



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Caracterización del papel del sensor metabólico y efector epigenético SIRT1 en la diferenciación de células troncales mesenquimales humanas

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestra en Ciencias

PRESENTA:
Ximena Del Toro Ríos

TUTORA PRINCIPAL
Dra. Lorena Aguilar Arnal
[Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. María Antonieta Chávez González
[Centro Médico Siglo XXI, IMSS](#)

Dr. Christopher David Wood
[Instituto de Biotecnología, UNAM](#)

Ciudad Universitaria, CD. MX. Diciembre, 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

Agradecimientos académicos

Este trabajo se realizó bajo la dirección de la Dra. Lorena Aguilar Arnal, en el laboratorio B-040 del Departamento de Biología Celular y Fisiología del Instituto de Investigaciones Biomédicas, de la Universidad Nacional Autónoma de México, y bajo la supervisión de la Dra. María Antonieta Chávez González y el Dr. Christopher David Wood, que formaron parte de mi comité tutor.

Agradezco a mis compañeros y amigos de laboratorio Quetzalcóatl Escalante, Edgar Sánchez, Paola Mass, Ignacio Pacheco, Pablo Rojas y Fernando Becerril por sus comentarios y su apoyo. A la Dra. Lucía Mendoza Viveros y a la M. en C. Marcia Bustamante Zepeda por sus observaciones y por toda la ayuda técnica. Sobre todo, a la Dra. Guadalupe Rosario Fajardo Orduña por su orientación durante el desarrollo de esta tesis.

Agradezco especialmente al Dr. Juan José Montesinos Montesinos (Centro Médico Siglo XXI, IMSS) por donar las células utilizadas en este trabajo. También agradezco a la Dra. Lilia Guadalupe Noriega López (Departamento de Fisiología de la Nutrición, INCMNSZ) por su apoyo para utilizar el Seahorse XFe96 Analyzer. Y al Dr. Miguel Tapia Rodríguez (Unidad de Microscopía, IIB) por su apoyo técnico en el manejo de los microscopios.

Agradezco al posgrado en Ciencias Bioquímicas de la UNAM, y al CONACyT por la beca (CVU 855332) otorgada para mis estudios de maestría.

Este trabajo fue financiado por los donativos de Human Frontiers Science Program RGY00078, y DGAPA, PAPIIT IN210619, otorgados a la Dra. Lorena Aguilar Arnal.

Dedicatoria

A Bertha García por formarme como persona y haberme brindado su cariño.

A Vianey, mi mamá, por su todo su amor y apoyo incondicional. Por ser una gran inspiración.

A mis hermanos Vianey y Charbel por su cariño, y a mi primo Mario por ser como un hermano. A mi pequeña sobrina por ser una gran motivación.

A mis tíos Laura y Mario, mi más grande ejemplo a seguir, por su cariño y apoyo en todo momento. Por ser como unos padres para mí.

A mi tía Gema por su amor y estar presente en todo momento.

A Rodrigo con todo mi amor, por las desveladas, su apoyo en todo momento, por ayudarme a alcanzar todas mis metas y hacerme muy feliz. Gracias por ser parte importante de mi vida. Y a Ceci por todas sus atenciones y ayuda en todo momento.

A mis mejores amigos Rubén, Jorge, Tadeo, Luis Itzá, Cynthia, Chinos, Óscar, Azul, Lolis, Mimi, Tonantzin, Kiara, Alison, Ana Paulina y Jéssica, por todas las vivencias y el cariño a lo largo de estos años. Por ser parte de mi familia.

A Alberto por haberme motivado a continuar con el posgrado y por su apoyo en los momentos difíciles.

Contenido

1. Resumen.....	10
2. Abstract.....	12
3. Introducción.....	14
3.1. Las células troncales.....	14
3.2. Las células troncales mesenquimales (MSC).....	16
3.2.1. Propiedades fisiológicas de las MSC.....	17
3.3. Diferenciación adipogénica.....	18
3.3.1. Efectores positivos de la adipogénesis.....	20
3.4. El nicho de las células troncales.....	22
3.5. El metabolismo de las células troncales.....	24
3.6. Nicotinamida adenina dinucleótido (NAD ⁺).....	28
3.6.1. Rutas biosintéticas de NAD ⁺	29
3.7. La familia de las sirtuínas.....	31
3.8. Sirtuína 1 (SIRT1).....	31
3.8.1. Funciones de SIRT1.....	32
3.8.2. Regulación de SIRT1.....	35
3.9. Regulación epigenética de las células troncales.....	36
3.9.1. Estructura de la cromatina de las células troncales.....	38
3.9.2. La metilación del DNA en células troncales.....	39
3.9.3. La acetilación y desacetilación de histonas en células troncales.....	40
3.9.4. La metilación de histonas en células troncales.....	40
3.9.5. Los RNAs no codificantes en células troncales.....	41
4. Justificación.....	42
5. Hipótesis.....	43
6. Objetivos.....	44
6.1. Objetivo general.....	44
6.2. Objetivos particulares.....	44
7. Materiales y métodos.....	45
7.1. Material biológico.....	45
7.2. Diferenciación celular.....	45
7.3. Tratamientos farmacológicos.....	45
7.4. Tinción con rojo oleoso.....	46

7.5. Extracción de RNA total con tiocinato de guanidina (Trizol).	46
7.6. Retrotranscripción	47
7.7. Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR)	47
7.7.1 Método $2^{-\Delta CT}$	48
7.8. Inmunofluorescencias	49
7.9. <i>Western blot</i>	50
7.10. Seahorse XFe96 Analyzer	51
7.11. Análisis estadístico	53
8. Resultados	54
8.1. Las células troncales mesenquimales de médula ósea humana se diferenciaron en adipocitos	54
8.2. La expresión de <i>SIRT1</i> aumentó durante la diferenciación adipogénica	56
8.3. La inhibición farmacológica de SIRT1 disminuyó la diferenciación adipogénica	58
8.4. La activación o inhibición farmacológica de SIRT1 modificó la expresión de los genes de diferenciación adipogénica	59
8.5. El NAD ⁺ posiblemente estabilizó la proteína SIRT1 evitando su degradación y promovió su acumulación.	62
8.6. SIRT1 podría regular positivamente a PPAR γ durante la diferenciación adipogénica	67
8.7. Las células tratadas con NAD ⁺ presentaron un fenotipo metabólico quiescente	69
9. Discusión	73
10. Conclusiones	81
10.1. Conclusión general	81
10.2. Conclusiones particulares	81
11. Perspectivas	82
12. Referencias	83
13. Figuras suplementarias	88

Índice de figuras

Figura 1. Clasificación de las células troncales de acuerdo a su potencial de diferenciación	15
Figura 2. Cascada transcripcional que regula la adipogénesis	19
Figura 3. Gen, transcritos y proteínas PPAR γ de humano	22
Figura 4. Los nichos de distintas células troncales tienen bajos niveles de oxígeno	23
Figura 5. El metabolismo de las células troncales multipotentes	25
Figura 6. El metabolismo de las células troncales diferenciadas	26
Figura 7. Cadena de transporte de electrones.	29
Figura 8. Rutas biosintéticas del NAD ⁺ en mamíferos.....	30
Figura 9. Papel de SIRT1 en las funciones celulares.....	33
Figura 10. Regulación de la transcripción dependiente de SIRT1 en células de mamíferos.....	34
Figura 11. Niveles de empaquetamiento del DNA.....	37
Figura 12. Interpretación de los resultados del Seahorse Analyzer	52
Figura 13. Las MSC se diferenciaron en adipocitos	55
Figura 14. Las MSC inducidas a la diferenciación adipogénica fueron positivas a lípidos	55
Figura 15. La expresión de <i>SIRT1</i> y de los genes de diferenciación adipogénica aumentó en MSC a diferentes días de la inducción adipogénica.....	57
Figura 16. La inhibición farmacológica de SIRT1 disminuyó la diferenciación adipogénica	59
Figura 17. La activación o inhibición farmacológica de SIRT1 modificó la expresión de los genes de diferenciación adipogénica.....	61
Figura 18. Análisis de inmunofluorescencia para SIRT1 al día 4 de la inducción adipogénica	63
Figura 19. Análisis de inmunofluorescencia para SIRT1 al día 8 de la inducción adipogénica	64
Figura 20. Análisis de inmunofluorescencia para SIRT1 al día 12 de la inducción adipogénica	65
Figura 21. Análisis de inmunofluorescencia para SIRT1 al día 16 de la inducción adipogénica	66
Figura 22. La proteína PPAR γ aumenta durante la diferenciación adipogénica	68

Figura 23. La isoforma PPAR γ 2 está presente los primeros días de la diferenciación adipogénica con el tratamiento con NAD ⁺	68
Figura 24. Tasa de consumo de oxígeno (OCR).....	70
Figura 25. Tasa acidificación extracelular (ECAR).....	71
Figura 26. Modelo propuesto para las MSC tratadas con FK866 durante la diferenciación adipogénica.....	78
Figura 27. Modelo propuesto para las MSC tratadas con EX527 y NAD ⁺ durante la diferenciación adipogénica.....	79
Figura S1. Caracterización de las células troncales mesenquimales de médula ósea humana.....	88
Figura S2. Estandarización de las inmunofluorescencias para SIRT1.....	89
Figura S3. Estandarización Seahorse XFe96 Analyzer.....	90
Figura S4. Las MSC se diferenciaron en osteoblastos.....	91
Figura S5. Las MSC inducidas a la diferenciación osteogénica fueron positivas a fosfatasa alcalina.....	91
Figura S6. La expresión de <i>SIRT1</i> y de los genes de diferenciación osteogénica aumentó en MSC a diferentes días de la inducción osteogénica.....	92
Figura S7. Replicados biológicos de la tinción con rojo oleoso.....	93
Figura S8. Tinción con rojo oleoso control.....	94
Figura S9. Replicados biológicos del <i>Western blot</i> de PPAR γ	94

Abreviaturas

ADPN: Adiponectina
AP-1: Proteína 1 activadora
aP2: Proteína de unión a ácidos grasos
AROS: Regulador activo de SIRT1
BSA: Albúmina sérica bovina
CD: Cluster de diferenciación
C/EBPa: CCAAT/proteína de unión a potenciador-a
CFU-F: Unidades formadoras de colonias de fibroblastos
DNA: Ácido desoxirribonucleico
DNAm: Ácido desoxirribonucleico mitocondrial
ECAR: Tasa de acidificación extracelular
FCCP: Carbonilcianuro-p-trifluorometoxifenilhidrazona
FOXO: Proteínas O *forkhead box*
GLUT4: Transportador de glucosa 4
HAT: Histona acetiltransferasa
HDAC: Histona desacetilasa
HDM: Histona desmetilasa
HIF-1: Factor 1 inducible por hipoxia
HMT: Histona metiltransferasa
HS: Suero de caballo
HSC: Célula troncal hematopoyética
ISC: Célula troncal intestinal
ISCT: Sociedad Internacional de Terapia Celular
JNK: Cinasa c-Jun N-terminal
KLF: Factor de transcripción similar a Krüppel
LPL: Lipoproteín lipasa
MSC: Células troncales/estromales mesenquimales
MuSC: Célula troncal muscular
NA: Ácido nicotínico
NAD⁺: Nicotinamida adenina dinucleótido
NADH: Nicotinamida adenina dinucleótido reducida
NADPH: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

NAM: Nicotinamida
NAMPT: Nicotinamida fosforribosiltransferasa
NcoR: Co-represor del receptor nuclear
ncRNA: RNA no codificante
NK: Célula *natural killer*
NMN: Nicotinamida mononucleótido
NMNAT: Nicotinamida mononucleótido adenilil transferasa
NR: Nicotinamida ribósido
NSC: Célula troncal neural
OCR: Tasa de consumo de oxígeno
OPN: Osteopontina
OXPHOS: Fosforilación oxidativa
PARP: Poli ADP-ribosa polimerasa
PFA: Paraformaldehído
PGC1 α : Proteína 1 α coactivadora del receptor activado por el proliferador de peroxisomas
PPAR γ : Receptor- γ activado por el proliferador de peroxisomas
RNA: Ácido ribonucleico
RNA_m: RNA mensajero
ROS: Especies reactivas de oxígeno
RUNX2: Factor de transcripción relacionado a Runt 2
SIRT1: Sirtuína 1
SMRT: Mediador de silenciamiento de los receptores de retinoides y hormonas tiroideas
SUV39H1: Supresor de variegación 3-9 homólogo 1
SREBP-1: Proteína de unión al elemento regulador de esteroles 1
STAT: Transductor de señales y activador de transcripción

1. Resumen

Las células troncales se distinguen de los demás tipos celulares por sus capacidades de autorrenovación y diferenciación. Estas células residen en un nicho hipóxico, lo cual podría explicar su fenotipo metabólico, caracterizado por altos niveles de consumo de glucosa, combinado con la producción de lactato, conocido como glucólisis aeróbica. Durante la diferenciación, hay una reprogramación metabólica donde el flujo glucolítico disminuye drásticamente y el ATP es generado principalmente a través de la fosforilación oxidativa en las mitocondrias, al activarse las rutas metabólicas mitocondriales se adquiere un metabolismo oxidativo y aumenta la producción de NAD^+ , el cual es un cofactor esencial en las reacciones redox metabólicas, así como un sustrato para enzimas dependientes de NAD^+ , como las PARPs o las sirtuínas. Existen pocos estudios a nivel molecular acerca de la relación entre los cambios en el metabolismo de óxido-reducción y el proceso de diferenciación de las células troncales. Sirtuína 1 (SIRT1) es una enzima con capacidad desacetilasa de histonas (HDAC), que se ha visto implicada en distintos procesos de diferenciación celular, posiblemente relacionado con la reprogramación metabólica. En este trabajo, se evaluó el papel de SIRT1 durante la diferenciación adipogénica de células troncales/estromales mesenquimales humanas de médula ósea, así como la influencia del metabolismo sobre esta dinámica. Para saber si SIRT1 tiene un papel en la diferenciación adipogénica, en los experimentos de este trabajo se utilizó NAD^+ , el cofactor de SIRT1; FK866, inhibidor de la enzima limitante de la vía de rescate del NAD^+ (NAMPT) y EX527, inhibidor específico de SIRT1. Los resultados mostraron que SIRT1 es necesaria para que se dé el compromiso del linaje adipogénico; sin embargo, su sobreactivación detiene la maduración. Interesantemente, la inhibición de la ruta de rescate del NAD^+ induce una mayor diferenciación. Además, se analizaron los niveles relativos de la proteína SIRT1, así como su localización subcelular, y se observó que los niveles de proteína aumentan con el activador NAD^+ , y disminuyen con los inhibidores FK866 y EX527, por lo que el NAD^+ podría estabilizar la proteína SIRT1 evitando su degradación y promoviendo su acumulación. Por otra parte, conforme pasan los días de diferenciación, SIRT1 se localiza exclusivamente en el núcleo, por lo que puede tener un papel en la adipogénesis a nivel transcripcional. En concordancia, la dinámica en la expresión del gen *PPAR γ* fue similar a la de *SIRT1*, y se observó que la isoforma de la proteína PPAR γ 2, la cual participa de manera más importante que la isoforma PPAR γ 1 en la diferenciación adipogénica, se presenta en los primeros días de dicha diferenciación en las células tratadas con NAD^+ ,

mientras que ambas PPAR γ 1 y 2 disminuyen con el tratamiento con EX527. Ésto indica que SIRT1 podría estar participando en el compromiso hacia el linaje adipogénico, a través de la regulación positiva de PPAR γ . Finalmente, se realizó un análisis de la actividad mitocondrial mediante el equipo Seahorse Analyzer, mostrando que el metabolismo de las células tratadas con NAD⁺ no depende de la glucólisis ni de la fosforilación oxidativa, indicando un fenotipo metabólico quiescente; el metabolismo de las células tratadas con EX527 es muy similar al de las mesenquimales sin diferenciarse, dependen principalmente de la glucólisis. Por otra parte, con el FK866, aumenta el metabolismo oxidativo. Estos resultados indican que se requiere un correcto balance energético de NAD⁺ para que la diferenciación pueda llegar a la maduración y que SIRT1 inhibe la maduración llevando a los preadipocitos a un estado de quiescente. Las células tratadas con el inhibidor de SIRT1, EX527, no se están diferenciando. De manera global, los datos obtenidos en este trabajo indican que SIRT1 promueve el compromiso del linaje adipogénico a través de la regulación positiva de PPAR γ , pero posiblemente detiene la maduración llevando a las células a un estado de quiescencia.

2. Abstract

Stem cells are distinguished from other kinds of cell for their capacity of self-renew and differentiation. These cells reside on a hypoxic niche, which might explain their metabolic phenotype, characterized by their high levels of glucose consumption and the production of lactate, known as aerobic glycolysis. During the differentiation a metabolic reprogramming happens, in which the glycolytic flux drops down drastically and the ATP is generated through oxidative phosphorylation at the mitochondria; when activating the metabolic mitochondrial pathways an oxidative metabolism is acquired and the NAD⁺ production increase, which is an essential cofactor for the redox metabolic reactions, as well as a substrate for enzymes dependent on NAD⁺, such as PARPs or sirtuins. There are scarce molecular level studies on the relation between the changes on the oxidation-reduction metabolism and the stem cells process of differentiation. Sirutin 1 (SIRT1) is an enzyme with histone deacetylase (HDAC) capacity, implied in diverse processes of cellular differentiation, possibly related to metabolic reprogramming. In this work, the roll of SIRT1 was evaluated during the adipogenic differentiation of human bone marrow mesenchymal stromal/stem cells, as well as the influence of metabolism in these dynamics. To study if SIRT1 plays a role at the adipogenic differentiation NAD⁺ (SIRT1 cofactor), FK866 (inhibitor of the limiting enzyme of the NAD⁺'s biosynthesis salvage pathway, NAMPT) and EX527 (specific SIRT1 inhibitor) were used. Results showed that SIRT1 is necessary for the adipogenic lineage commitment to occur; however, its overactivation stops the adipocytes maturation. Interestingly, the inhibition of the NAD⁺'s salvage pathway induces a bigger differentiation. Also, SIRT1 relative protein levels were analyzed, as well as its subcellular localization, and it was observed that an increase on the protein levels occurred with the NAD⁺ activator, and decreased with the FK866 and EX527 inhibitors, consequently NAD⁺ could stabilize the SIRT1 protein avoiding its degradation and promoting its accumulation. Besides that, as differentiation days go by, SIRT1 is exclusively located in the nucleus, therefore it might have a role at the transcriptional level in adipogenesis. Accordingly, the dynamic in the expression of the gene *PPAR γ* was similar to that of *SIRT1*, and it was observed that the protein isoform PPAR γ 2, which has more adipogenic potential than the isoform PPAR γ 1, is present during the first days of the adipogenic differentiation of the cells treated with NAD⁺, while both PPAR γ 1 Y 2 decrease with the EX527 treatment. This shows that SIRT1 could be participating in the compromise towards the adipogenic lineage, through the positive PPAR γ regulation. Finally, an analysis of the mitochondrial activity was

conducted through the Seahorse Analyzer equipment, showing that the metabolism of the treated cells with NAD^+ does not depend on glycolysis nor on the oxidative phosphorylation, indicating a quiescent metabolic phenotype; the cells treated with EX527 metabolism is very similar to the mesenchymal cells without differentiation induction, depend mainly on the glycolysis. On the other hand, with the FK866 treatment, the oxidative metabolism increases. These results indicate that a correct energetic NAD^+ balance is required for the differentiation to achieve maturation and that SIRT1 inhibits maturation taking the preadipocytes to a quiescent state. Cells treated with the SIRT1 inhibitor, EX527, are not being differentiated. On a global way, the obtained data in this research indicate that SIRT1 promotes the adipogenic lineage commitment through the positive regulation of $\text{PPAR}\gamma$, but possibly stops maturation taking the cells into a quiescent state.

3. Introducción

3.1. Las células troncales.

La definición clásica de célula troncal se basa en dos propiedades clave que las distinguen de otros tipos celulares. La primera de ellas es la habilidad de producir más células troncales, conocida como autorrenovación; la segunda es que, bajo condiciones específicas fisiológicas o experimentales, son capaces de diferenciarse, dando lugar a los tipos celulares que constituyen diferentes órganos y tejidos (1, 2). Una estrategia para llevar a cabo estas dos tareas es la división asimétrica, donde las células troncales se dividen para generar una célula hija troncal y otra que se diferencia. También pueden utilizar la división simétrica, generando células hijas con el mismo destino celular. El balance entre estos dos tipos de división está controlado por señales intrínsecas y extrínsecas para producir un número apropiado de células troncales y diferenciadas, manteniendo la homeostasis tisular y como parte de la reparación e incluso regeneración (2, 3).

A la capacidad de diferenciación de una célula se le conoce como potencialidad, la cual depende, además de las señales a las que están expuestas, del estado de desarrollo. Al comienzo del desarrollo embrionario, justo después de la fecundación, se forma el cigoto, una célula totipotente capaz de generar un organismo completo viable, además de placenta y otros tejidos extraembrionarios, dando origen a todos los tipos celulares del organismo. La totipotencia de estas células dura hasta la etapa blastomérica, aproximadamente 4 días después de la fecundación (4, 5). Dependiendo de su capacidad para generar distintos linajes celulares, se pueden clasificar en (Fig. 1):

- Pluripotentes. *In vivo*, son las células que constituyen la masa interna del blastocisto, se replican indefinidamente y tienen la capacidad de diferenciarse en cualquier tipo celular derivado de las tres capas germinales (ectodermo, endodermo y mesodermo), pero pierden la capacidad de formar placenta u otros tejidos extraembrionarios (6).
- Multipotentes. Residen en casi todos los tejidos del cuerpo durante el desarrollo y en algunos de los organismos adultos. Tienen la capacidad de autorrenovarse por un número de ciclos limitado, y su capacidad de diferenciación es más restringida, por lo que solamente pueden diferenciarse hacia distintos linajes de una misma capa germinal.

- Unipotentes. Son capaces de diferenciarse a un linaje de una sola capa germinal, como es el caso de las células troncales germinales (7).

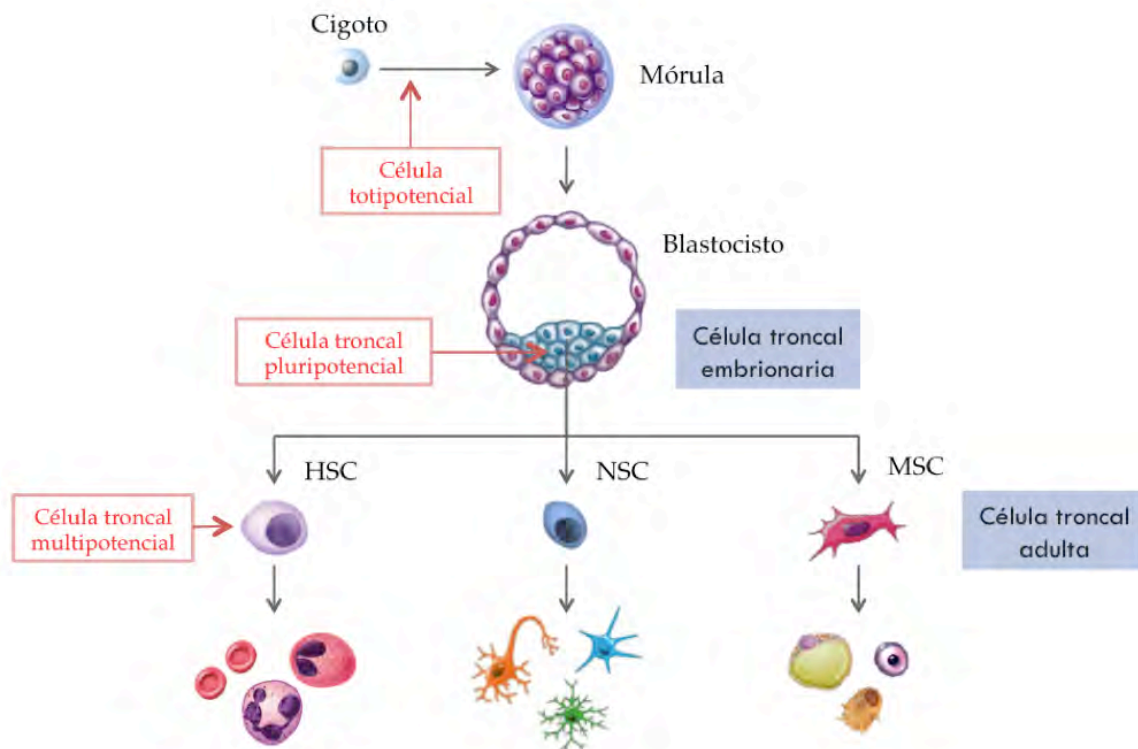


Figura 1. Clasificación de las células troncales de acuerdo a su potencial de diferenciación. La célula totipotencial tiene la capacidad de generar un organismo completo, así como los tejidos extraembrionarios. Las células troncales pluripotenciales, como las células troncales embrionarias, derivan de la masa interna del blastocisto, y pueden dar origen a cualquier tipo celular derivado de las 3 capas germinales (endodermo, mesodermo y ectodermo). Las células troncales multipotenciales o células troncales adultas, generan células del mismo tejido donde se encuentran, como las células troncales hematopoyéticas (HSC), las troncales neurales (NSC) y las troncales mesenquimales (MSC).

