055.
- H.G. Linhart, K. Ishimura-Oka, F. DeMayo, T. Kibe, D. Repka, B. Poindexter, R.J. Bick, G.J. Darlington, C/EBPalpha is required for differentiation of white, but not brown, adipose tissue, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 98 (2001) 12532–12537.
- Z. Wu, E.D. Rosen, R. Brun, S. Hauser, G. Adelmant, A.E. Troy, C. McKeon, G.J. Darlington, B.M. Spiegelman, Cross-regulation of C/EBP alpha and PPAR gamma controls the transcriptional pathway of adipogenesis and insulin sensitivity, *Mol. Cell* 3 (1999) 151–158.
- G.N. Chae, S.J. Kwak, NF-kappaB is involved in the TNF-alpha induced inhibition of the differentiation of 3T3-L1 cells by reducing PPARgamma expression, *Exp. Mol. Med.* 35 (2003) 431–437.
- M. Suzawa, I. Takada, J. Yanagisawa, F. Ohtake, S. Ogawa, T. Yamauchi, T. Kadowaki, Y. Takeuchi, H. Shibuya, Y. Gotoh, K. Matsumoto, S. Kato, Cytokines suppress adipogenesis and PPAR-gamma function through the TAK1/Table1/NIK cascade, *Nat. Cell Biol.* 5 (2003) 224–230.
- C. Chavez, B. Mari, M.N. Monthouel, S. Bonnafous, P. Anglard, E. Van Obberghen, S. Tartare-Deckert, Matrix metalloproteinases are differentially expressed in adipose tissue during obesity and modulate adipocyte differentiation, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 11888–11896.
- G. Croissandeau, M. Chretien, M. Mbikay, Involvement of matrix metalloproteinases in the adipose conversion of 3T3-L1 preadipocytes, *Biochem. J.* 364 (2002) 739–746.
- J.E. Fata, K.J. Leco, E.B. Voura, H.Y. Yu, P. Waterhouse, G. Murphy, R.A. Moorehead, R. Khokha, Accelerated apoptosis in the Timp-3-deficient mammary gland, *J. Clin. Investig.* 108 (2001) 831–841.
- C.M. Alexander, S. Selvarajan, J. Mudgett, Z. Werb, Stromelysin-1 regulates adipogenesis during mammary gland involution, *J. Cell Biol.* 152 (2001) 693–703.
- J.B. Pan, S.C. Hu, D. Shi, M.C. Cai, Y.B. Li, Q. Zou, Z.L. Ji, PaGenBase: a pattern gene database for the global and dynamic understanding of gene function, *PLoS One* 8 (2013) e80747.
- E. Maquoi, C. Munaut, A. Colige, D. Collen, H.R. Lijnen, Modulation of adipose tissue expression of murine matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors with obesity, *Diabetes* 51 (2002) 1093–1101.
- D. Bauters, M. Van Hul, H.R. Lijnen, B. Gelatinase, (MMP-9) gene silencing does not affect murine preadipocyte differentiation, *Adipocyte* 3 (2014) 50–53.

- [26] J. Schindelin, I. Arganda-Carreras, E. Frise, V. Kaynig, M. Longair, T. Pietzsch, S. Preibisch, C. Rueden, S. Saalfeld, B. Schmid, J.Y. Tinevez, D.J. White, V. Hartenstein, K. Eliceiri, P. Tomancak, A. Cardona, Fiji: an open-source platform for biological-image analysis, *Nat. Methods* 9 (2012) 676–682.
- [27] M. Hall, E. Frank, G. Holmes, B. Pfahringer, P. Reutemann, I.H. Witten, The WEKA mining software: an update, *SIGXDD Explor.* 11 (2009) 10–18.
- [28] R.A. Irizarry, B. Hobbs, F. Collin, Y.D. Beazer-Barclay, K.J. Antonellis, U. Scherf, T.P. Speed, Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data, *Biostatistics* 4 (2003) 249–264.
- [29] Y. Benjamini, Y. Hochberg, Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing, *J R Stat Soc Series B Stat Methodol.* 57 (1995) 289–300.
- [30] M.I. Lefterova, M.A. Lazar, New developments in adipogenesis, *Trends Endocrinol. Metab.* 20 (2009) 107–114.
- [31] F. Lizarraga, V. Maldonado, J. Melendez-Zajgla, Tissue inhibitor of metalloproteinases-2 growth-stimulatory activity is mediated by nuclear factor-kappa B in A549 lung epithelial cells, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 36 (2004) 1655–1663.
- [32] M.L. Scott, T. Fujita, H.C. Liou, G.P. Nolan, D. Baltimore, The p65 subunit of NF-kappa B regulates I kappa B by two distinct mechanisms, *Genes Dev.* 7 (1993) 1266–1276.
- [33] I. Nakajima, T. Yamaguchi, K. Ozutsumi, H. Aso, Adipose tissue extracellular matrix: newly organized by adipocytes during differentiation, *Differentiation* 63 (1998) 193–200.
- [34] B. Meissburger, L. Stachorski, E. Roder, G. Rudofsky, C. Wolfrum, Tissue inhibitor of matrix metalloproteinase 1 (TIMP1) controls adipogenesis in obesity in mice and in humans, *Diabetologia* 54 (2011) 1468–1479.
- [35] I. Scroyen, L. Cosemans, H.R. Lijnen, Effect of tissue inhibitor of matrix metalloproteinases-1 on *in vitro* and *in vivo* adipocyte differentiation, *Thromb. Res.* 124 (2009) 578–583.
- [36] D. Bernot, E. Barruet, M. Poggi, B. Bonardo, M.C. Alessi, F. Peiretti, Down-regulation of tissue inhibitor of metalloproteinase-3 (TIMP-3) expression is necessary for adipocyte differentiation, *J. Biol. Chem.* 285 (2010) 6508–6514.