3.2. Las células troncales mesenquimales (MSC).

Las células troncales mesenquimales (MSC, por sus siglas en inglés) son células estromales multipotentes capaces de diferenciarse en tejidos mesenquimales, tales como hueso, cartílago, músculo, ligamento, tendón y tejido adiposo, lo que contribuye a la regeneración de estos tejidos. Se localizan principalmente en médula ósea, pero también se pueden aislar de diferentes fuentes, incluyendo tejido adiposo, cordón umbilical, placenta, sangre o pulpas dentales (8).

El estudio de las células troncales mesenquimales (MSC) comenzó a finales de los años sesenta y principios de los setenta, cuando Friedenstein y colaboradores descubrieron una población de células que conformaban un bajo porcentaje de la población celular de la médula ósea (1 a 5 CFU-F por 100,000 células nucleadas) y que daban origen a células del estroma medular, tales como adipocitos, osteoblastos y fibroblastos estromales. Estas células eran clonogénicas, crecían en monocapa y presentaban morfología fibroblastoide, por lo que las definieron como unidades formadoras de colonias de fibroblastos (CFU-F, por sus siglas en inglés). A principios de los noventa, Caplan llamó a estas células como células troncales mesenquimales (MSC), las cuales tienen la capacidad de diferenciarse hacia múltiples tejidos mesenquimales, y varios estudios han encontrado que también pueden diferenciarse en células de linajes de líneas no relacionadas, como células endoteliales, musculares y neuronales, proceso conocido como transdiferenciación. Esta capacidad podría explicarse por el origen del desarrollo de los tejidos mesenquimales, que incluye el mesodermo y, en menor medida, la cresta neural craneal (9-13).

Debido a que no se ha encontrado ningún marcador específico para las MSC, el Comité de Células Troncales Mesenquimales y Tisulares de la Sociedad Internacional de Terapia Celular (ISCT, por sus siglas en inglés) propone los criterios mínimos para definir las MSC humanas. Primero, las MSC deben ser adherentes al plástico cuando se mantienen en condiciones de cultivo estándar. Segundo, más del 95% de la población debe expresar CD105, CD73 y CD90, y carecer ($\leq 2\%$ positivo) de expresión de las moléculas de superficie CD45, CD34, CD14 o CD11b, CD79a o CD19 y HLA-DR. En tercer lugar, las células deben diferenciarse en osteoblastos, adipocitos y condroblastos en condiciones de diferenciación *in vitro* estándar (14).

3.2.1. Propiedades fisiológicas de las MSC.

- Reparación de tejidos.

Las MSC tienen la capacidad de migrar y alojarse en tejidos y órganos, proceso conocido como *homing*. Cuando son administradas de manera sistémica, migran hacia los tejidos lesionados, donde ayudan a la recuperación funcional, inhibiendo la liberación de citocinas proinflamatorias y promoviendo la supervivencia de las células dañadas (15). Además, tienen la capacidad de extravasar debido a que expresan moléculas de adhesión en su superficie, rodando y adhiriéndose a las células endoteliales en respuesta a quimiocinas que provocan la activación de metaloproteasas que degradan la membrana basal (9). Estas células y las demás células troncales adultas, son de gran importancia, ya que contribuyen a la homeostasis de los tejidos compensando la pérdida celular debida a lesiones o al recambio fisiológico normal mediante su capacidad de diferenciación.

- Plasticidad celular.

La plasticidad se refiere a la capacidad de una célula troncal adulta para diferenciarse en tipos celulares distintos a los de la capa germinal de donde se origina. Estudios recientes sugieren que las MSC pueden diferenciarse no solamente en células del mesodermo, sino también pueden adoptar un destino endodérmico (células pancreáticas y hepatocitos) o ectodérmico (astrocitos y neuronas) (16, 17).

- Soporte hematopoyético.

En la médula ósea, las MSC forman la mayor parte del estroma, compuesto por células endoteliales, adipocitos, osteoblastos, fibroblastos y macrófagos. Además de formar la mayor parte de las células estromales, producen moléculas reguladoras de la hematopoyesis y rodean a las células troncales hematopoyéticas (HSC, por sus siglas en inglés) y a su progenie, proporcionando un microambiente protector que apoya el mantenimiento y la autorrenovación de las HSC al protegerlas de la diferenciación y los estímulos apoptóticos. También controla la proliferación y diferenciación de las HSC y la liberación de la progenie madura en el sistema vascular (9, 18).

- Inmunorregulación.

Las MSC poseen propiedades inmunorreguladoras al interactuar con células tanto del sistema inmune innato (células dendríticas, macrófagos y células NK) como del adaptativo (linfocitos T y B), lo que lleva a la modulación de varias funciones efectoras (19).

Está demostrado que las MSC inhiben la maduración de las células dendríticas manteniéndolas en un estado inmaduro y disminuyendo la diferenciación de los monocitos, de tal manera que disminuyen su capacidad para estimular a los linfocitos T (20). Además, inhiben la proliferación de los linfocitos T activados, lo que conduce a la disminución en la producción de IFN γ y al aumento en la producción de IL-4 por parte de las células T cooperadoras (Th2), lo que produce un cambio de un estado proinflamatorio (productor de IFN γ) a un estado anti-inflamatorio (productor de IL-4). De esta manera, las MSC pueden regular la intensidad de la respuesta inmune (19, 21).

3.3. Diferenciación adipogénica.

La adipogénesis es un proceso complejo que implica una serie de eventos de expresión génica regulados temporalmente, dando como resultado el desarrollo de adipocitos maduros totalmente diferenciados a partir de células precursoras, como las MSC (22, 23).

Para fines prácticos de su estudio, la adipogénesis se divide en dos fases: la determinación o compromiso del linaje, que involucra el compromiso hacia el linaje adipogénico, convirtiendo a una célula troncal mesenquimal en un pre-adipocito, el cual no se distingue morfológicamente de su célula precursora, pero que ha perdido el potencial para diferenciarse en otros tipos celulares. En la segunda fase, conocida como diferenciación terminal o maduración, el pre-adipocito adquiere todas las características de un adipocito maduro funcional, adquiriendo vesículas lipídicas y la capacidad de responder a hormonas como la insulina. La diferenciación terminal está bien caracterizada y consiste en una cascada de eventos transcripcionales (23, 24).

La cascada transcripcional inicia con la inducción transitoria de C/EBP β y C/EBP δ (CCAAT/proteína de unión a potenciador-b, -d), que inducen directamente la expresión de C/EBP α y de PPAR γ (receptor- γ activado por el proliferador de peroxisomas), los reguladores centrales de la adipogénesis. Posteriormente, C/EBP α y PPAR γ se retroalimentan para inducir su propia expresión, además de activar los genes cuya expresión define a los adipocitos diferenciados (Fig. 2) (23).

Esta cascada también puede comenzar con la activación de los miembros de la familia de los factores de transcripción de la proteína-1 activadora (AP-1) e inducir la expresión de PPAR γ . Dentro de los factores de transcripción que facilitan la maduración de los adipocitos, se encuentran los STAT, algunos miembros de la familia de proteínas KLF, el elemento de respuesta a los esteroides: proteína de unión 1 (SREBP-1) y otros miembros de la familia C/EBP. También hay potentes represores negativos de la diferenciación de adipocitos, incluido el factor 1 de los preadipocitos (Pref. 1) y los miembros de las familias GATA y Wnt (25).

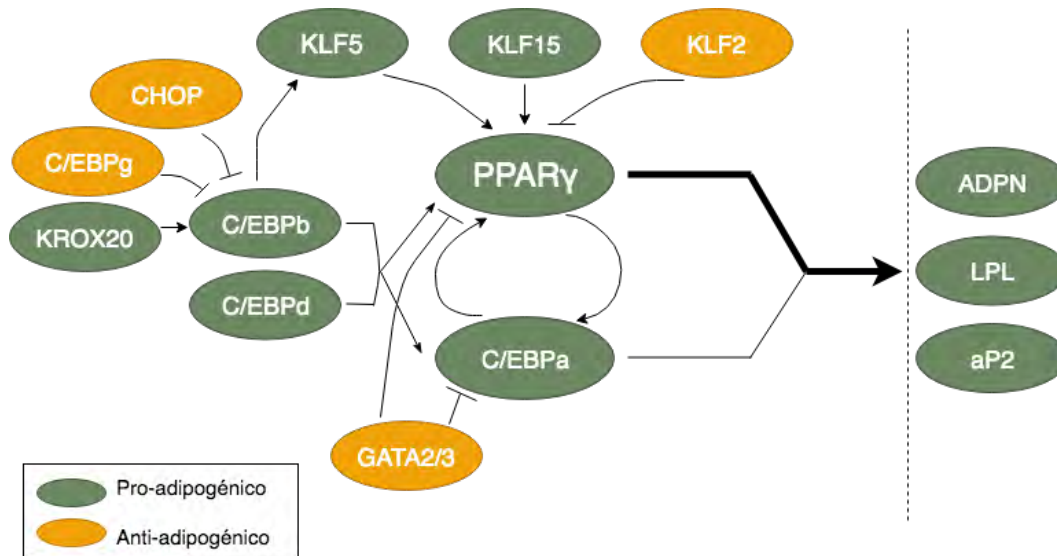


Figura 2. Cascada transcripcional que regula la adipogénesis. PPAR γ es el regulador maestro de la adipogénesis, por lo que los factores pro-adipogénicos (verde) y anti-adipogénicos (amarillo) regulan su expresión. Para que la adipogénesis se lleve a cabo, PPAR γ y C/EBP α se activan y auto-inducen su expresión y posteriormente la de los genes de diferenciación adipogénica tardía, como adiponectina (ADPN), lipoproteín lipasa (LPL) y la proteína de unión a ácidos grasos (aP2) . Modificado de (23).

3.3.1. Efectores positivos de la adipogénesis.

C/EBPs: Los C/EBPs son una familia de factores de transcripción que poseen un dominio de cierre de leucinas que les permite interactuar con otros miembros de la familia para homodimerizar o heterodimerizar. Está compuesta por seis isoformas, dentro de las cuales C/EBPa, C/EBPb y C/EBPd promueven la diferenciación adipogénica. La expresión de estos factores es temporal y muy temprana durante la diferenciación, e inicia con la expresión de C/EBPb y C/EBPd los cuales inducen a C/EBPa, que a su vez induce directamente genes de adipocitos y a PPAR γ . A pesar de que estos factores de transcripción participan en la adipogénesis, no pueden funcionar en ausencia de PPAR γ . Sin embargo, se ha visto que la expresión de C/EBPa es necesaria para la adquisición de la sensibilidad a la insulina (23, 25).

KLFs: La familia de factores de transcripción similares a Krüppel (KLF, por sus siglas en inglés) son proteínas con dominios de dedos de zinc C₂H₂, implicados en el desarrollo, la apoptosis, la proliferación y la diferenciación celular. Esta familia está compuesta por 17 miembros, de los cuales KLF4, 5, 6 y 15 regulan positivamente la adipogénesis, mientras que KLF2 y KLF7 regulan negativamente, reprimiendo el promotor de PPAR γ 2. KLF15 promueve la diferenciación adipogénica induciendo a PPAR γ y la expresión del transportador de glucosa GLUT4, KLF5 se induce durante las primeras etapas de la diferenciación por C/EBPb y C/EBPd, activando el promotor de PPAR γ 2, y KLF6 inhibe la expresión del factor anti-adipogénico PEF-1 (23, 25).

PPAR γ : Los receptores activados por proliferador de peroxisomas (PPAR, por sus siglas en inglés) son factores de transcripción dependientes de ligando que pertenecen a la familia de receptores hormonales nucleares. Esta familia está compuesta por PPAR α , PPAR β/δ y PPAR γ , codificados por genes ubicados en distintos cromosomas (26).

PPAR γ modula la expresión de varios genes que juegan un papel central en el metabolismo de la glucosa, los lípidos y el colesterol, en la angiogénesis, la proliferación y la diferenciación celular (26, 27). En particular, PPAR γ es conocido como el regulador maestro de la adipogénesis, ya que es necesario y suficiente para la adipogénesis *in vivo* e *in vitro*, regula la transcripción de un gran número de genes implicados en la diferenciación y la acumulación de lípidos. Su expresión forzada es suficiente para inducir la diferenciación adipogénica y no se ha descubierto ningún factor que promueva la adipogénesis en su ausencia. De hecho, la mayoría de los represores y activadores

adipogénicos modulan la expresión y/o actividad de PPAR γ . Los factores pro-adipogénicos funcionan activando la expresión o actividad de PPAR γ , por ejemplo, los factores C/EBP β , C/EBP δ , EBF1 y KLF5C inducen al menos uno de los dos promotores de PPAR γ . Por el contrario, los factores anti-adipogénicos GATA2, KLF2 y CHOP atenúan su expresión. Además, las vías de señalización para la adipogénesis convergen en la regulación de la expresión o actividad de PPAR γ (23, 25).

El gen PPAR γ humano está compuesto por nueve exones y, por el uso de un promotor distinto y el *splicing* alternativo, genera cuatro variantes de RNAm (*PPARG1*, *PPARG2*, *PPARG3* y *PPARG4*). Estas variantes cuentan con diferentes regiones UTRs, seguidas de seis exones. A pesar de estas variaciones, este gen codifica sólo dos isoformas de proteína, *PPARG1*, *PPARG3* y *PPARG4* codifican la misma proteína PPAR γ 1, mientras que el mensajero *PPARG2* produce la proteína PPAR γ 2, compuesta por 28 aminoácidos más en el extremo amino terminal (Fig. 3). PPAR γ 1 se expresa en tejido adiposo, hígado, corazón y músculo esquelético, mientras que la expresión de PPAR γ 2 está restringida únicamente al tejido adiposo (26, 27).

Se piensa que tanto la isoforma PPAR γ 1 como PPAR γ 2 son esenciales y ambas se inducen durante la diferenciación adipogénica. Promueven la adipogénesis robusta, sin embargo, su contribución relativa aún no está clara, pero se ha demostrado una mayor capacidad de PPAR γ 2 para inducir adipogénesis debida a que es más sensible a sus ligandos y presenta una mayor capacidad para unirse a los componentes del complejo DRIP/TRAP (23, 25).

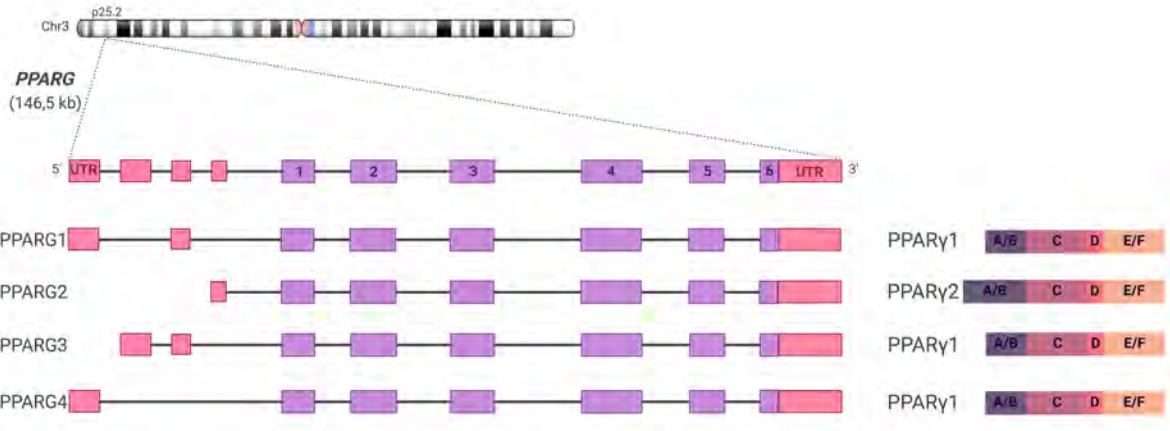


Figura 3. Gen, transcritos y proteínas PPAR γ de humano. El gen *PPAR γ* está compuesto por 9 exones, genera 4 variantes de RNAm (izquierda), las cuales codifican para dos isoformas proteicas, PPAR γ 1 y PPAR γ 2 (derecha). Modificado de (28).

3.4. El nicho de las células troncales.

En 1978, Schofield propuso la hipótesis del nicho y utilizó por primera vez este término para describir el microambiente especializado que mantiene la troncalidad y previene la diferenciación de las células troncales (29). Se refiere al lugar anatómico que protege a las células troncales de una proliferación exacerbada. Integra las señales para el balance entre los requerimientos del organismo y las respuestas de las células troncales para la regeneración tisular, reemplazando las células perdidas debido a la apoptosis, lesiones o patologías, y la homeostasis, permitiendo el recambio celular en un determinado tiempo (30).

El nicho de las células troncales adultas varía en composición, estructura y ubicación según el tipo de tejido. Además de macrófagos, células endoteliales, adipocitos y osteoblastos, dependiendo si se encuentran en la zona endosteal/trabecular o vascular, las células troncales mesenquimales forman parte del nicho de la célula troncal hematopoyética, localizándose principalmente en médula ósea, al interior de la epífisis de los huesos largos y de los huesos planos en el humano. Dan origen a la mayoría de las células estromales de su nicho (30, 31).

La presión parcial de oxígeno (pO₂) del aire inhalado (160 mm Hg, equivalente al 21% de oxígeno) disminuye progresivamente a medida que viaja en la sangre por todo el organismo. Cuando llega a los órganos y tejidos, los niveles de pO₂ se han reducido a 14–65 mm Hg (2% –9% de oxígeno), constituyendo una normoxia fisiológica.

La baja tensión de oxígeno (hipoxia) se considera comúnmente como una característica del nicho para mantener la quiescencia de las células troncales (Fig. 4). La pO₂ dentro de los tejidos se considera hipoxia comparándola con el ambiente, debido al análisis proteómico y a la expresión del factor de transcripción HIF-1. Específicamente en el nicho de las MSC, utilizando un sensor de oxígeno y microscopía multifotónica en la médula ósea de ratones, se encontró un promedio de 20.4 mmHg (2.7% de oxígeno) (32, 33).

El metabolismo está sujeto a cierto grado de estrés oxidativo a través de la generación de especies reactivas de oxígeno que pueden dañar el DNA.

Por tanto, podría ser que la necesidad de evitar estrés oxidativo en las células troncales explicara su fenotipo metabólico, ya que utilizan principalmente la glucólisis aerobia para generar ATP, mientras mantienen la fosforilación oxidativa y las demás rutas mitocondriales a una tasa mínima.

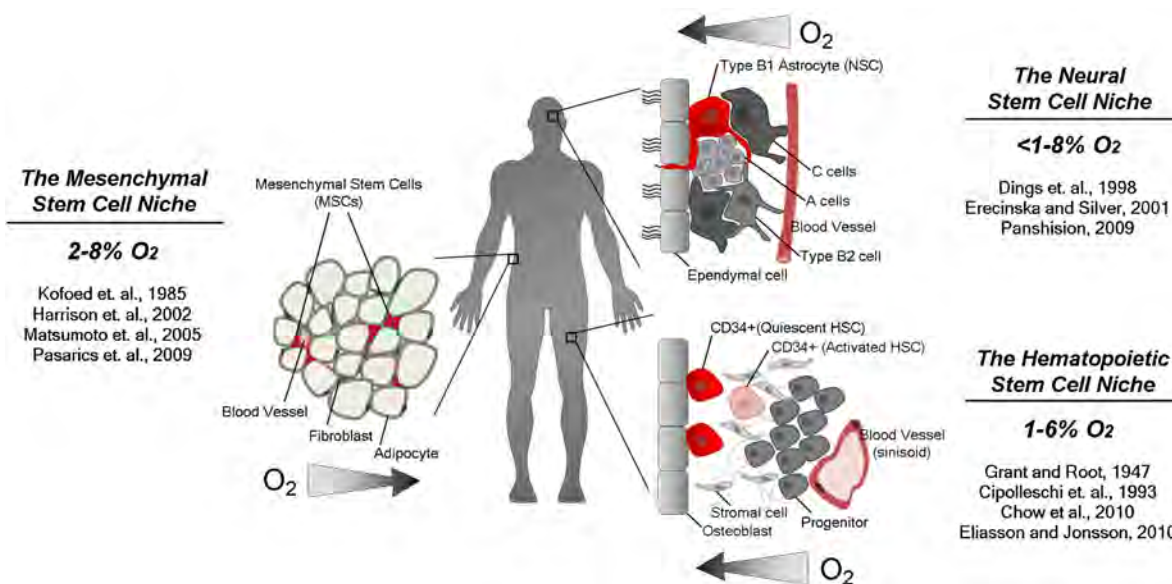


Figura 4. Los nichos de distintas células troncales tienen bajos niveles de oxígeno. Se sabe que las células troncales residen en un nicho hipóxico debido a distintos reportes de mediciones de presión parcial de oxígeno en el nicho de MSC derivadas de tejido adiposo y médula ósea, HSC, y NSC (células de color rojo). Tomado de (33).

3.5. El metabolismo de las células troncales.

El nicho de las células troncales las protege de su reducción en número, al prevenir su proliferación exacerbada. Constituye una unidad básica del tejido, e integra señales que median el balance entre los requerimientos del organismo y las respuestas de las células troncales para procesos de generación de tejidos, homeostasis y reparación (31).

Las células troncales pluripotentes y multipotentes, residen en un nicho de baja tensión de oxígeno que podría explicar su fenotipo metabólico, caracterizado por altos niveles de consumo de glucosa, combinado con la producción de lactato. De manera interesante, este patrón metabólico se mantiene en condiciones de normoxia ambiental, lo que lo diferencia de la glucólisis anaeróbica, y se denomina glucólisis aeróbica, similar al llamado “efecto Warburg” presente en las células cancerosas, donde hay una actividad aumentada de la ruta de las pentosas fosfato (PPP), la cual permite la síntesis rápida de nucleótidos para la proliferación celular a través de la producción de ribosa-5-fosfato, y además protege a las células del estrés oxidativo mediante la producción de NADPH, necesario para la regeneración del glutatión y para una ruta alternativa a la glucólisis. A diferencia de las células troncales embrionarias proliferativas, las células troncales adultas, como las MSC, se encuentran en un estado quiescente, por lo que utilizan la vía de las pentosas fosfato para generar la ribosa necesaria para la síntesis de DNA, RNA y de NADPH requerido para la biosíntesis de lípidos y otras moléculas complejas más que para la proliferación (34). También utilizan la glucólisis aeróbica para evitar la diferenciación y el daño celular por las especies reactivas de oxígeno (ROS) (35, 36). De hecho, tienen una baja masa mitocondrial y una morfología mitocondrial inmadura, pobres en crestas y baja tasa de fosforilación oxidativa (35). Específicamente, las MSC humanas presentan un fenotipo metabólico glucolítico en un estado basal (37). El metabolismo glucolítico no genera tanto ATP como la fosforilación oxidativa, pero puede igualarlo gracias al aumento del flujo de glucosa (Fig. 5).

La diferenciación celular es un proceso que requiere mucha energía y, por lo tanto, se espera que afecte y se vea afectado por el metabolismo energético. El estado bioenergético de una célula depende de la calidad y la abundancia de las mitocondrias, las principales productoras de energía en las células (38).

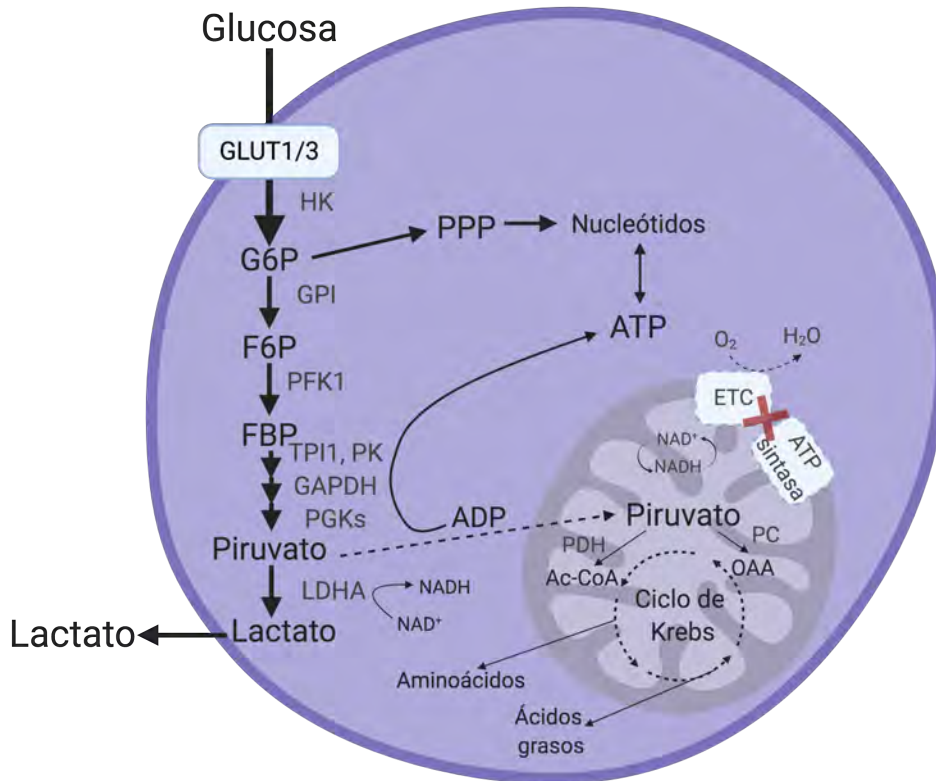


Figura 5. El metabolismo de las células troncales multipotentes. En las células troncales el flujo de glucosa está aumentado debido a la sobreexpresión de los transportadores de glucosa y de las enzimas glucolíticas, utilizan el piruvato como su mayor fuente de energía y de carbono a través de la piruvato deshidrogenasa (PDH), la vía de las pentosas fosfato (PPP) está aumentada para la síntesis de nucleótidos. La ATP sintasa está desacoplada de la cadena de transporte de electrones y las rutas mitocondriales se encuentran en una tasa mínima, de hecho, presentan pocas mitocondrias pobres en crestas.

La diferenciación de las células troncales está acompañada de cambios morfológicos importantes en las mitocondrias, que conducen a mitocondrias alargadas con crestas bien definidas. Además, presentan un cambio en la utilización del sustrato metabólico durante la diferenciación, un proceso que ha sido denominado reprogramación metabólica (39-42).

En el caso de las MSC, esta transición se da desde un metabolismo predominantemente glucolítico hacia uno basado en la fosforilación oxidativa (42). El flujo glucolítico disminuye drásticamente, el metabolismo Thr-Gly se extingue y el ATP es generado principalmente a través de la fosforilación oxidativa en las mitocondrias (43, 44) (Fig. 6).

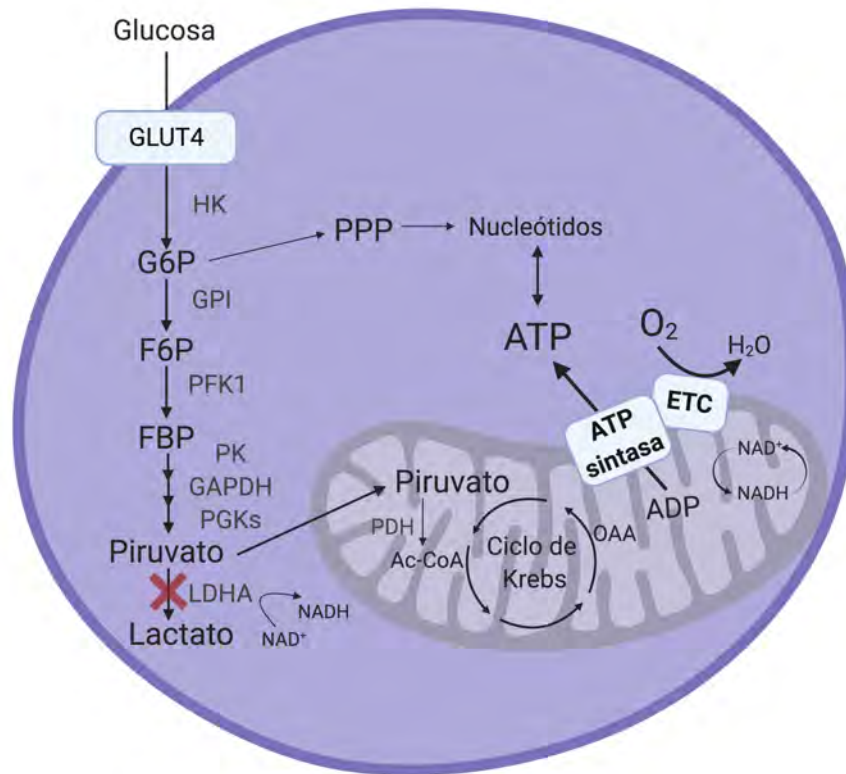


Figura 6. El metabolismo de las células troncales diferenciadas. El flujo de glucosa disminuye y como consecuencia la ruta de las pentosas fosfato. La glucólisis se acopla al ciclo de Krebs, lo que detiene la producción de lactato, y la ATP sintasa se acopla a la cadena de transporte de electrones, aumentando la tasa de consumo de oxígeno.

Durante la diferenciación osteogénica de las MSC, aumenta el número de copias de DNAm_t, los niveles de RNAm de genes asociados a la biogénesis mitocondrial y los niveles de proteína de enzimas respiratorias. Lo cual provoca un aumento en la tasa de consumo de oxígeno y en la producción de ATP, y se acompaña de una dramática disminución de ROS intracelular debida al aumento de enzimas antioxidantes. Esto indica que las mitocondrias de las MSC se mantienen a un nivel de actividad relativamente bajo, y durante la inducción osteogénica, las funciones respiratorias mitocondriales aumentan en respuesta a una mayor demanda de energía (45).

En relación con los osteoblastos diferenciados dentro de la médula ósea, las MSC dependen más de la glucólisis que los osteoblastos.

En las MSC humanas, los niveles de mensajero de *PGC-1α*, un coactivador transcripcional que promueve la biogénesis mitocondrial, aumentan significativamente en adipogénesis, osteogénesis y condrogénesis. Los mecanismos moleculares implicados en la biogénesis mitocondrial no están completamente caracterizados, pero implican a *PGC-1α*, debido a

que se ha encontrado una sobrerregulación muy temprana durante la fase de compromiso del linaje adipogénico (38). La evidencia sugiere que las mitocondrias son vitales para la homeostasis metabólica en los adipocitos debido a su participación en la síntesis y esterificación de ácidos grasos y la lipólisis. De hecho, la inhibición de la cadena de transporte de electrones suprime la diferenciación adipogénica en MSC humanas de médula ósea, y al inhibir la función mitocondrial, se suprime significativamente la adipogénesis. Por lo anterior queda claro que el aumento de la actividad mitocondrial es un requisito previo para la diferenciación de las MSC en adipocitos (46). Por estas evidencias, se considera que la reprogramación metabólica no sólo es una consecuencia, sino una causa del compromiso del linaje en la diferenciación de las MSC (38).

Varios componentes del metabolismo mitocondrial y de la respiración regulan diferentes aspectos de la diferenciación de células troncales a través de moléculas de señalización, y de moduladores transcripcionales, proteicos y epigenéticos. Por ejemplo, se sabe que el aumento de ROS a través de la fosforilación oxidativa es un mecanismo fisiológico para activar la diferenciación celular (47, 48). Además, algunos metabolitos intermedios generados en el ciclo de Krebs son importantes para determinar el destino celular, como el citrato y el oxaloacetato para la síntesis *de novo* de lípidos y nucleótidos; o el acetil CoA y el α -ceto-glutarato para la acetilación y metilación de histonas (49). Además, el catabolismo de treonina es importante para sintetizar s-adenosilmetionina, necesario para mantener la metilación de histonas (47).

Al activarse las rutas metabólicas mitocondriales se adquiere un metabolismo más oxidativo y aumenta la producción de NAD^+ , y los niveles de NAD^+ también pueden influir en el epigenoma (39, 50), y modular el destino de las células troncales al afectar la actividad de las proteínas dependientes de NAD^+ , como sirtuínas y las PARPs (42).

3.6. Nicotinamida adenina dinucleótido (NAD⁺).

La nicotinamida adenina dinucleótido (NAD⁺) es un metabolito involucrado en una gran variedad de rutas oxidativas, tales como la glucólisis, el ciclo de Krebs y la beta-oxidación de ácidos grasos, donde funciona como aceptor de electrones generando su forma reducida, el NADH. Importantemente, el NADH es esencial para la generación de ATP a través de la fosforilación oxidativa (51).

En la cadena transportadora de electrones, el NADH mitocondrial se oxida al donar sus electrones al Complejo I (NADH:ubiquinona oxidoreductasa). Los electrones generados en este proceso de oxidación se transmiten secuencialmente desde el Complejo I al Complejo III (Coenzima Q-citocromo C oxidoreductasa), citocromo C y Complejo IV (citocromo C oxidasa), lo que resulta en la reducción de oxígeno en agua. A lo largo de estos procesos, un gradiente de protones es generado en el espacio intermembranal de la mitocondria, cuyo potencial es utilizado por el complejo V (ATP sintasa) para generar ATP a partir de ADP (Fig. 7).

En el citoplasma, la glucosa se convierte en piruvato a través de la glucólisis. En este proceso, la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) requiere dos moléculas de NAD⁺ por molécula de glucosa para oxidar el gliceraldehído-3-fosfato a 1,3-bifosfoglicerato. Posteriormente, el NADH y el piruvato producidos durante la glucólisis se transportan desde el citoplasma a la matriz mitocondrial para proporcionar equivalentes reductores para el ciclo de los ácidos tricarbónicos y la cadena de transporte de electrones. El transporte mitocondrial de NADH se realiza mediante lanzaderas redox NAD⁺/NADH, más comúnmente la malato-aspartato (52).

Debido a que el ciclo de los ácidos tricarbónicos y la cadena de transporte de electrones requieren NAD⁺ y NADH, respectivamente, se necesita una relación NAD/NADH óptima para un metabolismo mitocondrial eficiente. Si bien las proporciones citoplásmicas de NAD⁺/NADH oscilan entre 60 y 700 en una célula eucariótica típica, las proporciones mitocondriales de NAD⁺/NADH se mantienen entre 7 y 8 (53).

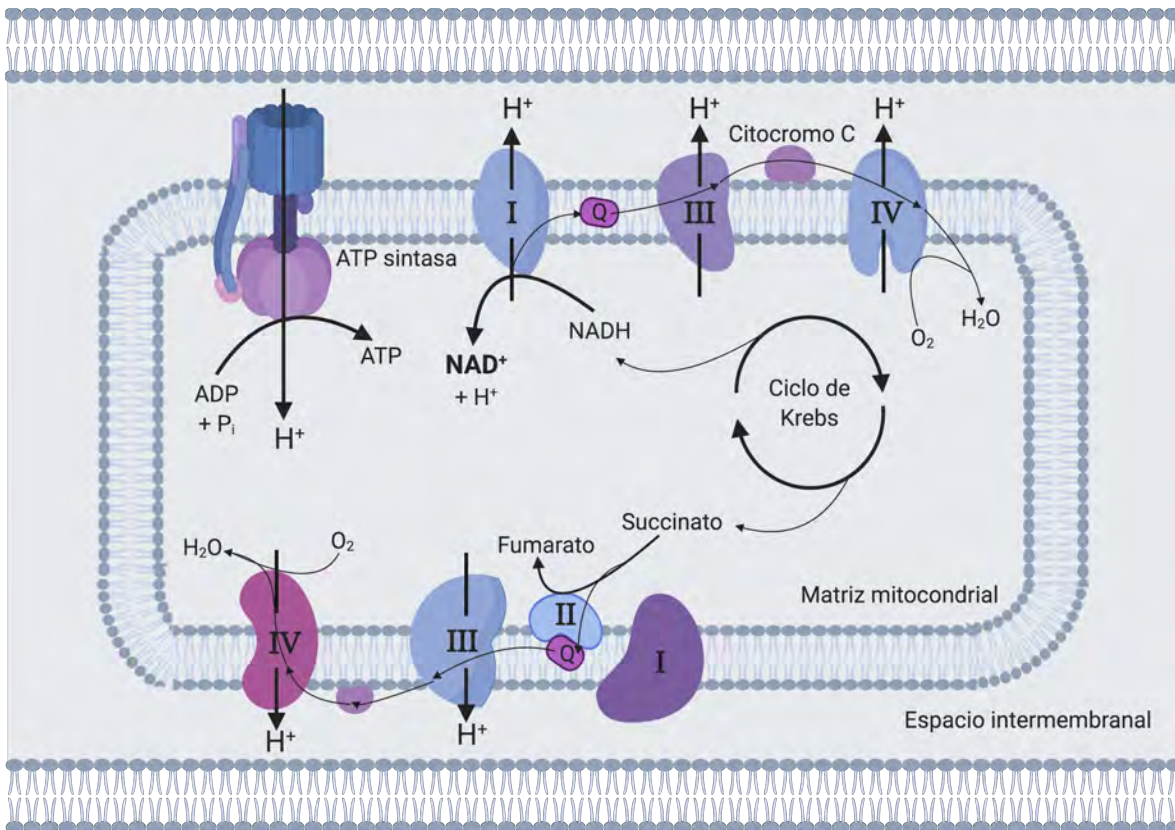


Figura 7. Cadena de transporte de electrones. El NADH mitocondrial se oxida al donar sus electrones al Complejo I. Los electrones generados en este proceso de oxidación se transmiten secuencialmente desde el Complejo I a Complejo III, citocromo C y Complejo IV, lo que resulta en la reducción de oxígeno en agua. Se genera un gradiente de protones en el espacio intermembranal de la mitocondria, cuyo potencial es utilizado por la ATP sintasa para generar ATP a partir de ADP.

3.6.1. Rutas biosintéticas de NAD⁺.

En mamíferos, la biosíntesis de NAD⁺ puede realizarse a través de la ruta de síntesis *de novo* a partir de triptófano (TRP), y las rutas de salvamento a partir de cualquiera de las formas de la vitamina B3, nicotinamida (NAM) o ácido nicotínico (NA), o de la conversión de nicotinamida ribósido (NR). Generalmente, se considera que la principal fuente de NAD⁺ proviene de las vías de salvamento, que requieren la absorción de precursores de NAD⁺ de la dieta (54). Juntas, estas vías generan una concentración celular de NAD⁺ de 300 a 800 μ M, dependiendo del tejido u órgano. La NAM tiene mayor capacidad de estimular la biosíntesis de NAD⁺ que el NA en múltiples órganos (55). La nicotinamida fosforribosiltransferasa (NAMPT), es la enzima limitante de la velocidad en la vía biosintética NAD⁺. Esta enzima convierte NAM y 5-fosforribosil-pirofosfato en un intermedio de NAD⁺, la nicotinamida mononucleótido (NMN). La NMN es adenilada para convertirse en NAD⁺, por las enzimas nicotinamida mononucleótido adenilil transferasas 1-3 (NMNAT1-3)

(Fig. 8). Importantemente, se considera que los niveles de la enzima limitante NAMPT controla la velocidad de la ruta de rescate del NAD^+ y en consecuencia, su biodisponibilidad (56).

El último paso de la formación de NAD^+ en las rutas de rescate, es catalizado por las enzimas NMNATs. En los mamíferos, hay tres isoformas de esta enzima, NMNAT1-3, que difieren en su localización subcelular. Así, la NMNAT1 se localiza en el núcleo, NMNAT2 en el aparato de Golgi y el citoplasma, y NMNAT3 en las mitocondrias (56, 57).

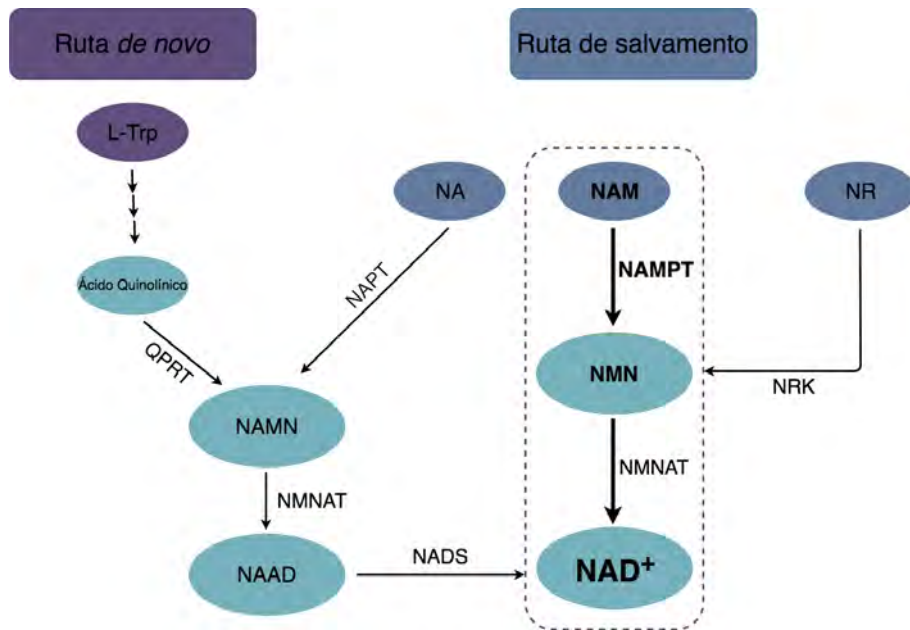


Figura 8. Rutas biosintéticas del NAD^+ en mamíferos. La biosíntesis de NAD^+ se puede dar a través de la ruta de síntesis *de novo* a partir de triptófano, y de la ruta de salvamento a partir de nicotinamida (NAM) o del ácido nicotínico (NA). La nicotinamida fosforribosiltransferasa (NAMPT), la enzima limitante, convierte NAM y 5-fosforribosil-pirofosfato en nicotinamida mononucleótido (NMN). La NMN es adenilada para convertirse en NAD^+ , por las enzimas nicotinamida mononucleótido adenilil transferasas 1-3 (NMNAT1-3). El último paso es catalizado por las NMNATs. Modificado de (58).

El NAD^+ es por tanto una coenzima que media muchas reacciones redox, pero también juega un papel importante en la regulación de enzimas que consumen NAD^+ , incluyendo sirtuínas, poli-ADP-ribosa polimerasas (PARP) y ciertas ectoenzimas (51, 53). En particular, funciona como un cofactor obligado para las enzimas desacetilasas de histonas de clase III (HDAC) conocidas como sirtuínas, las cuales están involucradas en el control epigenético (51).

3.7. La familia de las sirtuínas.

Las sirtuínas son desacetilasas de histonas de clase III (HDAC, por sus siglas en inglés), que difieren de las de clase I, II y IV en que requieren NAD⁺ como cofactor para su actividad enzimática. La primer sirtuína descubierta y de la cual derivan su nombre es Sir2 (regulador de información silenciada 2), identificada en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* como un regulador de la recombinación del DNA ribosomal, el silenciamiento de genes, la reparación del DNA, la estabilidad cromosómica y la longevidad. Las sirtuínas de los mamíferos no solo tienen blancos histónicos, sino que también desacetilan otras proteínas en distintos compartimentos celulares. (51, 53). En mamíferos, esta familia está compuesta por siete miembros, SIRT1–7, las cuales mantienen la homeostasis energética regulando el metabolismo de las grasas y de la glucosa en respuesta a cambios fisiológicos, como el ayuno, el daño a DNA y el estrés oxidativo. En general, su activación desencadena programas de transcripción nuclear que mejoran la eficiencia metabólica y regulan positivamente el metabolismo oxidativo mitocondrial (51, 53).

Las sirtuínas son una familia de proteínas altamente conservada, ya que se encuentran presentes en todos los clados de la vida. El análisis filogenético de 60 dominios centrales catalíticos de distintos organismos, tanto de eucariontes como de procariontes, permite dividir a las sirtuínas de los mamíferos en cuatro grupos: grupo I (SIRT1, 2 y 3), grupo II (SIRT4), grupo III (SIRT5), y grupo IV (SIRT6 y 7). Además, presentan distinta localización subcelular, por lo que también difieren en sus blancos de desacetilación. SIRT1, SIRT6 y SIRT7 se encuentran principalmente en el núcleo. Gran parte de SIRT1 se asocia a la eucromatina, pero también se ha detectado su presencia en el citosol, SIRT6 se asocia con la heterocromatina, y SIRT7 se encuentra en el nucleolo. SIRT2 es citosólica, y SIRT3, SIRT4 y SIRT5 se encuentran en las mitocondrias (59, 60).

3.8. Sirtuína 1 (SIRT1).

SIRT1 es la sirtuína más estudiada debido a su papel en la restricción calórica, la prevención de enfermedades relacionadas con el envejecimiento y el mantenimiento de la homeostasis metabólica (59).

SIRT1 facilita la formación de heterocromatina, y, por lo tanto, la represión de genes. Remueve las acetilaciones de las histonas en las posiciones H1K9, H1K26, H3K14 y H4K16, aunque también se han encontrado múltiples blancos no histónicos, como p53, que es reprimida al ser desacetilada, el factor de transcripción PGC1 α , cuya desacetilación lleva

a su activación y expresión de genes mitocondriales, los factores de transcripción FOXO, que son reguladores importantes del metabolismo de los lípidos y la glucosa, entre otras proteínas (59, 61).

La actividad de SIRT1 depende de la concentración de NAD^+ , la cual está determinada por el estado nutricional de la célula, hidrolizándolo durante el proceso de desacetilación de la lisina, y dando lugar a O-acetil-ADP-ribosa y nicotinamida. Durante el ayuno, los niveles de NAD^+ son altos y la actividad de SIRT1 es elevada. Sin embargo, cuando la energía está en exceso, NAD^+ se agota porque el flujo elevado de glucólisis promueve la conversión de NAD^+ en NADH. En general, se piensa que los niveles de SIRT1 no cambian en respuesta a diferentes estados fisiológicos, aunque su expresión es variable en algunos entornos fisiológicos específicos (55, 62).

3.8.1. Funciones de SIRT1.

SIRT1 juega un papel muy importante en el metabolismo energético, promueve la movilización de grasa en el tejido adiposo, reprimiendo los genes adipogénicos *PPAR γ* y *aP2* (proteína de unión a ácidos grasos), y también al reprimir los cofactores de *PPAR γ* NCoR (co-represor del receptor nuclear) y SMRT (mediador de silenciamiento de los receptores de retinoides y hormonas tiroideas) (60, 63).

La sobreexpresión de SIRT1 o su activación farmacológica por moléculas activadoras resulta en la represión transcripcional de *PPAR γ* , y por lo tanto en la inhibición adipogénica, una lipólisis mejorada y liberación de ácidos grasos libres (63).

SIRT1 también regula a adiponectina, una hormona de adipocitos que controla el metabolismo de la glucosa y los lípidos, a través de FOXO1. FOXO1 forma un complejo con C/EBP α en el promotor de adiponectina, SIRT1 desacetila a FOXO1 y mejora esta interacción, por lo que aumenta las concentraciones de adiponectina. Además, durante la restricción calórica, aumentan los niveles de adiponectina, posiblemente mediado por SIRT1. También desacetila a NF- κ B, lo que reduce la inflamación, lo cual se comprobó en condiciones de restricción calórica (Fig. 9) (60).

SIRT1 puede inhibir la apoptosis y promover la supervivencia celular desacetilando varios factores esenciales. Por ejemplo, puede desacetilar ciertos residuos de lisina de la proteína p53, inactivándola y, por lo tanto, reduciendo la apoptosis en respuesta al estrés oxidativo y daño del DNA. SIRT1 también puede desacetilar y activar así a Ku70, factor de reparación de DNA e inhibidor de BAX. Además, SIRT1 puede aumentar la supervivencia celular mediante la desacetilación de los factores de transcripción FOXO (Fig. 9).

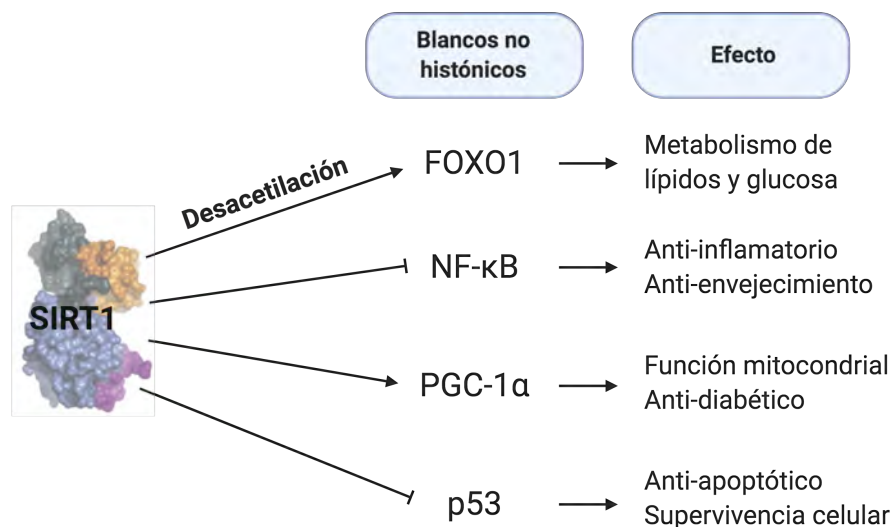


Figura 9. Papel de SIRT1 en las funciones celulares. SIRT1 participa en distintos procesos celulares a través de la desacetilación de distintas proteínas, como FOXO1, NF-κB, PGC-1α y p53, implicadas en obesidad, envejecimiento, inflamación, diabetes y cáncer. Modificado de (64).

Diversos reportes en la literatura indican que SIRT1 podría jugar un papel importante en el desarrollo embrionario, ya que sus niveles de RNAm son altos en corazón, cerebro y médula espinal, además de que los ratones *knockout* SIRT1 muestran defectos de desarrollo. Además, se ha visto implicada en distintos procesos de diferenciación celular, regula negativamente la actividad del cofactor transcripcional p300, cuya desacetilación mediada por SIRT1 es inhibitoria y juega un papel importante en el metabolismo y la diferenciación celular.

Las acetiltransferasas PCAF y GCN5 forman un complejo con SIRT1 y con el factor de transcripción de diferenciación miogénica, MyoD. SIRT1 desacetila las proteínas de este complejo y las marcas H3K9 y H3K14 en los promotores de la cadena pesada de miogenina y miosina, lo que produce un retraso en la diferenciación muscular.

Finalmente, otro estudio en pre-adipocitos de ratón muestra que el resveratrol, considerado activador de SIRT1, promueve la diferenciación de los osteoblastos y disminuyen la formación de adipocitos (60, 65).

SIRT1 también puede regular la transcripción de manera indirecta, promoviendo alteraciones en la metilación de las histonas. Por ejemplo, su reclutamiento y la actividad en los promotores aumenta las marcas H4K20me y H3K9me3, mientras que disminuye H3K79me2. Se sugiere que SIRT1 puede reclutar a la cromatina metiltransferasas, como SUV39H1. SIRT1 también tiene efectos en la metilación del DNA, está asociada a los

promotores de genes supresores de tumores hipermetilados (silenciados) en las células cancerosas, debido a que, en la ruptura de doble cadena de DNA, SIRT1 se une a la región de la ruptura para el reclutamiento de DNA metiltransferas (DNMT3B) y la posterior metilación hereditaria de las islas CpG del promotor del gen (66, 67) (Fig. 10).

Por todo ello, SIRT1 se considera un regulador de la diferenciación de las células troncales, posiblemente relacionado con la reprogramación metabólica (39, 68).

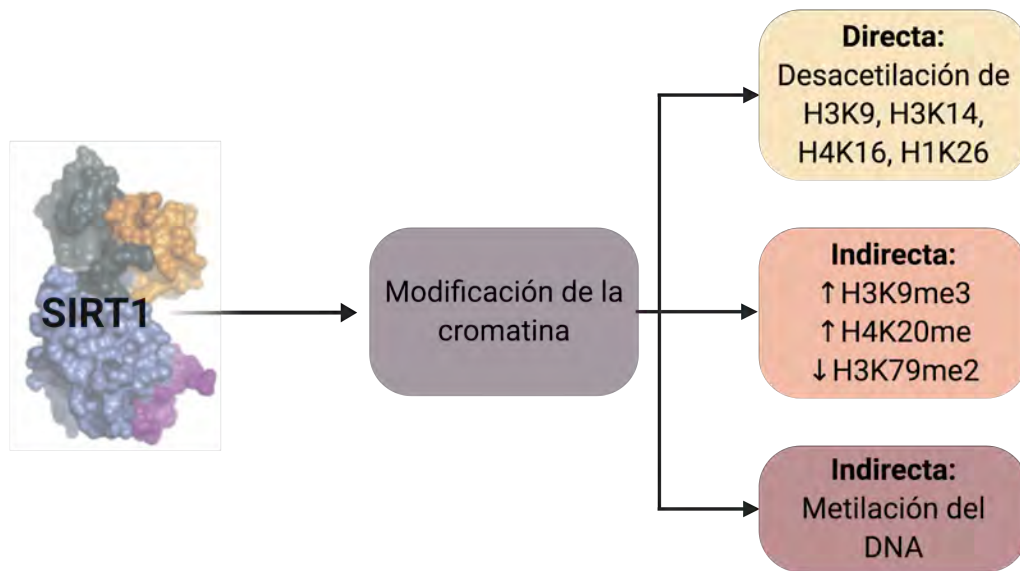


Figura 10. Regulación de la transcripción dependiente de SIRT1 en células de mamíferos. SIRT1 participa en la represión transcripcional y el silenciamiento de la cromatina a través la de desacetilación directa de H3K9, H3K14, H4K16 y H1L26, y de manera indirecta en el aumento de las marcas H3K9me3 y H4K20me y la disminución de H3K79me2. Modificado de (58).

3.8.2. Regulación de SIRT1.

La regulación de SIRT1 se puede dar en distintos niveles: transcripcional, modificaciones postraduccionales, a través de la formación de complejos proteicos y por los niveles de NAD⁺.

El gen *SIRT1* presenta varios sitios de unión para factores de transcripción, por ejemplo, PARP2 se une a su promotor y reprime su expresión. Además, se han caracterizado algunos miRNAs que regulan negativamente los niveles de RNAm de *SIRT1* mediante su degradación o inhibición de la traducción, incluyendo a mir-34a y miR-199a (60).

A nivel postraduccionales, se conoce relativamente poco sobre la regulación de la proteína SIRT1 por modificaciones covalentes; sin embargo, la cinasa JNK fosforila a SIRT1 en tres residuos durante el estrés oxidativo, lo que resulta en la desacetilación de la histona H3, pero no en la de p53, lo que sugiere que la fosforilación de SIRT1 la dirige hacia ciertos objetivos. SIRT1 también se puede regular formando complejos con otras proteínas. Por ejemplo, se sabe que la formación de un complejo con la proteína AROS la regula positivamente, y negativamente la regulan NCoR1 y SMRT, formando un complejo con SIRT1 y PPAR γ durante el ayuno para reprimir la inducción de adipogénesis mediada por PPAR γ (60, 63).

Sin embargo, la regulación de SIRT1 que ha sido más estudiada es mediante los niveles de NAD⁺, ya que depende de este cofactor para llevar a cabo su actividad. En una situación de exceso de nutrientes, los niveles de NAD⁺ están reducidos por la conversión a su forma reducida (NADH). Por ejemplo, durante la glucólisis su disponibilidad está limitada y no puede ser utilizado por SIRT1, y de manera contraria, en el ayuno y el ejercicio, los niveles de NAD⁺ aumentan, lo que activa a SIRT1 (59, 61).

Los niveles de NAD⁺ también pueden disminuir tras la activación de las PARPs por daño al DNA. Se considera que, estas enzimas son las que más NAD⁺ degradan y disminuyen los niveles intracelulares, inhibiendo así a SIRT1 (55).

A nivel farmacológico, dentro de los compuestos que regulan positivamente a SIRT1, se han encontrado varios polifenoles de plantas, en particular el resveratrol, que puede inducir la deacetilación de p53 *in vitro*, además de que el tratamiento de *S. cerevisiae* con este compuesto incrementa la longevidad. Sin embargo, a pesar de los efectos fisiológicos aceptados, existen ciertas dudas en estos resultados, ya que el mecanismo de activación aún no es claro si es directo o indirecto sobre SIRT1 (55, 69). Además, se ha caracterizado a EX527 como un potente inhibidor específico de SIRT1, y que no inhibe ninguna otra de las sirtuínas o desacetilasas. Este inhibidor es competitivo, ya que, ocupa el sitio del NAD⁺

(70). También, el compuesto FK866 se podría considerar un inhibidor de SIRT1, aunque de manera indirecta, ya que inhibe a la enzima limitante de la ruta de rescate del NAD⁺, la NAMPT (71).

3.9. Regulación epigenética de las células troncales.

El significado de la palabra “epigenética” ha ido evolucionando durante los últimos 50 años debido al gran aumento en el conocimiento sobre la regulación de la expresión génica en eucariontes. Se refiere al estudio de los cambios hereditarios mitóticos y/o meióticos en la función genética que no pueden explicarse por cambios en la secuencia del DNA (72). Los mecanismos epigenéticos dirigen la herencia de los patrones de expresión génica sin alterar la secuencia de DNA por medio de modificaciones en la cromatina (73). La cromatina es la estructura en la que el DNA es empaquetado dentro del núcleo celular, su unidad fundamental es el nucleosoma y está compuesto por un octámero de cuatro histonas centrales (H3, H4, H2A, H2B) alrededor de las cuales se envuelven 147 pares de bases del DNA; la interacción de los nucleosomas es regulada por la histona H1 (Fig. 11) (74). Sobre esta estructura fundamental, las proteínas regulatorias modulan el grado de compactación del DNA con los nucleosomas, y en conjunto esta estructura es definida como cromatina (75). Como consecuencia de la organización del genoma en la cromatina, la transcripción y la reparación del DNA son obstaculizadas, por lo que es necesario la remodelación de esta estructura de un estado abierto o cerrado con consecuencias en diversos procesos de la regulación transcripcional que ocurren en el núcleo (76).

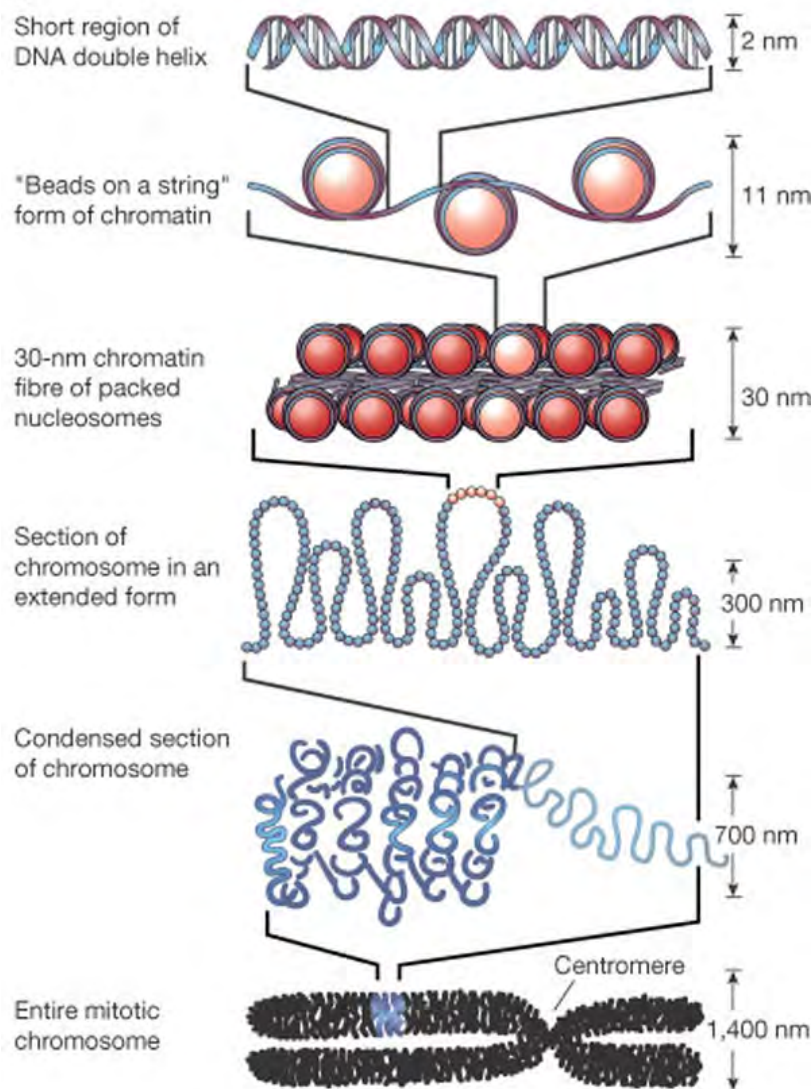


Figura 11. Niveles de empaquetamiento del DNA. El nivel más bajo de empaquetamiento del DNA es el nucleosoma, está compuesto por un octámero de cuatro histonas centrales (H3, H4, H2A, H2B) alrededor de las cuales se envuelven 147 pares de bases del DNA; la interacción de los nucleosomas es regulada por la histona H1. En el siguiente nivel de organización, la cadena de nucleosomas se pliega en una fibra, y estas fibras se pliegan dando origen a otras estructuras superiores, como la cromatina extendida, la cromatina condensada y el cromosoma mitótico. Tomado de (75).

Los mecanismos epigenéticos están altamente regulados por un gran número de proteínas que establecen (writers), leen (readers) y quitan (erasers) marcas epigenéticas específicas, que incluyen la metilación del DNA en dinucleótidos CpG, modificaciones covalentes de histonas, RNAs no codificantes (ncRNA) y otros mecanismos que controlan la organización y grado de empaquetamiento de la cromatina dentro del núcleo de la célula (77).

Las modificaciones postraduccionales de las histonas que sirven como mecanismos epigenéticos, pueden ser modificadas covalente por pequeños grupos químicos en residuos específicos de su secuencia proteica. Entre estas modificaciones se incluyen la acetilación, metilación, fosforilación, ubiquitilación, sumoilación, ADP-ribosilación, isomerización de prolina, citrulinación, butirilación, propionilación y glicosilación (77). La acetilación se asocia con la activación de transcripción, mientras que la metilación de histonas puede promover la activación o represión dependiendo del residuo específico dentro de una histona particular (73).

Todos estos procesos permiten remodelar la estructura tridimensional de la cromatina en el tiempo y bajo ciertas condiciones. De esta manera se establecen los patrones precisos de expresión génica, donde los genes que no se expresan adquieren una configuración de la cromatina cerrada o heterocromatina, y los activos transcripcionalmente adquieren una configuración abierta o eucromatina. La remodelación de la cromatina ocurre muy marcadamente durante la diferenciación, donde ciertas regiones eucromáticas, en particular las asociadas con genes de pluripotencia, se transforman en heterocromatina y, a la inversa, regiones de cromatina específicas, por ejemplo, las asociadas a los genes de diferenciación, se vuelven eucromatina. Por lo tanto, los factores de la cromatina que confieren estas transiciones parecen jugar un papel importante en la autorrenovación de las células troncales y en la determinación del destino celular (78).

3.9.1. Estructura de la cromatina de las células troncales.

La autorrenovación y la diferenciación de las células troncales requiere la activación o el silenciamiento de programas de transcripción específicos, lo cual se logra mediante las redes de factores de transcripción y moduladores epigenéticos que regulan la estructura de la cromatina. Una característica epigenética notable de las células troncales embrionarias es que presentan múltiples dominios de cromatina bivalente, que muestran la superposición de marcas de histonas tanto activadoras (H3K4me3), como represoras (H3K27me3), catalizadas por los complejos proteicos Trithorax y Polycomb, respectivamente. Esta característica permite alcanzar fácilmente un estado activo e inactivo transcripcionalmente (estado abierto o cerrado de la cromatina), en respuesta a la activación de la diferenciación celular (79).

En cuanto a los niveles de modificaciones postraduccionales de las histonas, específicamente en las ESC las marcas represivas H3K9me2/me3 son bajas, y se enriquecen conforme adquieren un linaje específico. Adicionalmente, las células

diferenciadas tienen regiones más extensas con las marcas H3K9me3 y H3K27me3 en comparación con ESC (80). En general, la diferenciación se acompaña de un enriquecimiento progresivo y global de H3K27me3 específica para el tipo celular, por lo que, la represión mediada por Polycomb se considera un mecanismo importante para la determinación del destino celular (81). La mayoría de los dominios bivalentes en las ESC, se pasa a un estado monovalente cuando las células se comprometen en un determinado linaje. Por ejemplo, los dominios bivalentes en los promotores que codifican los factores de transcripción generalmente conservan una sola marca H3K4me3 o H3K27me3 según su linaje (80).

3.9.2. La metilación del DNA en células troncales.

En vertebrados, la metilación del DNA ocurre en la posición 5 de los residuos de citosina del dinucleótido CpG, la cual es catalizada por las DNA metiltransferasas (DNMTs, por sus siglas en inglés). La metilación del DNA ocurre principalmente en la región del promotor de las islas CpG, y comúnmente se asocia con la represión de la expresión génica. Se sabe que, durante la diferenciación celular, los promotores de los genes específicos de pluripotencia se metilan *de novo* y se silencia su expresión (82).

En ESC, la triple mutación de pérdida de función de *Dnmt1*, *Dnmt3a* y *Dnmt3b*, las células se mantienen en un estado indiferenciado, lo cual indica que la metilación del DNA tiene un papel importante en la diferenciación celular (83).

Las MSC derivadas de médula ósea tienen al gen regulador maestro de la osteogénesis (*RUNX2*), hipometilado, mientras que el promotor del gen *PPAR γ* está hipermetilado en los preadipocitos 3T3-L1, pero se desmetila gradualmente tras la inducción de la diferenciación. Interesantemente, la 5-aza-2'-desoxicitidina, un inhibidor de DNMTs, reduce significativamente la diferenciación adipogénica (84, 85). Finalmente, en MSC derivadas de tejido adiposo, los promotores de genes de maduración adipogénica, como leptina, están metilados en preadipocitos, y son hipometilados a lo largo de la adipogénesis. Por lo tanto, la metilación del DNA juega un papel importante en la regulación de la adipogénesis (80, 84).

3.9.3. La acetilación y desacetilación de histonas en células troncales.

La acetilación de histonas ocurre en los residuos de lisina de las cinco histonas (H1, H2A, H2B, H3 y H4) y no sólo regula la transcripción de genes, también afecta la replicación del DNA y la reparación. La transferencia de grupos acetilo a los residuos de lisina de las colas de las histonas por las histona acetiltransferasas (HATs), permite que varios factores de transcripción se unan al DNA y activen la transcripción. La desacetilación de histonas por parte de las histonas desacetilasas (HDACs) promueve la interacción con los silenciadores y se inhibe la transcripción génica (82).

En el caso de las ESC, las HDAC1 y 2 juegan un papel importante. Estas desacetilasas forman complejos con proteínas reguladoras, como Sin3, NURD y CoREST, y mutaciones en estas enzimas no permiten que se inicien los programas de diferenciación celular (86). La inhibición de las HDACs puede promover la expresión de los genes osteogénicos en MSC. La acetilación de histonas en los promotores de genes osteogénicos es una característica de la transcripción activa en la diferenciación osteogénica. Además, la hiperacetilación de H3K9 en el promotor de RUNX2 lleva a una mayor expresión de este gen y, por lo tanto, mayor diferenciación osteogénica (87).

3.9.4. La metilación de histonas en células troncales.

En mamíferos, los residuos de arginina de las histonas pueden ser mono o dimetilados (de manera simétrica o asimétrica). Los residuos de lisina pueden ser mono, di o trimetilados. La metilación de histonas es regulada por las enzimas histona metiltransferasa (HMTs) y las histona desmetilasas (HDMs). El patrón de metilación de histonas está relacionado con los niveles de expresión génica. Por ejemplo, la marca H3K4me3 se asocia a la activación transcripcional, se encuentra en promotores, mientras que H3K27me3 está asociada con la represión génica, se encuentra principalmente en promotores ricos en CpG y en regiones intergénicas. Paralelamente, la H3K9me2 está fuertemente asociada con el silenciamiento génico, y también se encuentra en el cuerpo del gen y en regiones intergénicas, así como en zonas de heterocromatina constitutiva (87).

La metilación de histonas juega un papel importante en la diferenciación de osteoblastos de MSC derivadas de tejido adiposo, la hipermetilación de H3K9 y H3K27 en genes asociados a la osteogénesis está relacionada con la represión de la diferenciación osteogénica (82). Además, en células troncales hematopoyéticas (HSC) humanas, la H3K9me2 aumenta durante el compromiso de linaje (87). Estas evidencias junto con otras muchas que se

encuentran en la literatura, indican el papel regulatorio esencial de las modificaciones postraduccionales de las histonas en la diferenciación celular.

3.9.5. Los RNAs no codificantes en células troncales.

Los RNAs no codificantes (ncRNAs, por sus siglas en inglés) tienen funciones biológicas sobre la regulación transcripcional y son esenciales en el desarrollo embrionario. Los ncRNAs se clasifican en pequeños (menos de 200 nucleótidos) y largos (más de 200 nucleótidos) (82).

El ncRNAs largo TUNA, es necesario para mantener el estado pluripotente de las ESC, mediante la formación de un complejo de RNA-multiproteína, activa la transcripción de *Sox2* y *Nanog* al unirse a sus promotores (88). Además, se ha encontrado que múltiples microRNAs, como miR-550a-5p y miR-146a, promueven la adipogénesis de las MSC derivadas de tejido adiposo (82). Interesantemente, la expresión ectópica de los miRNAs miR-30a y miR-30d reprime la inducción de *PPAR γ* y *C/EBP α* y, por lo tanto, la adipogénesis (85), probablemente debido a que se dirigen al RNAm del factor de transcripción RUNX2 en estas células y lo silencian, favoreciendo así la adipogénesis al bloquear la osteogénesis (85).

4. Justificación

Existen pocos estudios a nivel molecular acerca de la relación entre los cambios en el metabolismo de óxido-reducción y el proceso de diferenciación de las células troncales.

La función de las sirtuínas de clase III está regulada por el estado redox intracelular, ya que su actividad desacetilasa depende de la disponibilidad de su cofactor, NAD⁺. SIRT1 se ha visto implicado en distintos procesos de diferenciación celular, posiblemente relacionado con la reprogramación metabólica. SIRT1 podría ser uno de los enlaces moleculares entre la reprogramación metabólica y la diferenciación celular en la diferenciación adipogénica de MSCs humanas.

5. Hipótesis

Los niveles de actividad y de expresión de SIRT1 durante la diferenciación adipogénica de las células troncales mesenquimales humanas están ligados al incremento del metabolismo oxidativo que se observa durante la diferenciación celular, lo que contribuye a dicho proceso.

6. Objetivos

6.1. Objetivo general.

Definir la influencia que ejerce SIRT1 en el proceso de diferenciación adipogénica de células troncales mesenquimales humanas, y evaluar si la reprogramación metabólica dirige las funciones de SIRT1 durante la diferenciación.

6.2. Objetivos particulares.

1. Diferenciar células troncales mesenquimales de médula ósea humanas en adipocitos.
2. Determinar los patrones de expresión de *SIRT1* durante la diferenciación adipogénica.
3. Determinar la localización subcelular y los niveles relativos de SIRT1 durante la diferenciación adipogénica.
4. Determinar si la activación o inhibición de SIRT1 durante la diferenciación adipogénica afecta al programa de expresión génica y proteica característicos de la diferenciación.
5. Relacionar la reprogramación metabólica a la dinámica de SIRT1 durante la diferenciación adipogénica de las células troncales mesenquimales.

7. Materiales y métodos

7.1. Material biológico.

Todos los experimentos se llevaron a cabo con células troncales mesenquimales de médula ósea de niño obtenidas por consentimiento informado de Centro Médico Nacional, Siglo XXI. Las células mesenquimales fueron caracterizadas previamente según los criterios de la Sociedad Internacional de Terapia Celular, siendo adherentes al plástico, presentan el inmunofenotipo característico, positivas para los marcadores CD73, CD90 y CD105, y negativas para los marcadores hematopoyéticos CD14, CD34 y CD45, además de la capacidad de diferenciación hacia adipocitos, osteoblastos y condrocitos (Fig. S1).

7.2. Diferenciación celular.

Para la diferenciación hacia adipocitos, se sembraron células mesenquimales en placas de 6 pozos (5×10^3 células/cm²) con medio DMEM bajo en glucosa, 10% SFB, 10 µL/ml glutamax, 10 µl/ml penicilina-estreptomicina y 10 µL/ml gentamicina.

Comenzando con las células al 90% de confluencia, se reemplazó el medio DMEM bajo en glucosa por medio comercial de diferenciación adipogénica (StemPro™ Adipogenesis Differentiation Kit, Gibco no. cat. A10070-01) durante 14 ó 16 días, realizando cambios de medio cada 4 días.

7.3. Tratamientos farmacológicos.

Una vez que las células MSC alcanzaron 90% de confluencia, se inició la inducción adipogénica junto con el tratamiento farmacológico correspondiente: NAD⁺ 5 mM (Sigma, no. cat. N7004-1G), FK866 1 nM (Sigma, no. cat. F8557-5MG) y EX527 50 µM (Sigma, no. cat. E7034-5MG).

Para el NAD⁺ 5 mM, se pesaron 315 mg de NAD⁺ y se diluyeron en 9.5 ml de medio de inducción adipogénico para obtener una concentración 50 mM, se agregaron 120 µl de la solución 50 mM, previamente filtrada, en 1080 µl de medio de diferenciación adipogénico por pozo de una placa de 6 pozos.

Para el FK866 1 nM, se pesaron 5 mg de FK866 y se disolvieron en 1.17 ml de DMSO (stock 10 mM), se agregaron 10 µl del stock 10 mM en 9.99 ml de PBS estéril (10 µM), se

tomaron 10 μ l de la dilución 10 μ M en 90 μ l de PBS estéril (1 nM) y, finalmente, se agregaron 1.2 μ l de la solución 1 μ M en 1.2 ml de medio de diferenciación adipogénico por pozo.

Para el EX527 50 μ M, se agregaron 5 mg de EX527 en 1 ml de etanol al 100% (20 mM), posteriormente, se agregaron 3 μ l de la solución 20 mM a 1.2 ml de medio de diferenciación adipogénico por pozo.

Los cambios de medio se realizaron cada 4 días y se adicionaron nuevamente los fármacos.

7.4. Tinción con rojo oleoso.

Se retiró el medio de cultivo y se lavó la placa cuidadosamente con 2 ml de PBS 1X. Se le agregaron 2 ml de formalina al 10% y se dejó incubar durante 1 h a temperatura ambiente. Se desechó la formalina y se lavó cada pozo con 2 ml de agua estéril, se le agregaron 2 ml de isopropanol al 60% y se dejó en incubación durante 5 min., se descartó el isopropanol y se agregaron 2 ml de la solución de rojo oleoso (Oil Red O, Sigma no. cat. O0625-25G) dejando reposar 5 min. La placa se colocó indirectamente al chorro de agua hasta que salió clara. En el caso de la caracterización, se realizó una contratinción con 2 ml de hematoxilina durante un minuto, posteriormente se realizó un lavado y se tomaron las fotografías con la cámara AxioCam ERc 5s del microscopio ZEISS Primovert.

Para la cuantificación se utilizó el software Fiji de ImageJ, donde cada imagen se convirtió a escala de grises 8 bit, se ajustó el umbral donde solamente se vieran las vesículas lipídicas en negro, y se cuantificaron con la herramienta “*analyze particles*” (89). Se realizó el promedio de la fotografía representativa de 3 replicados biológicos (n=3) de cada uno de los tratamientos.

7.5. Extracción de RNA total con tiocinato de guanidina (Trizol).

Se hicieron dos lavados con PBS 1X y se colocaron 500 μ l de Trizol (TRIzol™ Reagent, Invitrogen no. cat. 15596018) a cada pozo de las placas de 6 pozos y se raspó suavemente cada pozo para lisar las células, el lisado con el Trizol se resuspendió bien y se colocó en tubos Eppendorf de 1.5 ml, dejando incubar durante 5 min. a temperatura ambiente. Se agregaron 100 μ l de cloroformo y se mezclaron suavemente por inversión, dejando incubar 3 min. a temperatura ambiente y se centrifugaron a 13,000 rpm durante 15 min. a 4°C. Se obtuvieron 3 fases, de las cuales se tomó, con mucho cuidado, la de hasta arriba (fase

acuosa), que es la que contiene el RNA, y se le adicionaron 250 μ l de isopropanol frío para precipitar, se mezcló con vórtex y se dejó incubar durante 10 min. a temperatura ambiente, se centrifugó a 13,000 rpm durante 20 min. a 4°C, se desechó el sobrenadante y se realizaron 2 lavados con 500 μ l de etanol al 75% frío. Finalmente, se resuspendió el pellet en 20 μ l de agua grado biología molecular. Se cuantificó el RNA total en el Nanodrop y se revisó la pureza por medio de las relaciones 260/280 y 260/230.

Para observar la integridad del RNA, se cargaron 3 μ l de cada muestra y se corrieron a 100 V durante 30 min. en un gel de agarosa al 1.5%.

7.6. Retrotranscripción.

Para la síntesis de cDNA a partir del RNA se utilizó el kit iScript™ cDNA Synthesis de Bio-Rad (no. cat. 1708890). Para cada muestra se tomaron 500 ng de RNA, 2 μ l de 5X iScript Reaction Mix, 0.5 μ l de la enzima iScript Reverse Transcriptase y se llevó a un volumen final de 10 μ l con agua grado biología molecular. Los tubos se colocaron en el termociclador (Axygen MaxyGene™ II Thermal Cycler no. cat. THERM-1000) utilizando el siguiente protocolo: 5 min. a 25°C para el alineamiento de los primers, 20 min. a 46°C para la retrotranscripción, 1 min. a 95°C para la inactivación de la RT y finalmente mantener a 4°C.

El cDNA obtenido se diluyó 1:10 con agua grado biología molecular para obtener una concentración final de cDNA de aproximadamente 5 ng/ μ l. Las muestras se almacenaron a -20°C.

7.7. Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR).

Para las PCRs en tiempo real se utilizó el kit iTaq™ Universal SYBR® Green Supermix (Bio-Rad no. cat. 1725121). Para cada reacción, se colocaron 5 μ l de iTaq Universal SYBR Green Supermix (2X), 1 μ l de cada primer forward y reverse 2.5 μ M, 1.5 μ l de cDNA y 1.5 μ l de agua grado biología molecular. En el termociclador C1000 Touch™ Thermal Cycler de Bio-Rad, se diseñó un protocolo donde subió la temperatura a 95°C durante 30 segundos, seguidos de 45 ciclos de temperatura a 95°C 5 segundos, 30 segundos a 60°C y se realizaron las lecturas en tiempo real. Finalmente, para observar la especificidad de los primers, la temperatura se mantuvo a 65°C durante 31 segundos, en cada ciclo aumentaba 5°C durante 60 ciclos, y se realizaron las lecturas.

Secuencias de primers		
Gen	Forward	Reverse
SIRT1	5'-GCT GGA ACA GGT TGC GGG AA-3'	5'-GGG CAC CTA GGA CAT CGA GGA-3'
Ppar γ	5'-TCC ATG CTG TTA TGG GTG AA-3'	5'-TGT GTC AAC CAT GGT CAT TTC-3'
C/EBP α	5'-CCT AAG GTT GTT CCC CTA GT-3	5'-GAG AGT CTC ATT TTG GCA AG-3
Adiponectina	5'-GAC CAG GAA ACC ACG ACT CA-3'	5'-TTT CAC CGA TGT CTC CCT TAG C-3'
LPL	5'-GTG GCC GAG AGT GAG AAC A-3'	5'-GGA AGG AGT AGG TCT TAT TTG TGG-3
aP2	5'-TGG TTG ATT TTC CAT CCC AT-3	5'-GCC AGG AAT TTG ACG AAG TC-3
RUNX2	5'-TCT TCA CAA ATC CTC CCC-3'	5'-TGG ATT AAA AGG ACT TGG TG-3'
Osteopontina	5'-GAG GGC TTG GTT GTC AGC-3'	5'-CCA TTC TCA TGG TAG TGA GTT TTC C-3'
β -actina	5'-CTT GTA CGC CAA CAC AGT GC-3'	5'-ATA CTC CTG CTT GCT GAT CC-3'

Tabla 1. Secuencias de primers utilizadas en este trabajo.

7.7.1 Método $2^{-\Delta CT}$.

Para el análisis de datos de la PCR en tiempo real se utilizó el método $2^{-\Delta CT}$.

El umbral o *threshold cycle* (CT) es el ciclo en el que el nivel de fluorescencia alcanza una cierta cantidad. Este método utiliza directamente la información de los CTs generados en la qPCR para calcular la expresión génica relativa de las muestras problema y control, que son las muestras de las MSC sin tratamiento, utilizando un gen de referencia como normalizador, en este caso, β -actina, ya que al ser un gen constitutivo o *housekeeping*, sus niveles de expresión permanecen relativamente estables en respuesta a cualquier tratamiento.

Este método asume una eficiencia de amplificación del 100% en todas las muestras. El valor 2 es 1 más una eficiencia de amplificación por PCR de 1 (100%) (90), y posteriormente se eleva a la $-\Delta CT$.

El ΔCT es la diferencia de CT entre los genes problema o control menos los genes de referencia ($\Delta CT = CT$ del gen problema o control - CT de β -actina).

Finalmente, se graficó normalizando a uno el control de las MSC sin diferenciar al día 18 de cultivo.

7.8. Inmunofluorescencias.

Para estandarizar la técnica, se sembraron 7 mil células mesenquimales por pozo en laminillas de 8 pozos (Lab-Tek Chamber slides no. cat. 177445).

Se probaron distintas condiciones de fijación (PFA al 1 ó 4%), permeabilización (PBST al 0.1 ó 0.2%), concentración del anticuerpo primario (SIRT1 1:100 ó 1:500) y bloqueo (BSA al 2% o Suero de caballo al 10%) (Fig. S2).

Se retiró el medio y se hizo un lavado con PBS 1X, se colocaron 200 µl por pozo de paraformaldehído (PFA) a 37°C durante 10 min., posteriormente, se retiró el PFA y se hicieron 3 lavados de 5 min. cada uno con PBS 1X en agitación suave, se permeabilizaron las células durante 15 min. con PBST en agitación suave y se lavaron 3 veces con PBS 1X durante 5 min. Se realizó el bloqueo durante una hora con 500 µl de solución de bloqueo (PBST + BSA al 2%), se retiró la solución de bloqueo y se colocó el anticuerpo primario para SIRT1 (Anti-Sirt1(Sir2) Antibody, Rabbit Polyclonal Antibody, Millipore no. cat. 07-131) diluido en solución de bloqueo, y se dejaron en incubación toda la noche (12 h) a 4°C.

Pasado el tiempo de incubación, se hicieron 3 lavados con PBS 1 X y se colocaron 100 µl del anticuerpo secundario (Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 594, Invitrogen no. cat. R37117) 1:2000 durante 1 h a temperatura ambiente, en agitación suave y protegido de la luz, pasado este tiempo, se realizaron 3 lavados con PBS 1X durante 5 min. Los núcleos de las células se tiñeron con el colorante Hoechst (Hoechst 33342, Invitrogen no. cat. H1399) diluido 1:5000 en PBS 1X, se le agregaron 100 µl a cada pozo y se incubó en agitación y protegido de la luz durante 10 min., se removió la solución y se hicieron 3 lavados con PBS 1X durante 5 min.

Para el montaje, se retiraron las paredes de las laminillas y se le colocó a cada pozo 7 µl de solución de montaje (VECTASHIELD Antifade Mounting Medium Vector, no. cat. H-1000), se les colocó un cubreobjetos y se sellaron con barniz de uñas.

Las micrografías fueron tomadas con el sistema Olympus DP70 Digital Camera en el microscopio de fluorescencia Olympus BX51. Todas las fotografías de los núcleos se tomaron con una exposición de 1/300 s, las de SIRT1 se tomaron con una exposición de 1/200 s, quitando de ambas el fondo.

Las mediciones de la intensidad relativa de fluorescencia y los empalmes de las fotografías fueron realizadas con el software Fiji de ImageJ. Para el análisis densitométrico, se formó un *stack* de cada fotografía de SIRT1 y de los núcleos (Hoechst) correspondientes, utilizando la herramienta *“freehand selection”* se delimitaron los núcleos de las células en las fotografías del Hoechst y se midió la densidad integrada (IntDen) con el menú *“Analyze,*

Measure” en las fotografías de SIRT1. Se midieron 3 células de 4 campos de 2 replicados biológicos y se normalizó a uno el control de las MSC sin diferenciar.

7.9. Western blot.

Extracción de proteína: A partir de células sembradas en placas de seis pozos, se hicieron 2 lavados con 1 ml de PBS 1X, y se colocaron 200 µl de RIPA (con inhibidores de proteasas y fosfatasa), se raspó suavemente cada pozo y se colocó en tubos cónicos de 1.5 ml. Se dejaron incubar en hielo durante 20 min. y se centrifugaron durante 15 min. a 14,000 rpm, posteriormente, se recuperó el sobrenadante.

La proteína se cuantificó mediante el método de Bradford, leyendo a una longitud de onda de 959 nm.

Preparación de las muestras: Se tomó el volumen necesario para 20 µg de proteína, se le agregó 1:20 de DTT, 1:6 de buffer de carga 6X y se llevó a 100 µl con RIPA. Las muestras se calentaron durante 10 min. a 100°C.

Electroforesis: Se cargaron 30 µl de las muestras en un gel de poliacrilamida, gel separador al 10% y gel concentrador al 4%. Se corrió a 100V durante aproximadamente 2 h.

Transferencia: Una vez que las proteínas se separaron por peso molecular, se transfirieron del gel a una membrana de PVDF (Immobion-P, no. cat. IPVH00010) por transferencia húmeda en una cámara de electroforesis. Del lado negativo del cassette del sistema de transferencia se colocaron una esponja, papel filtro, el gel de acrilamida, la membrana de PVDF, papel filtro y esponja, que queda en contacto con el lado positivo del sistema. La transferencia se realizó a 40 mV durante aproximadamente 12 h a 4°C utilizando buffer de transferencia (Tris 48 mM, glicina 39 mM, metanol 20%).

Inmuntinción: Las membranas se bloquearon durante 1 h con leche sin grasa al 5% en TBST 0.05%, posteriormente se cortaron e incubaron con el anticuerpo correspondiente según su peso molecular, el anticuerpo primario PPARγ (Cell Signaling, no. cat. 81B8) 1:1,000 diluido en TBST 0.1% + BSA 5%, y el anticuerpo peroxidado para GAPDH (GeneTex, no. cat. GTX627408-01) 1:20,000 diluido en TBST 0.1%, como control de carga. Se incubaron aproximadamente 12 h a 4°C en agitación suave. Después de la incubación, se hicieron 3 lavados de 10 min. en agitación suave con TBST 0.1%, las membranas para PPARγ se incubaron 2 h con el anticuerpo secundario (HRP-Goat anti-Rabbit IgG (H+L), Invitrogen, no. cat. 65-6120) 1:10,000 diluido en buffer de lavado. Se removió el exceso de anticuerpos haciendo otros 3 lavados de 10 min.

Revelado: Las membranas se incubaron durante un minuto aproximadamente en el sustrato quimioluminiscente HRP (Immobilon Western, Millipore, no. cat. WBKLS0100) y se hicieron 3 tomas de 45s para PPAR γ , y 2 de 45 s para GAPDH en el fotodocumentador de Kodak.

7.10. Seahorse XFe96 Analyzer.

Para estandarizar el ensayo, se sembraron en placas de 96 pozos (Cell Culture Microplate, Agilent Seahorse XF96, no. cat. 101085-004) 5000, 10000 y 15000 células MSC sin diferenciar y con inducción adipogénica hasta el día 8, y se probó una concentración de FCCP 0.25 μ M (Fig. S3A). Posteriormente, se repitió el mismo ensayo con FCCP 0.5 μ M (Fig. S3B). Para estandarizar la concentración de oligomicina se probó 1 μ M, 1.5 μ M y 2 μ M (Fig. S3C).

Los ensayos se realizaron los días 4, 8, 12 y 16 de la inducción adipogénica. Se sembraron 10,000 MSC por pozo y se trataron con el medio de inducción adipogénico y los fármacos (NAD⁺, FK866 o EX527).

Un día antes de realizar cada prueba, se preparó el cartucho con 200 μ l de solución calibradora (XF Calibrant, Agilent Seahorse) por pozo y se dejó incubando sin CO₂, el día a realizar cada prueba, se cambió el medio por medio basal sin rojo fenol (XF Base Medium, Agilent Seahorse, no. cat. 103335-100) suplementado con 10 mM de glucosa, 2 mM de glutamina, 1 mM de piruvato, pH 7.4.

Primero se lavaron las células con 200 μ l de medio basal y se dejaron incubando durante 1 h sin CO₂ con 180 μ l de este medio, después de este tiempo de incubación, se cambió el medio por otros 180 μ l de medio basal. También en medio basal se diluyeron los fármacos para las pruebas (Cell Mito Stress Test Kit, Agilent Seahorse XF, no. cat. 103015-100), y se colocaron en los puertos del cartucho, en el puerto A se colocó oligomicina 2 μ M, en el puerto B FCCP 0.5 μ M y en el puerto C rotenona 0.5 μ M. Primero se calibró el quipo Seahorse XFe96 Analyzer con el cartucho de calibración, posteriormente se colocó la placa con las células y se corrió el ensayo (Fig. 12).

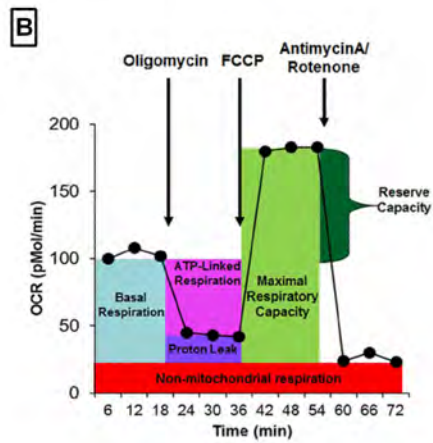
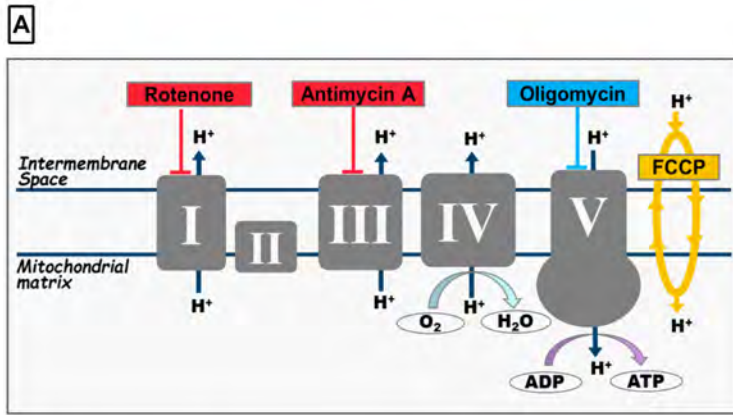


Figura 12. Interpretación de los resultados del Seahorse Analyzer. A) Fármacos utilizados para el ensayo. La oligomicina inhibe la ATP sintasa y es inyectada después de tres mediciones de la respiración basal, disminuye el flujo de electrones de la ETC, lo que resulta en la reducción de la respiración mitocondrial u OCR. Esta disminución de OCR está ligada a la producción celular de ATP. El FCCP es un agente desacoplante que colapsa el gradiente de protones, como resultado, el consumo de oxígeno por el complejo IV alcanza su máximo. La tercera inyección, es la rotenona, la cual inhibe la respiración mitocondrial. B) Parámetros fundamentales de la respiración mitocondrial. La inyección de los fármacos permite observar la respiración basal, la producción de ATP debida a la respiración basal, la fuga de protones, la máxima capacidad respiratoria. Tomado de <https://www.agilent.com/en/products/cell-analysis/seahorse-analyzers>

7.11. Análisis estadístico.

Todos los análisis se realizaron con el software GraphPad Prism 7, los datos de las PCRs durante la diferenciación adipogénica sin tratamientos, de las densitometrías de las inmunofluorescencias, del *Western blot* y del rojo oleoso se analizaron mediante una prueba de ANOVA de una vía seguida de una prueba *post hoc* de Dunnett's o Tukey's para múltiples comparaciones respecto al día cero y al control (MSC), respectivamente. Los datos de las PCRs de las células durante la diferenciación adipogénica con distintos tratamientos, y los datos del Seahorse Analyzer se analizaron mediante ANOVA de dos vías (entre tratamientos y días), seguida de la prueba de Dunnett's respecto a las células sólo tratadas con medio de diferenciación adipogénico.

8. Resultados

8.1. Las células troncales mesenquimales de médula ósea humana se diferenciaron en adipocitos.

A pesar de que las células troncales mesenquimales fueron previamente caracterizadas como indica la Sociedad Internacional de Terapia Celular, presentan el inmunofenotipo característico, son adherentes al plástico y se diferenciaron hacia condroblastos, adipocitos y osteoblastos (Fig. S1, S4-6), se aseguró que nuestro modelo funcionara. Durante el proceso de diferenciación adipogénica se observó la morfología celular, en el día 7 fue notoria la formación de algunas vesículas lipídicas, característica que fue más evidente el día 14, donde las células se ven más redondas y aumentan su tamaño (Fig. 13). Además, para demostrar positividad a lípidos, se realizó una tinción con rojo oleoso, la cual es específica para lípidos, además de una contratinción con hematoxilina-eosina, y las vesículas formadas al final de la diferenciación se tiñeron de rojo (Fig. 14). Con estos resultados, se comprueba la diferenciación adipogénica en nuestro modelo de células troncales/estromales mesenquimales humanas, en una proporción aproximada del 40% de adipocitos el día 14 de la inducción adipogénica.

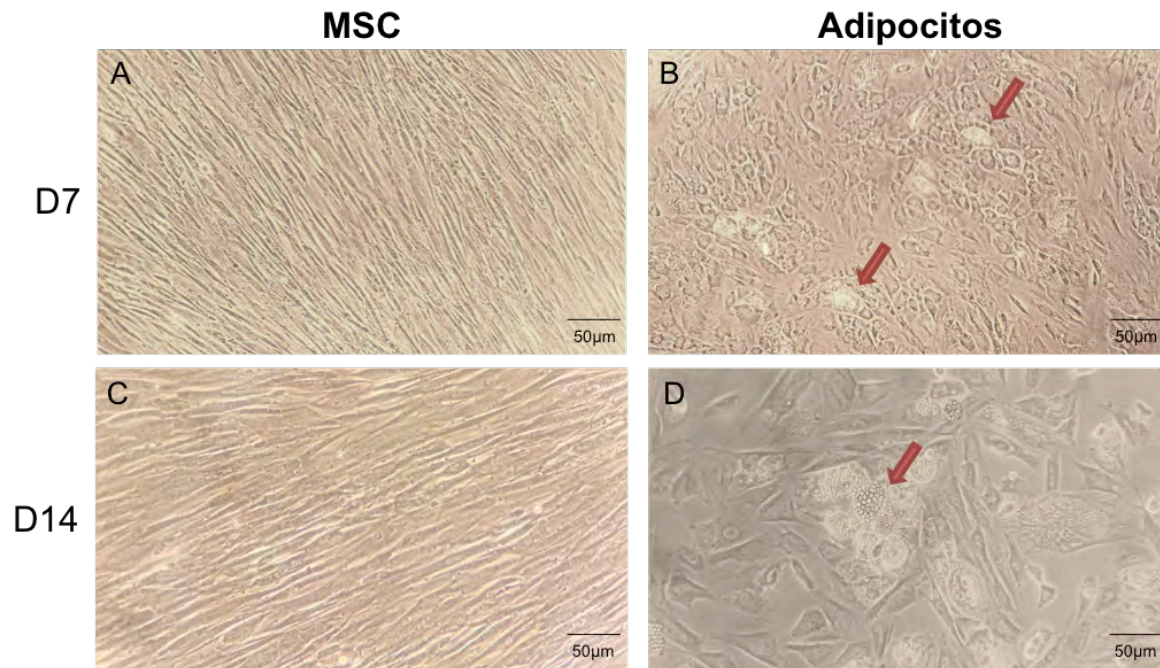


Figura 13. Las MSC se diferenciaron en adipocitos. A) y B) MSC sin tratamiento, a los días 7 y 14, conservaron su morfología típica fibroblastoide. C) y D) MSC tratadas con medio de diferenciación adipogénico a los días 7 y 14, presentaron vesículas lipídicas características de los adipocitos (flechas rojas). Escala 50 µm.

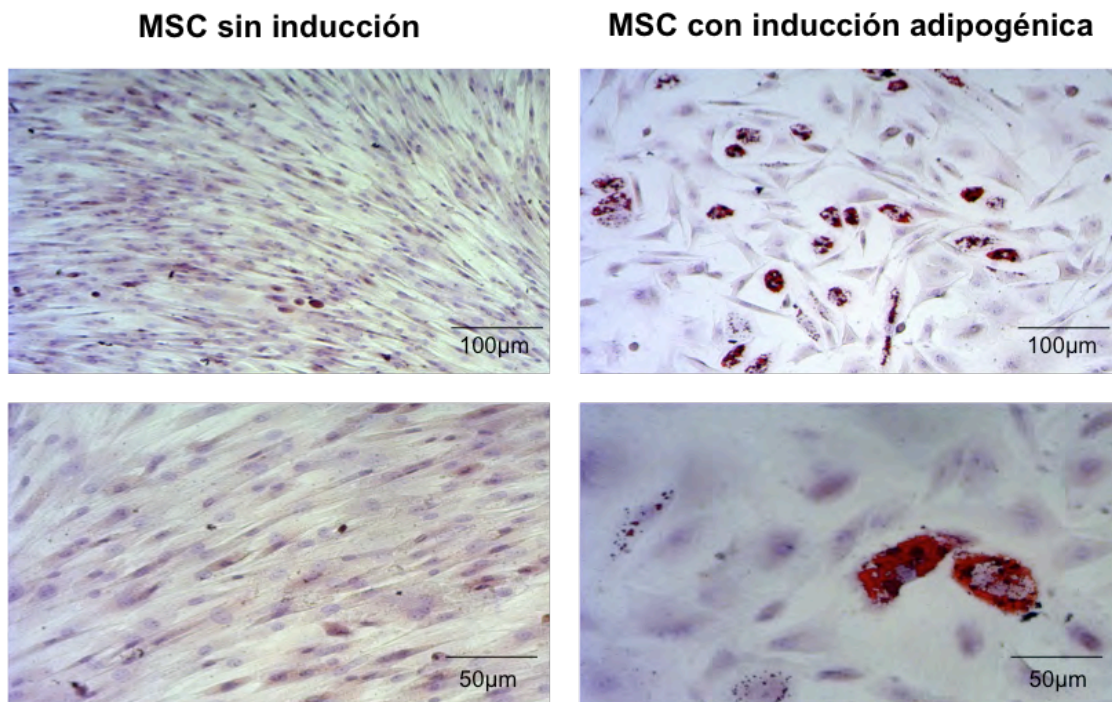


Figura 14. Las MSC inducidas a la diferenciación adipogénica fueron positivas a lípidos. Las imágenes de la izquierda corresponden a las MSC sin tratamiento, y las de la derecha a las MSC tratadas con medio de diferenciación adipogénico al día 14, en las cuales se observan las vesículas lipídicas teñidas con rojo oleoso. Escalas 100 y 50 µm.

8.2. La expresión de *SIRT1* aumentó durante la diferenciación adipogénica.

Para terminar de comprobar la diferenciación adipogénica, se midió por RT-qPCR la expresión de un gen asociado al compromiso del linaje y otro a la maduración, *PPAR γ* y adiponectina (*ADPN*), respectivamente. La expresión de estos genes característicos de los adipocitos aumenta significativamente durante la diferenciación, y corroboran la formación de adipocitos a partir de las MSC (Fig. 15A, B).

Para caracterizar los patrones de expresión de *SIRT1* durante la diferenciación adipogénica, también se realizó RT-qPCR. Se observó que la expresión de *SIRT1* aumenta durante la diferenciación, lo cual nos da indicios de que podría tener un papel en la diferenciación (Fig. 15C).

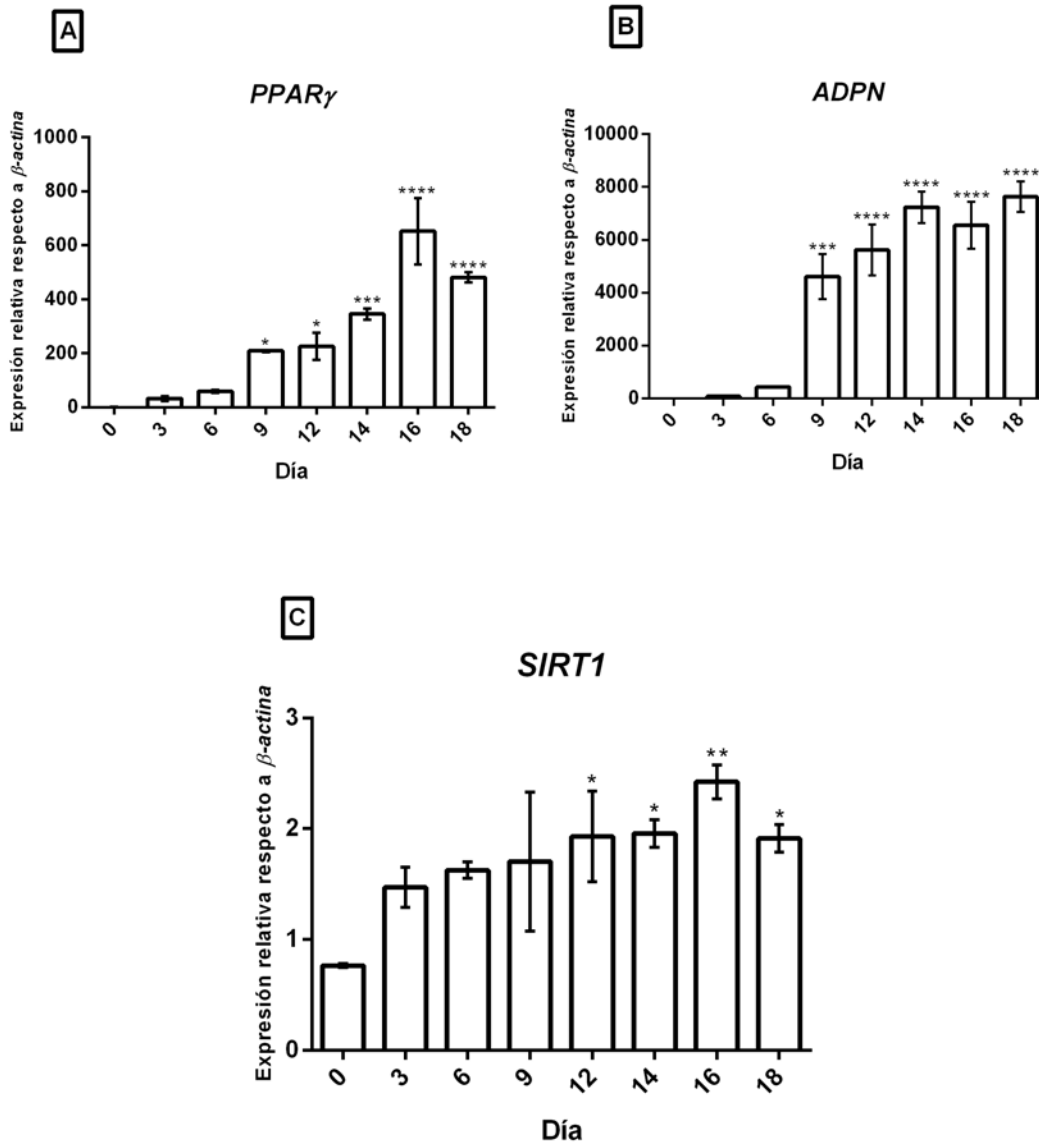


Figura 15. La expresión de *SIRT1* y de los genes de diferenciación adipogénica aumentó en MSC a diferentes días de la inducción adipogénica. A) Expresión de *PPAR γ* , gen relacionado al compromiso del linaje adipogénico. B) Expresión de *ADPN*, gen relacionado con la maduración adipogénica. C) Expresión de *SIRT1*. Se determinó por PCR en tiempo real, utilizando β -actina como gen endógeno de referencia. Todos los resultados representan los promedios \pm SEM (un replicado técnico y tres biológicos, en el caso de β -actina, dos replicados técnicos y tres biológicos). La significancia se determinó mediante una prueba de ANOVA de una vía seguida de una prueba post hoc de Dunnett's para múltiples comparaciones, con respecto al día cero. * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$, **** $P \leq 0.0001$.

8.3. La inhibición farmacológica de SIRT1 disminuyó la diferenciación adipogénica.

Para estudiar la influencia de SIRT1 en la formación de adipocitos, se realizaron tinciones con rojo oleoso para observar vesículas lipídicas los días 0, 4, 8, 12 y 16 de la diferenciación adipogénica utilizando distintos tratamientos: 5 mM de NAD⁺, el cofactor de SIRT1, 1 nM de FK866, inhibidor de la enzima NAMPT de la ruta de rescate del NAD⁺, y 50 μM de EX527, un inhibidor específico de SIRT1 que no inhibe otras desacetilasas de histonas u otros miembros de la familia de las sirtuínas (Figuras 16, S7-8).

Interesantemente, el tratamiento con NAD⁺ mostró mayor inducción de vesículas lipídicas (células positivas a rojo oleoso) los días 4 y 8 respecto al control (ADIPO) y a los demás tratamientos. Sin embargo, a los días 12 y 16 esta tendencia se revirtió, y el tratamiento con NAD⁺ presentó menor cantidad de vesículas lipídicas comparado con las células diferenciadas no tratadas (ADIPO) y las tratadas con FK866, indicando que estas células no continuaron el proceso de diferenciación después del día 8 (Figuras 16, S7). Destacablemente, el tratamiento con FK866 mostró mayor inducción adipogénica específicamente a los días 12 y 16. Finalmente, es destacable que se observó muy baja tasa de diferenciación en las células tratadas con el inhibidor de SIRT1, EX527, en todos los días analizados (Figuras 16, S7).

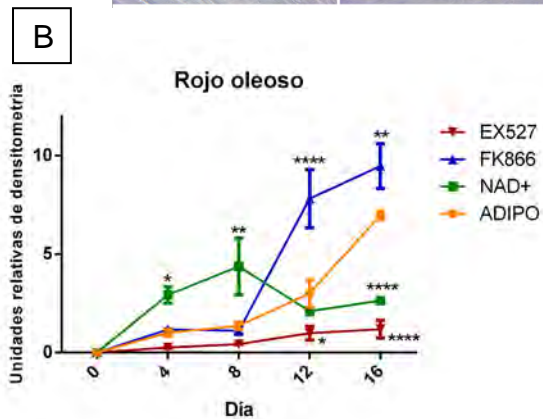
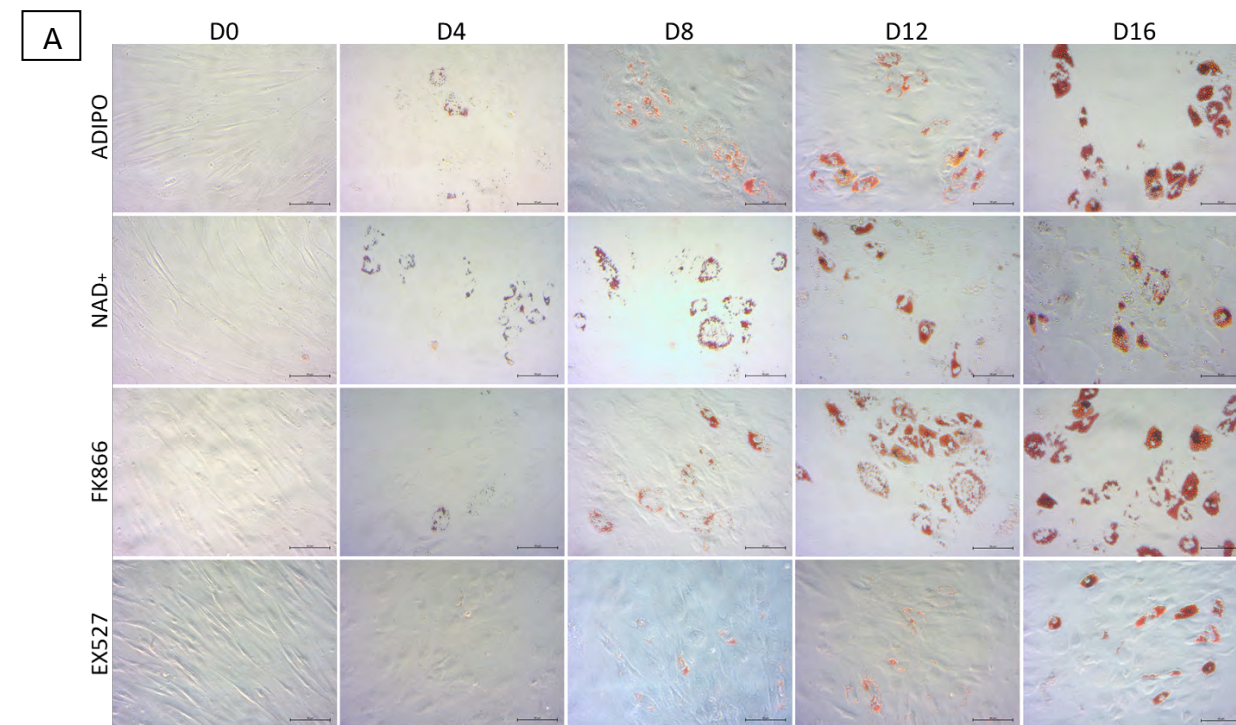


Figura 16. La inhibición farmacológica de SIRT1 disminuyó la diferenciación adipogénica. A) Imágenes representativas de la tinción con rojo oleoso a los días 0, 4, 8, 12, 16 de la diferenciación adipogénica, células tratadas con NAD⁺ 5 mM, FK866 1 nM y EX527 50 μM. Escala 50 μm. B) Cuantificación del rojo oleoso. Todos los resultados representan los promedios ± SEM (tres replicados técnicos y 3 biológicos). La significancia se determinó mediante una prueba de ANOVA de dos vías seguida de una prueba *post hoc* de Dunnett's para múltiples comparaciones, con respecto a las células que sólo se les indujo la diferenciación adipogénica. *P ≤ 0.05, **P ≤ 0.01, ***P ≤ 0.001, ****P ≤ 0.0001.

8.4. La activación o inhibición farmacológica de SIRT1 modificó la expresión de los genes de diferenciación adipogénica.

Para profundizar en el papel que ejerce SIRT1 en la diferenciación adipogénica, se diferenciaron las MSC sin tratamiento y con los tratamientos anteriores: NAD⁺, FK866 y EX527. A los días 0, 4, 8, 12 y 16 de la diferenciación, se midió la expresión de los genes *C/EBPα* y *PPARγ*, relacionados con el compromiso del linaje (Fig. 17A), adiponectina (*ADPN*), lipoproteínlipasa (*LPL*) y la proteína ligante de ácidos grasos (*aP2*), los cuales están relacionados con la maduración de los adipocitos (Fig. 17B). Adicionalmente, se

midió la expresión de *SIRT1* (Fig. 17C) para relacionar la dinámica de su expresión a la de los principales genes de diferenciación adipogénica.

En cuanto a la expresión de los genes asociados al compromiso del linaje, no logramos detectar cambios significativos en la expresión de *C/EBP α* entre los distintos tiempos y tratamientos (Fig. 17A). Interesantemente, el análisis de expresión de *PPAR γ* , mostró diferencias significativas entre los días 8 y 16, observándose un aumento en las células tratadas con NAD⁺ y FK866, y una disminución significativa en las células tratadas con el inhibidor específico de SIRT1, EX527 (Fig. 17A). En cierto modo, este resultado concuerda con el aumento de adipocitos observado con el rojo oleoso, donde el tratamiento con FK866 aumenta la diferenciación los últimos días, mientras que el tratamiento con EX527 los disminuye (Fig. 16). Es interesante el comportamiento de las células tratadas con NAD⁺, que, a pesar de no diferenciarse eficazmente en adipocitos, presentaron tendencia a la sobreexpresión de *PPAR γ* muy tempranamente (desde el día 4, Fig. 17 A).

Al analizar los genes relacionados con la maduración adipogénica (Fig. 17B), observamos que los tratamientos con NAD⁺ y EX527 disminuyeron su expresión, mientras que el tratamiento con FK866 la aumentó específicamente los últimos días (12 y 16) de la diferenciación (Fig. 17B). De estos resultados se intuye que los tratamientos con NAD⁺ y EX527 impiden que las células lleguen a la maduración, mientras que con el tratamiento con FK866 induce una diferenciación más eficaz, particularmente durante los últimos días de inducción adipogénica. Estos resultados concuerdan con lo observado en la tinción con rojo oleoso, donde el tratamiento con FK866 aumentó la diferenciación, y los tratamientos con NAD⁺ y EX527 la disminuyeron (Fig. 16).

El análisis de expresión de *SIRT1* mostró que el tratamiento con NAD⁺ aumenta significativamente los niveles de RNAm de SIRT1 específicamente los días 4 y 16 en comparación con las células no tratadas (ADIPO). Adicionalmente, la expresión de *SIRT1* disminuyó al tratar las células con su inhibidor EX527 (Fig. 17C). En general, el gen *SIRT1* mostró patrones de expresión similares a los que observamos para el gen relacionado al compromiso del linaje, *PPAR γ* , por lo que SIRT1 podría estar regulando positivamente a este gen.

De manera general, estos resultados indican que SIRT1 podría estar regulando de manera positiva el compromiso del linaje adipogénico a través del control de la expresión de *PPAR γ* , pero a su vez, un exceso de la actividad de SIRT1 podría inhibir la maduración de los adipocitos, dada la disminución de la expresión de los genes de maduración y el arresto de la diferenciación después del día 8 de las células tratadas con NAD^+ .

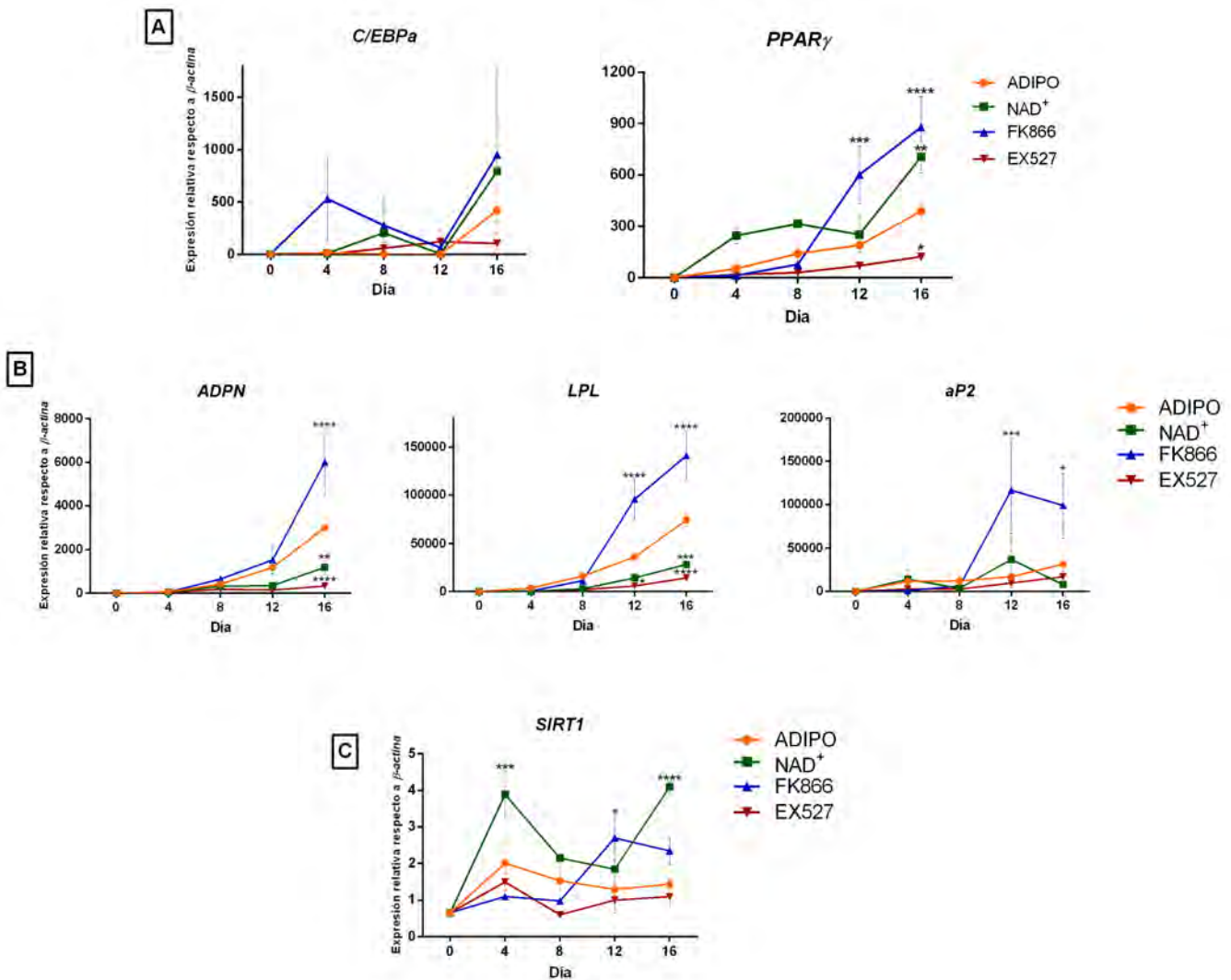


Figura 17. La activación o inhibición farmacológica de SIRT1 modificó la expresión de los genes de diferenciación adipogénica. A) Expresión de los genes de diferenciación adipogénica temprana *C/EBP α* y *PPAR γ* . B) Expresión de los genes de diferenciación adipogénica tardía *ADPN* (adipoentina), *LPL* (lipoproteínlipasa) y *aP2* (proteína de unión de ácidos grasos). C) Expresión de *SIRT1*. Se determinaron por PCR en tiempo real, utilizando β -actina como gen endógeno de referencia. Todos los resultados representan los promedios \pm SEM (un replicado técnico y tres biológicos, en el caso de β -actina, dos replicados técnicos y tres biológicos). La significancia se determinó mediante una prueba de ANOVA de dos vías seguida de una prueba *post hoc* de Dunnett's para múltiples comparaciones, con respecto a las células que sólo se les indujo la diferenciación adipogénica. * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$, **** $P \leq 0.0001$.

8.5. El NAD⁺ posiblemente estabilizó la proteína SIRT1 evitando su degradación y promovió su acumulación.

Para observar la dinámica de SIRT1 a nivel de proteína, se realizaron inmunofluorescencias los días 0, 4, 8, 12 y 16 de diferenciación adipogénica, y utilizando los tratamientos: NAD⁺, FK866 y EX527.

En cuanto a su localización subcelular, en las células no diferenciadas (MSC) y en las que llevaban 4 días de inducción adipogénica, se observó que SIRT1 estaba principalmente localizada en el núcleo celular, pero una fracción de la proteína fue detectada en el citosol (Fig. 18). En cambio, a partir del día 8 de diferenciación, la presencia de SIRT1 se observó restringida al núcleo en todas las condiciones analizadas (Figuras 19-21). Esto puede ser debido a que SIRT1 no sólo tiene blancos histónicos y nucleares, sino que también desacetila proteínas citoplasmáticas que podrían ser relevantes para mantener la multipotencia de las MSC, y en las primeras etapas de diferenciación. Adicionalmente, la relocalización al núcleo en los estadios más avanzados de diferenciación podría indicar que SIRT1 está participando a nivel transcripcional en la diferenciación adipogénica.

En cuanto a la abundancia de la proteína, se encontró que, en todas las etapas de diferenciación analizadas, la cantidad de SIRT1 es mayor en las células tratadas con NAD⁺ en comparación con los demás tratamientos, y disminuye significativamente en las células tratadas con FK866 y con EX527 (Fig. 18-21). Estos resultados podrían indicar que el cofactor de SIRT1, NAD⁺, está estabilizando a la proteína, lo cual evita su degradación y, por lo tanto, se acumula. Vemos el efecto contrario con el inhibidor de NAMPT, FK866, el cual disminuye las concentraciones de NAD⁺ aproximadamente en un 80%, por lo tanto, SIRT1 se desestabilizaría al no unirse a su cofactor, y con el tratamiento con EX527, el cual es inhibidor competitivo de SIRT1 que evita que el NAD⁺ se una a su sitio catalítico, provocando que la proteína se desestabilice y por lo tanto se degrade. Esta característica de SIRT1 ya ha sido reportada previamente en otros tipos celulares (91).

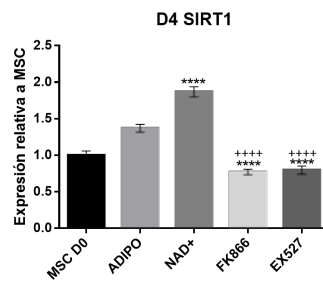
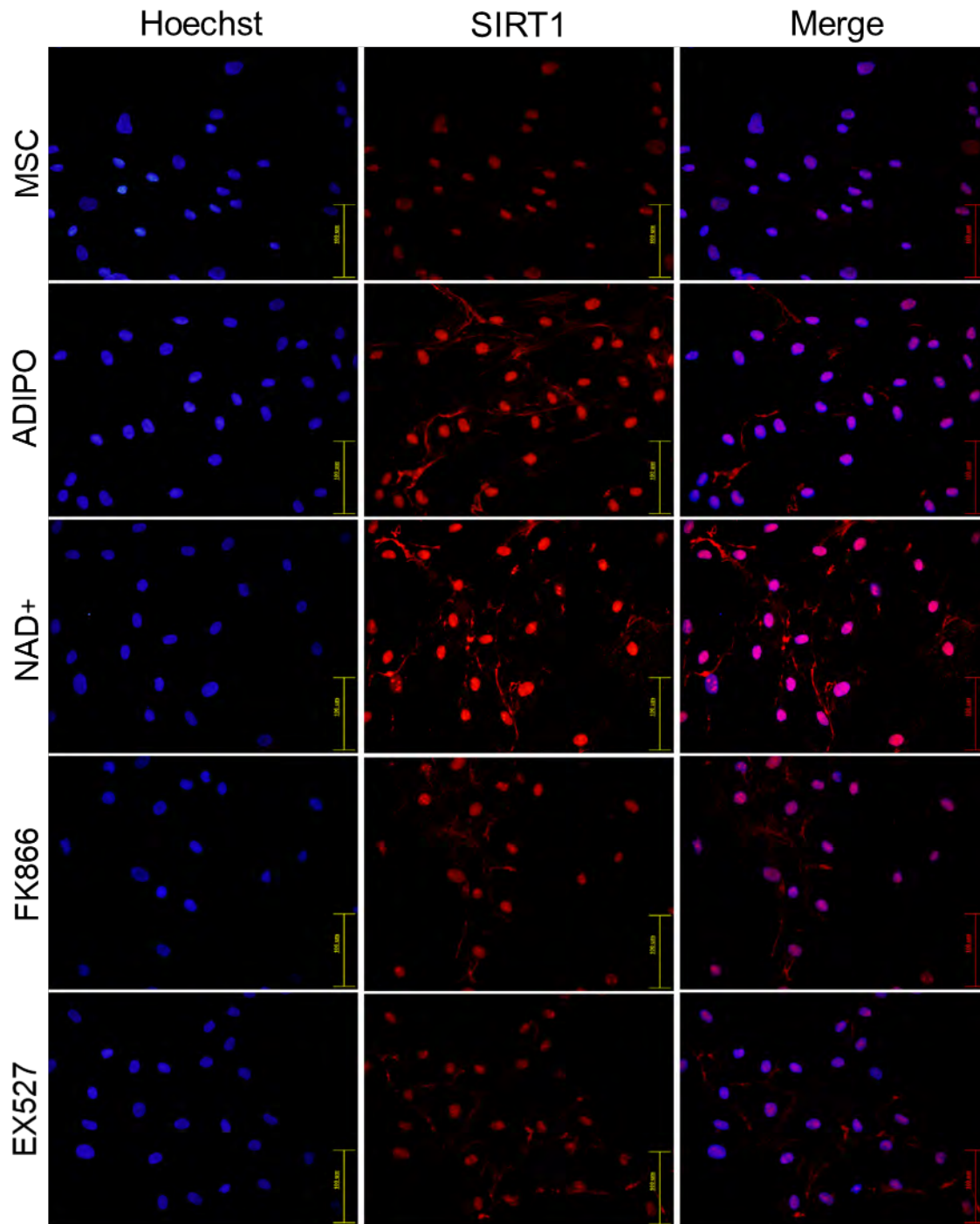


Figura 18. Análisis de inmunofluorescencia para SIRT1 al día 4 de la inducción adipogénica de MSC con distintos tratamientos, NAD⁺ 5 mM, FK866 1 nM y EX527 50 µM. Escala 100 µm. Se muestra la intensidad relativa de fluorescencia. La significancia se determinó mediante una prueba de ANOVA de una vía seguida de una prueba *post hoc* de Tukey's para múltiples comparaciones, con respecto a al control ADIPO (****P ≤ 0.0001) o a las células tratadas con NAD⁺ (****P ≤ 0.0001).

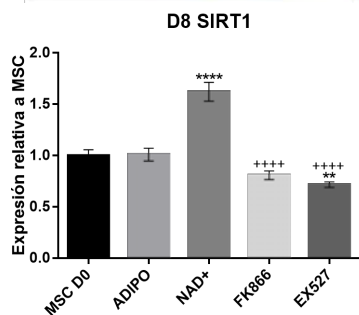
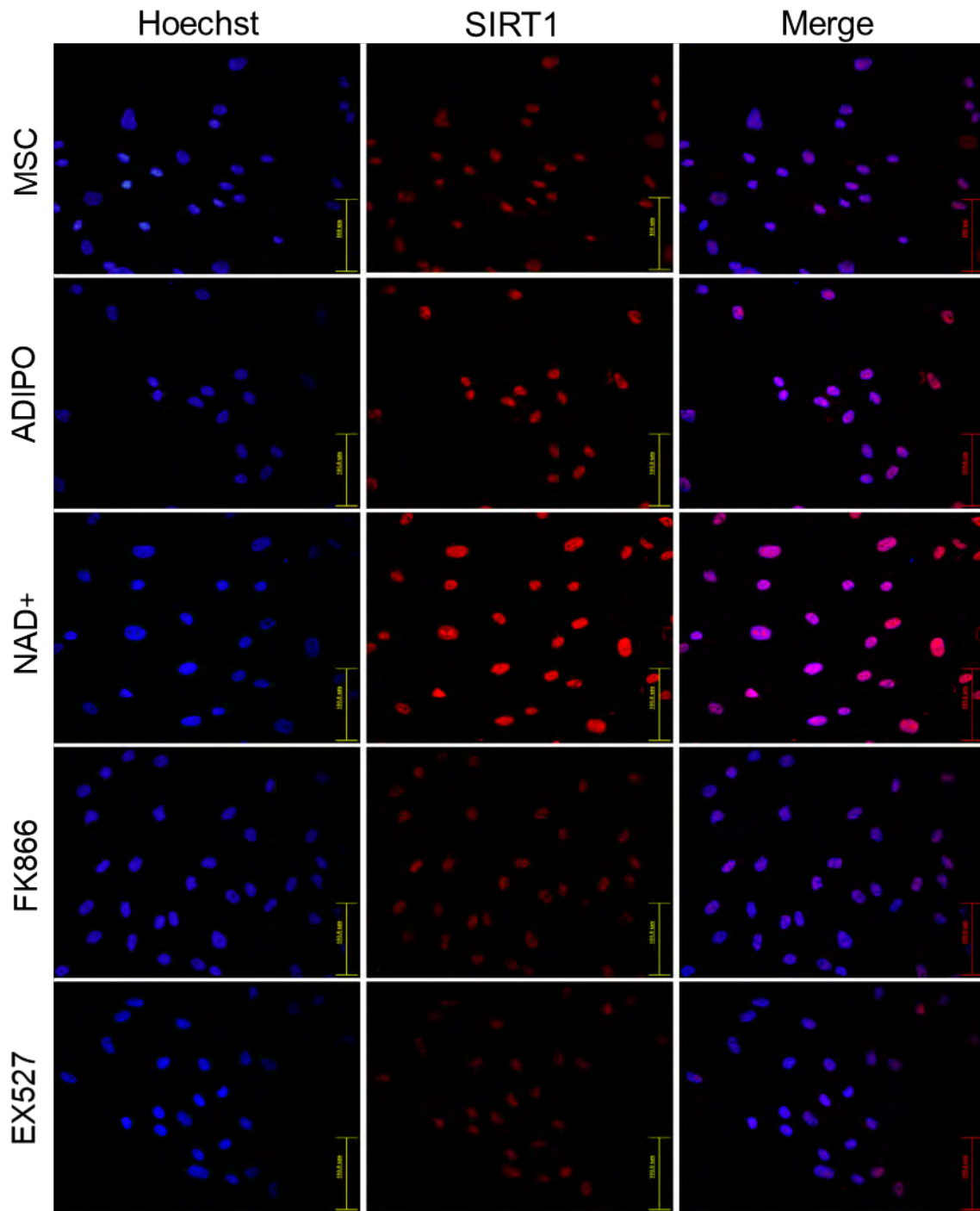


Figura 19. Análisis de inmunofluorescencia para SIRT1 al día 8 de la inducción adipogénica de MSC con distintos tratamientos, NAD⁺ 5 mM, FK866 1 nM y EX527 50 µM. Escala 100 µm. Se muestra la intensidad relativa de fluorescencia. La significancia se determinó mediante una prueba de ANOVA de una vía seguida de una prueba *post hoc* de Tukey's para múltiples comparaciones, con respecto a al control ADIPO (**P ≤ 0.01, ****P ≤ 0.0001) o a las células tratadas con NAD⁺ (****P ≤ 0.0001).

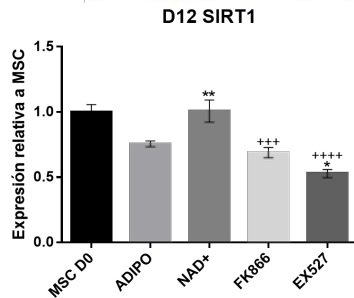
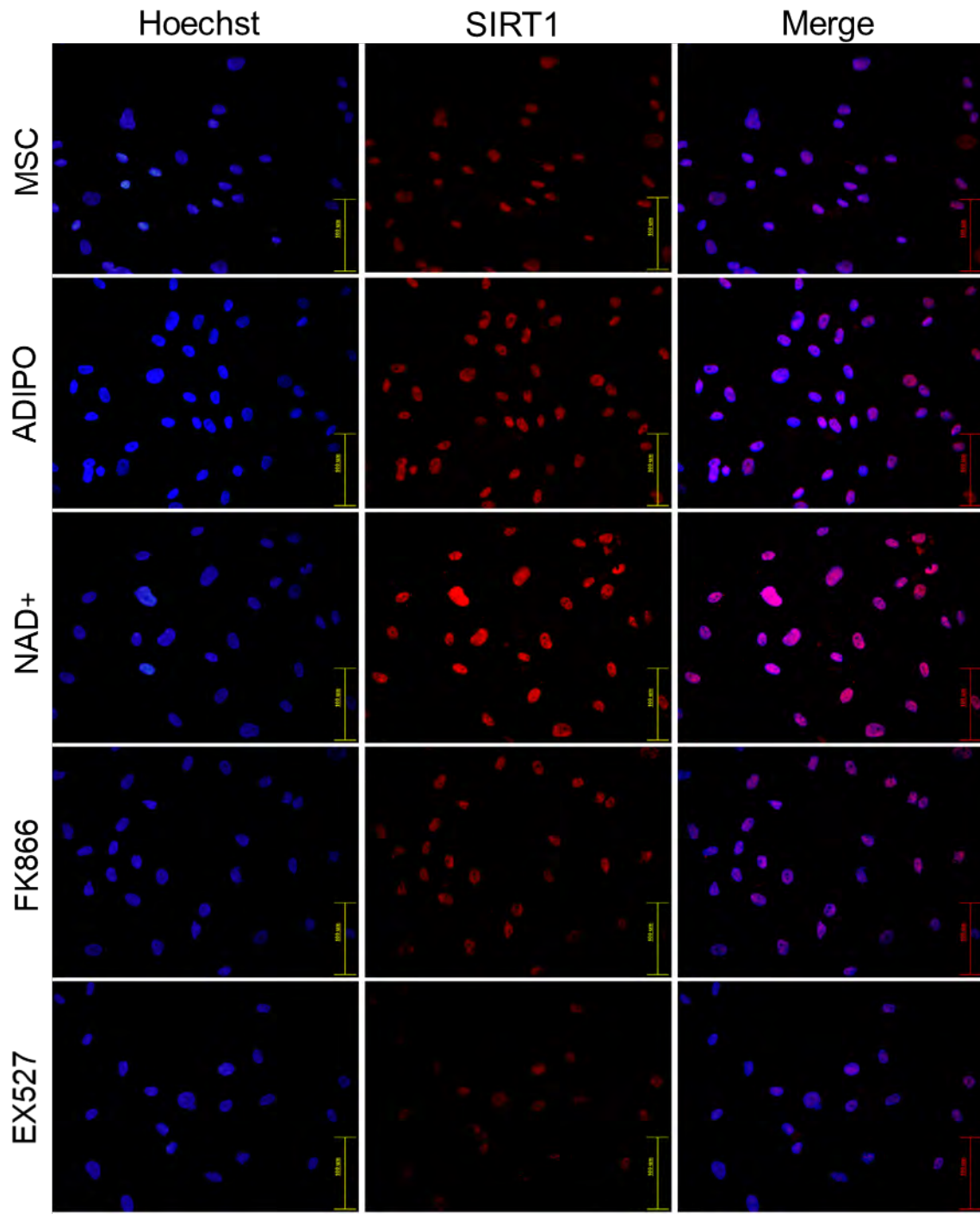


Figura 20. Análisis de inmunofluorescencia para SIRT1 al día 12 de la inducción adipogénica de MSC con distintos tratamientos, NAD⁺ 5 mM, FK866 1 nM y EX527 50 µM. Escala 100 µm. Se muestra la intensidad relativa de fluorescencia. La significancia se determinó mediante una prueba de ANOVA de una vía seguida de una prueba *post hoc* de Tukey's para múltiples comparaciones, con respecto a al control ADIPO (*P ≤ 0.01, **P ≤ 0.01) o a las células tratadas con NAD⁺ (***P ≤ 0.001, ****P ≤ 0.0001).

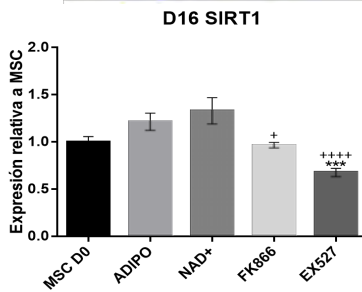
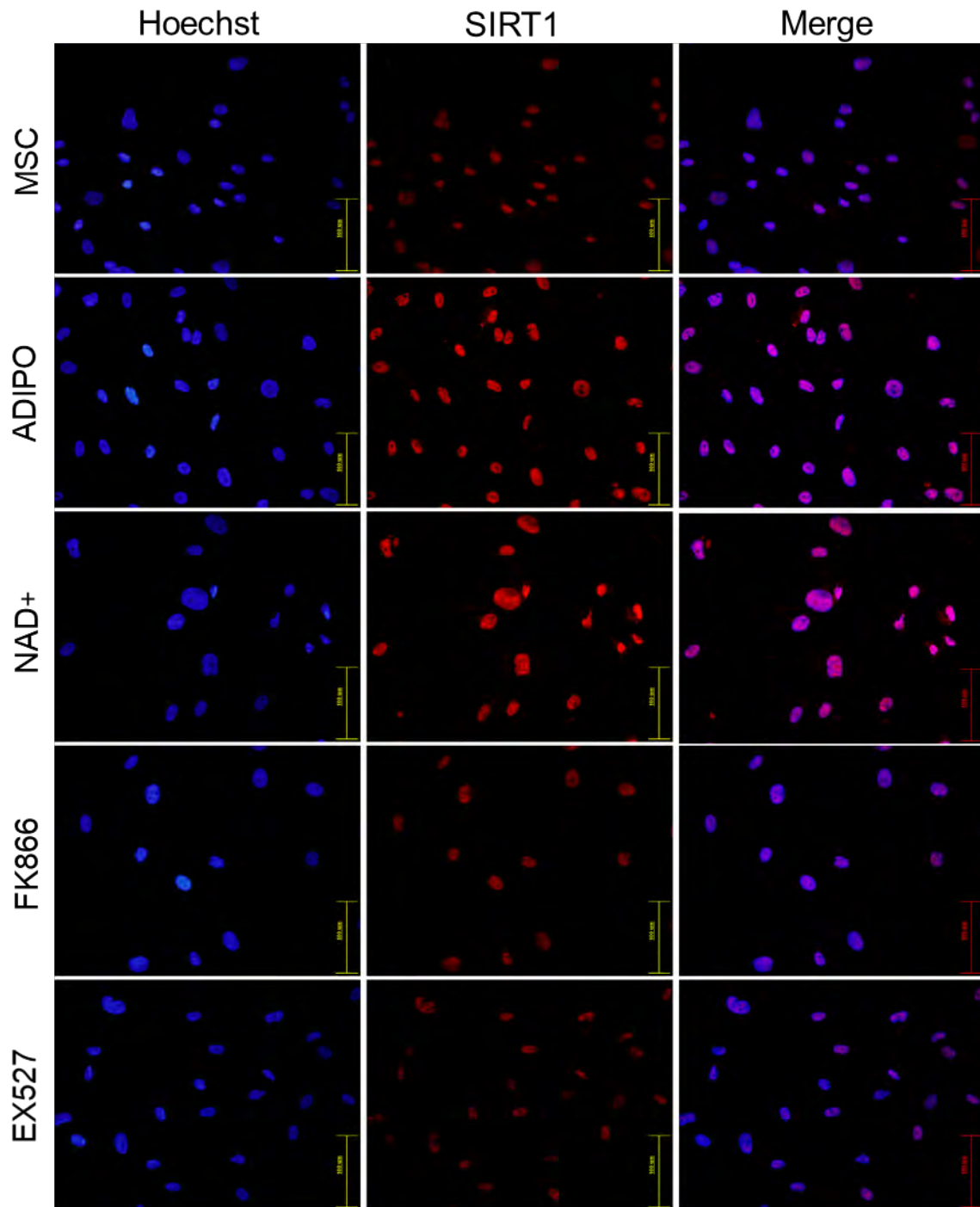


Figura 21. Análisis de inmunofluorescencia para SIRT1 al día 16 de la inducción adipogénica de MSC con distintos tratamientos, NAD⁺ 5 mM, FK866 1 nM y EX527 50 µM. Escala 100 µm. Se muestra la intensidad relativa de fluorescencia. La significancia se determinó mediante una prueba de ANOVA de una vía seguida de una prueba *post hoc* de Tukey's para múltiples comparaciones, con respecto a al control ADIPO (*P ≤ 0.05, ***P ≤ 0.001) o a las células tratadas con NAD⁺ (****P ≤ 0.0001).

8.6. SIRT1 podría regular positivamente a PPAR γ durante la diferenciación adipogénica.

Para saber si SIRT1 participa en el compromiso del linaje a través de la regulación positiva de la proteína PPAR γ , se realizó *Western blot* para PPAR γ los días 0, 4, 8, 12, 16 de la diferenciación adipogénica en células no tratadas y tratadas con: NAD⁺, FK866 y EX527 (Figuras 22-23, S9).

Primero, para descifrar cómo se expresa PPAR γ durante la diferenciación adipogénica se realizó el *Western blot* contra la proteína en células MSC durante su proceso de diferenciación adipogénica (Fig. 22). Se observó un aumento progresivo de PPAR γ conforme avanza la diferenciación, siendo más notorio al final, donde se detecta la expresión de ambas isoformas, PPAR γ 1 y PPAR γ 2 (Fig. 22).

Después, se realizaron análisis comparativos de la expresión de PPAR γ entre las células no tratadas y tratadas con los activadores e inhibidores de SIRT1, a cada uno de los días seleccionados de inducción adipogénica (Figuras 23, S9). Interesantemente, a los días 4 y 8 se observó que las células tratadas con NAD⁺ expresaban principalmente la isoforma PPAR γ 2 respecto a los demás tratamientos, en los que la isoforma principal es PPAR γ 1 (Fig. 23A). En los días 12 y 16 es cuando comenzó a detectarse expresión de PPAR γ 2 en las células control no tratadas (ADIPO). Es también llamativo que se detectaron mayores niveles de PPAR γ 1 y 2 en las células tratadas con FK866, específicamente a los días 12 y 16. Paralelamente, los menores niveles de PPAR γ se observaron en las células tratadas con NAD⁺ y EX527 (Figuras 23B).

La expresión de PPAR γ 2 en días tempranos podría explicar por qué hay mayor diferenciación los primeros días con el tratamiento con NAD⁺, ya que está reportado que PPAR γ 2 tiene mayor potencial adipogénico que su isoforma PPAR γ 1 (28).

Como control para comprobar que PPAR γ fuera inducida por los tratamientos, se trataron MSC con NAD⁺, FK866 y EX527 durante 16 días sin inducirlas a la diferenciación adipogénica. Como se observa en la Figura 19C, la expresión de PPAR γ en células sin diferenciar se mantiene prácticamente indetectable, independientemente del tratamiento, a niveles comparables con las células no diferenciadas y no tratadas (MSC). Esto indica que PPAR γ no se induce por los tratamientos por sí solos en células no diferenciadas.

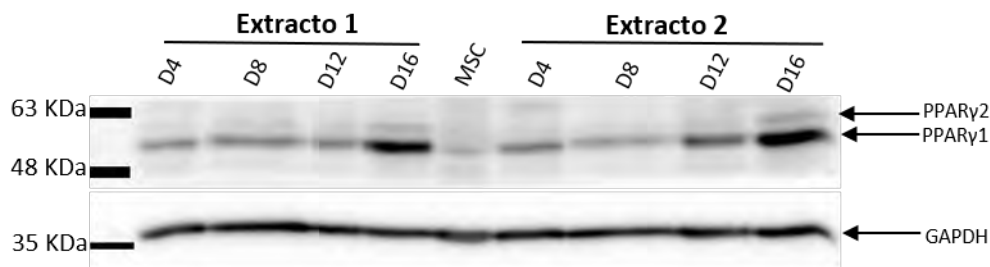


Figura 22. La proteína PPAR γ aumenta durante la diferenciación adipogénica. *Western blot* de PPAR γ de dos extractos protéicos de experimentos independientes durante la adipogénesis sin ningún tratamiento más que la inducción adipogénica.

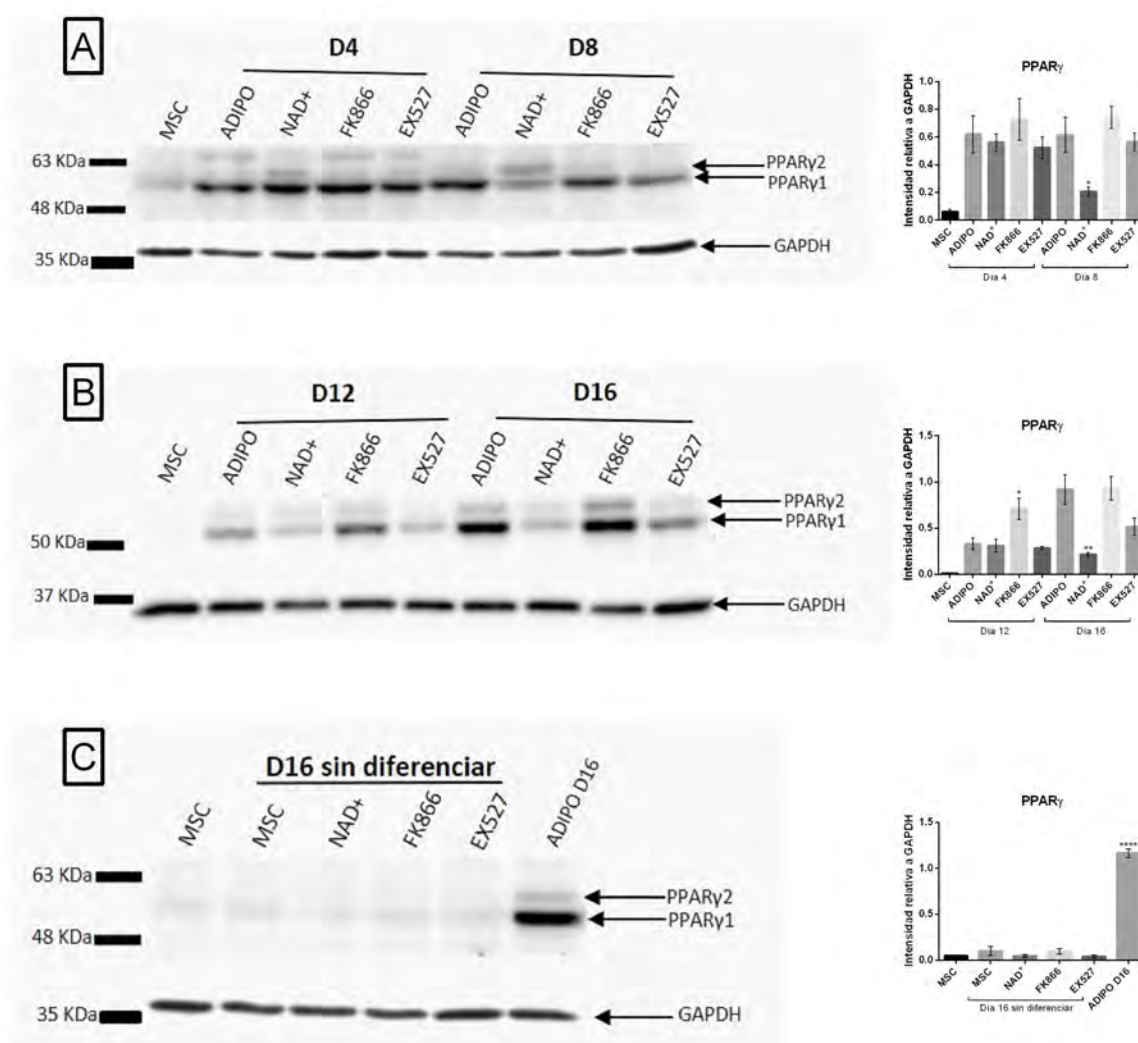


Figura 23. La isoforma PPAR γ 2 está presente los primeros días de la diferenciación adipogénica con el tratamiento con NAD⁺. A) *Western blot* representativo de PPAR γ a los días 4 y 8 de la diferenciación adipogénica con los tratamientos con NAD⁺ 5 mM, FK866 1 nM y EX527 50 μ M. B) *Western blot* representativo de PPAR γ a los días 12 y 16 de la diferenciación adipogénica con los

distintos tratamientos. C) *Western blot* representativo de PPAR γ de células troncales mesenquimales con los tratamientos con NAD⁺ 5 mM, FK866 1 nM y EX527 50 μ M al día 16 sin inducción adipogénica, se utilizó el día 16 de la diferenciación adipogénica como control positivo. A, B, C) La gráfica de la derecha muestra la intensidad relativa de las bandas, todos los resultados representan los promedios \pm SEM de tres experimentos independientes (n= 3 replicados biológicos). La significancia se determinó mediante una prueba de ANOVA de una vía seguida de una prueba *post hoc* de Tukey's para múltiples comparaciones, con respecto a las células que sólo se les indujo la diferenciación adipogénica (ADIPO). *P \leq 0.05, **P \leq 0.01, ***P \leq 0.001, ****P \leq 0.0001.

8.7. Las células tratadas con NAD⁺ presentaron un fenotipo metabólico quiescente.

Utilizando el equipo Seahorse XFe96 Analyzer, se evaluó el metabolismo durante los días 4, 8, 12 y 16 de la diferenciación adipogénica y tratando las células con: NAD⁺, FK866 y EX527. Para monitorear las dos vías principales del metabolismo, la respiración mitocondrial y la glucólisis, se midieron en tiempo real el consumo de oxígeno y la acidificación extracelular, respectivamente (Fig. 24-25).

En el caso de la tasa de consumo de oxígeno (OCR), se utilizaron 2 μ M de oligomicina, 0.5 μ M de FCCP y 0.5 μ M de rotenona los cuales revelan los parámetros fundamentales de la respiración mitocondrial: la respiración basal, la generación de ATP y la máxima respiración (Fig. 24A-D) (Ver sección de Métodos: 6.10. Seahorse XFe96 Analyzer).

En el caso de la tasa de acidificación extracelular (ECAR), la oligomicina permitió observar la reserva glucolítica (Fig. 25A-D).

De manera general, la OCR permitió observar qué tanto utilizan las células del metabolismo oxidativo. Al día 4, el consumo de oxígeno fue muy bajo en todos los tratamientos analizados, probablemente debido a que es un día muy temprano en la diferenciación. Sin embargo, es detectable que el OCR de las células tratadas con EX527 es el más cercano al de las células no diferenciadas (MSC) (Fig. 24A), mientras que el resto de condiciones analizadas aumentaron significativamente el OCR y su capacidad mitocondrial. En el día 8, de manera general, esta tendencia a aumentar el OCR y la capacidad mitocondrial se mantuvo, a excepción de las células tratadas con EX527 en las que el OCR continuó siendo bajo y comparable al de las MSC sin diferenciar (Fig. 24B). Sorprendentemente, en el día 12, las células tratadas con NAD⁺ cambiaron su tendencia y consumieron mucho menos oxígeno, a niveles similares a las tratadas con EX527 y a las no diferenciadas. Paralelamente, en las células tratadas con FK866 el OCR se elevó significativamente, por

encima incluso de los controles de diferenciación no tratados (Fig. 24C), y el día 16 conservaron estas características (Fig. 24D). Estas observaciones concuerdan perfectamente con los resultados anteriores, e indican que las células tratadas con el inhibidor de SIRT1, EX527, casi no están utilizando la respiración mitocondrial, lo cual coincide con el fenotipo metabólico de las células troncales y, por lo tanto, no se están diferenciando de manera significativa.

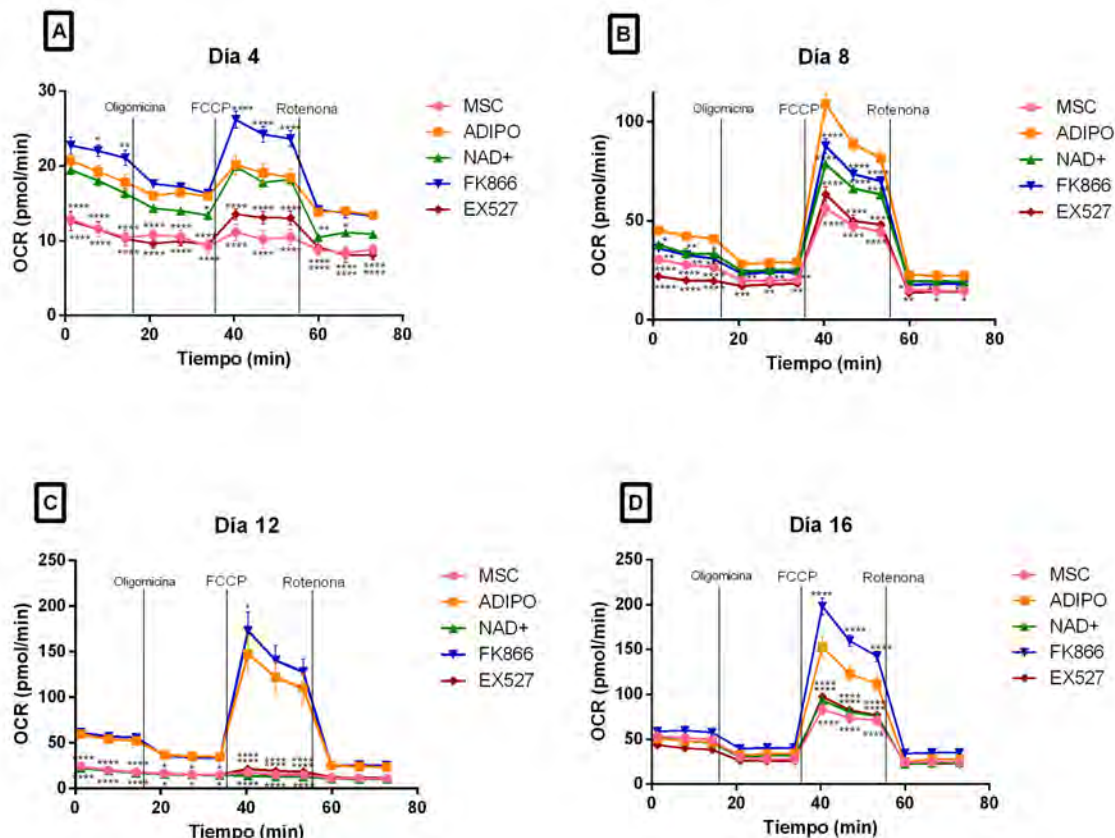


Figura 24. Tasa de consumo de oxígeno (OCR). A) Tasa de consumo de oxígeno al día 4 de la diferenciación adipogénica. B) Tasa de consumo de oxígeno al día 8 de la diferenciación adipogénica. C) Tasa de consumo de oxígeno al día 12 de la diferenciación adipogénica. D) Tasa de consumo de oxígeno al día 16 de la diferenciación adipogénica. Todos los resultados representan los promedios \pm SEM de seis replicados biológicos. La significancia se determinó mediante una prueba de ANOVA de dos vías seguida de una prueba *post hoc* de Dunnett's para múltiples comparaciones, con respecto a las células que sólo se les indujo la diferenciación adipogénica (ADIPO). * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$, **** $P \leq 0.0001$.

Adicionalmente, se determinó la ECAR, que permitió observar qué tanto utilizan las células el metabolismo glucolítico y la producción de lactato. Al día 4, las MSC utilizan más la glucólisis, como era de esperarse, ya que las células troncales dependen más de esta vía.

Pero además, se observó que las células tratadas con EX527 dependen más de la glucólisis en comparación con el control de células en diferenciación y no tratadas (ADIPO) (Fig. 25A). Al día 8 de la diferenciación, también se observó que la acidificación extracelular de las células tratadas con EX527 es comparable a la de las MSC sin diferenciar, e interesantemente, se observó que las células tratadas con NAD⁺ presentaban muy poca reserva glucolítica, lo cual indicaría que no están utilizando la glucólisis para suplir la demanda de energía (Fig. 25B). De manera llamativa, este fenómeno para las células tratadas con NAD⁺ se acentuó en los días 12 y 16. Además, el análisis de ECAR al día 12 revela que, las células tratadas con EX527 utilizan principalmente la glucólisis, en tasas comparables a las de las células MSC sin diferenciar lo cual continúa hasta el día 16 (Fig. 25D).

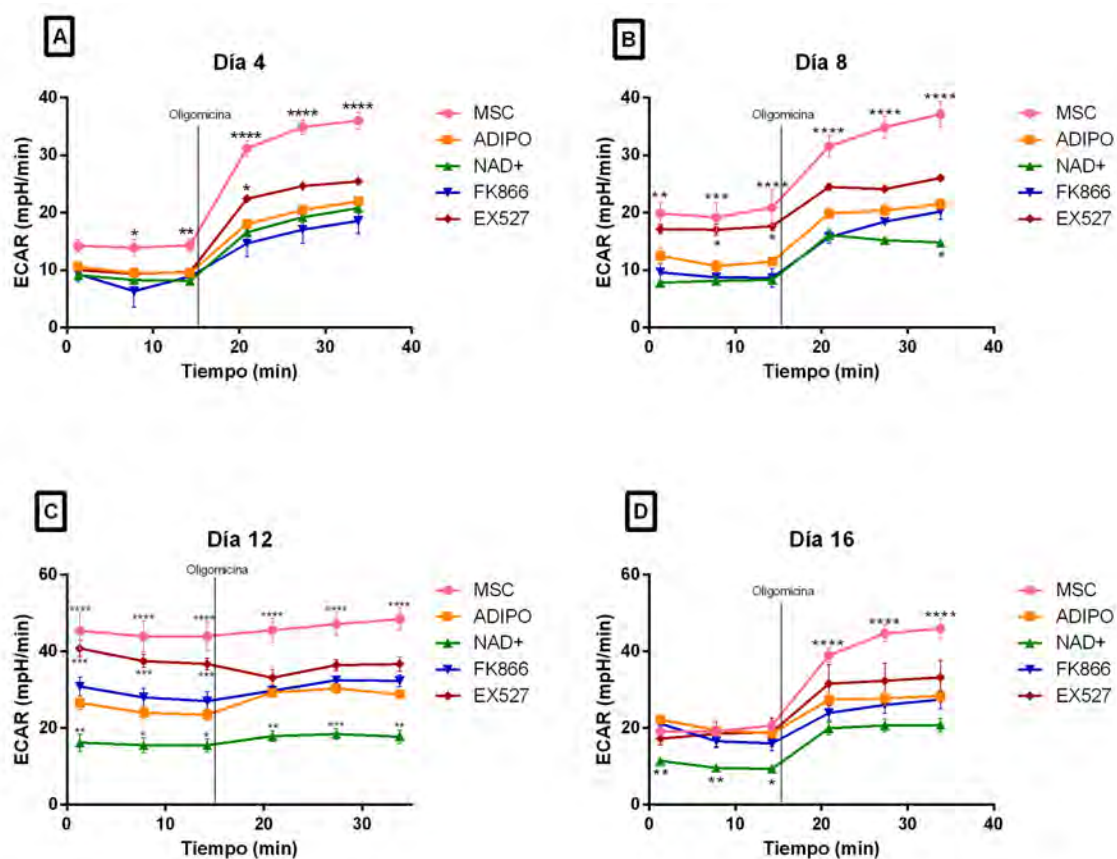


Figura 25. Tasa acidificación extracelular (ECAR). A) Tasa de acidificación extracelular al día 4 de la diferenciación adipogénica. B) Tasa de acidificación extracelular al día 8 de la diferenciación adipogénica. C) Tasa de acidificación extracelular al día 12 de la diferenciación adipogénica. D) Tasa de acidificación extracelular al día 16 de la diferenciación adipogénica. A, B, C, D) Todos los

resultados representan los promedios \pm SEM de seis replicados biológicos. La significancia se determinó mediante una prueba de ANOVA de dos vías seguida de una prueba *post hoc* de Dunnett's para múltiples comparaciones, con respecto a las células que sólo se les indujo la diferenciación adipogénica (ADIPO). *P \leq 0.05, **P \leq 0.01, ***P \leq 0.001, ****P \leq 0.0001.

En conjunto estos resultados indican que el metabolismo de las células tratadas con EX527 no cambia durante el protocolo de diferenciación, continúa siendo glucolítico similar al de las MSC, lo cual podría deberse a que las células no se están diferenciando.

En el caso de las células tratadas con NAD⁺, los últimos días de la diferenciación (12-16), no están utilizando ni el metabolismo oxidativo ni el glucolítico para la obtención de energía, lo cual indicaría un estado de quiescencia, que podría explicar por qué no llegan a la maduración adipogénica, ya que han sido arrestadas en un estadio de compromiso de linaje, sin que haya sido un efecto tóxico del tratamiento con EX527 (Fig. S8).

9. Discusión

La mayoría de los estudios de SIRT1 se han enfocado en su papel en el envejecimiento y la tumorigénesis, recientemente se ha prestado más atención a sus funciones durante la diferenciación celular, ya que se ha visto implicada en distintos tipos de diferenciación, tales como la muscular, donde se encontró que SIRT1 quita la marca H4K16ac, lo que inhibe la expresión de *MyoD*, el factor de transcripción maestro para la diferenciación muscular (41). Se ha reportado adicionalmente que la inhibición de SIRT1 con EX527 en la línea celular P19 no permite la diferenciación en astrocitos ni cardiomiocitos (92); y se ha observado que el homólogo de SIRT1, Sir2, cambia su localización subcelular durante el desarrollo embrionario de *Drosophila*, localizándose primero en citoplasma y núcleo y, posteriormente, se relocaliza totalmente al núcleo (93). Toda esta evidencia sugiere un papel importante de SIRT1 en la diferenciación (94).

En todos los tejidos, las proteínas están en constante recambio, y la mayoría son degradadas por la vía ubiquitin-proteasoma. En el caso de SIRT1, es fosforilada por JNK en Ser-46, en ratón, y en Ser-47, en humano. Posterior a la fosforilación ocurre la ubiquitinación para el reconocimiento por la subunidad 26S del proteasoma (64, 95, 96). Al unirse el NAD⁺ a la proteína SIRT1, le da estabilidad y evita su degradación vía proteasoma, y en nuestro trabajo, por medio de inmunofluorescencias, se observó una acumulación de SIRT1 en presencia de NAD⁺ posiblemente debido a su acumulación; y el efecto contrario con el inhibidor de NAMPT, FK866, por lo que al no haber suficiente NAD⁺, la proteína SIRT1 se estaría desestabilizando y se induciría su degradación. Con el inhibidor específico de SIRT1, EX527, al ser un inhibidor competitivo del NAD⁺, también desestabilizaría a la proteína e induciría su degradación.

A nivel mensajero de *SIRT1*, se observó que con el tratamiento con NAD⁺, aumentó su expresión, posiblemente porque al aumentar la proteína de SIRT1, ésta tiene la capacidad de autorregular positivamente su expresión, y en esta misma línea, el tratamiento con EX527 disminuyó su expresión.

En un estudio encontraron por medio de inmunofluorescencias, que la localización subcelular de SIRT1 varía en diferentes tejidos de ratón adulto. Por ejemplo, en neuronas encontraron a SIRT1 principalmente en el citoplasma, pero en las células ependimales la encontraron en citoplasma y núcleo, y solamente en el núcleo en los espermatozoides (94). Además, en línea celular de mioblastos C2C12 durante la diferenciación muscular, SIRT1 se localiza primero en el núcleo, y después de la diferenciación, en el citoplasma (94). En

este mismo estudio, por medio de ensayos de mutagénesis dirigida, encontraron dos señales de localización nuclear y dos de exportación nuclear en la proteína SIRT1. Con estos hallazgos, se considera que el transporte nucleocitoplasmático es un nuevo mecanismo de regulación de SIRT1, el cual podría participar en la diferenciación (94).

En este trabajo, fue importante observar la localización subcelular de SIRT1 durante la diferenciación adipogénica, ya que se ha observado que cambia durante el desarrollo embrionario y en respuesta a cambios fisiológicos, y difiere entre tejidos y células. Debido a que SIRT1 desacetila histonas y varios factores de transcripción, su localización subcelular afecta su función, y durante la diferenciación adipogénica, se observó la presencia de SIRT1 principalmente en núcleo, pero también se localiza en citoplasma en las células sin diferenciar, y al día 4 de diferenciación (Fig. 18). Conforme pasan los días de diferenciación, se relocaliza únicamente en el núcleo, y su ubicación nuclear indica que es ahí donde está llevando a cabo su actividad, y, por lo tanto, podría estar participando en la diferenciación adipogénica, posiblemente a través de la regulación de mecanismos transcripcionales.

PPAR γ es un factor de transcripción maestro de la diferenciación adipogénica. Cuenta con dos isoformas proteicas, PPAR γ 1 y PPAR γ 2. Durante la diferenciación de las células 3T3-L1, la isoforma PPAR γ 1 se induce más tempranamente y permanece dominante durante la diferenciación, mientras que PPAR γ 2 se induce relativamente tarde y permanece en menor concentración. Las diferencias funcionales de las dos isoformas en la adipogénesis y en los adipocitos maduros no son claras, pero se ha observado que PPAR γ 2 tiene mayor potencial para inducir la adipogénesis (97). Los ensayos de *Western blot* realizados en este trabajo mostraron que la isoforma PPAR γ 2 se induce más tempranamente al día 4 y 8 de la diferenciación de las células tratadas con NAD⁺, lo que podría explicar que esos días observamos mayor diferenciación en los análisis de rojo oleoso, en comparación con los demás tratamientos y con el control. Sin embargo, a los días 12 y 16 disminuyeron PPAR γ 1 y 2, y se observó menor diferenciación. Esto concuerda con que PPAR γ es el regulador maestro de la adipogénesis, ya que es necesario y suficiente para que esta se dé. Contrariamente a lo que sucede con el NAD⁺, con el tratamiento con FK866, se observó una mayor cantidad de PPAR γ y una mayor diferenciación en los últimos días, de acuerdo a la tinción de rojo oleoso y a los análisis de expresión de genes de diferenciación tardía, mientras que en las células tratadas con EX527, los niveles de proteína de PPAR γ

permanecieron bajos, indicando que este tratamiento impide a las células diferenciarse. Estos resultados apuntan a que SIRT1 está regulando la diferenciación a través de PPAR γ .

Se ha descrito que, en el tejido adiposo, SIRT1 reprime a PPAR γ acoplándose con sus cofactores NcoR (nuclear receptor co-repressor) y SMRT (silencing mediator of retinoid and thyroid hormone receptors). Ensayos de CHIP revelaron que NCoR también se une a sitios conocidos de PPAR γ de promotores de genes adipogénicos (63).

Se sabe que al disminuir la relación NAD⁺/NADH disminuye significativamente el nivel y la actividad de SIRT1, también se ha encontrado que disminuye la desacetilación de PPAR γ (98). Está reportado que SIRT1 desacetila de manera dependiente de NAD⁺, a Ppar γ en Lys268 y Lys293 en tejido adiposo blanco de ratón, lo cual promueve la formación de tejido adiposo café a partir de tejido adiposo blanco (99).

Existe poca información experimental acerca del papel de SIRT1 en la diferenciación adipogénica. Sin embargo, es aceptado que SIRT1 inhibe la adipogénesis. Entre los reportes que se han hecho para llegar a esta conclusión se encuentra el de Choi y colaboradores, donde utilizaron como modelo células 3T3-L1, preadipocitos de ratón, trataron a las células con indol-3-carbinol como activador de SIRT1, y observaron que con este tratamiento disminuye la diferenciación adipogénica. Sin embargo, no pudieron evaluar la importancia de SIRT1 en el compromiso del linaje, probablemente debido a que su modelo celular ya está comprometido hacia el linaje adipogénico y quizás sólo observaron una inhibición de la maduración adipogénica por parte de SIRT1. Además, la molécula que utilizaron como activadora de SIRT1 es muy poco específica, y también tiene otros blancos relacionados con la proliferación celular, apoptosis y metabolismo (100).

Zhou y colaboradores, llegaron a la conclusión de que SIRT1 inhibe la adipogénesis. Este grupo utilizó como modelo las células C3H10T1/2, fibroblastos embrionarios de ratón, los cuales no están comprometidos hacia un linaje. Sin embargo, realizaron sus experimentos el día 14 de la diferenciación adipogénica, donde SIRT1 parece no tener importancia, y al contrario, inhibe la maduración adipogénica (101). Lo mismo sucede con el trabajo de Backesjo y colaboradores (65).

La actividad elevada de desacetilación de SIRT1 depende principalmente del metabolismo oxidativo, ya sea a través de cambios en los niveles de la proteína SIRT1 o cambios en la relación NAD⁺/NADH (41, 102). El aumento en la expresión de SIRT1 se asocia con el

cambio del metabolismo glucolítico al oxidativo que observamos durante la diferenciación, sobre todo en las células que fueron tratadas con NAD^+ , donde el aumento de la expresión de SIRT1 fue significativo a nivel de mensajero y proteína, lo cual indicaría un muy probable aumento en su actividad de desacetilasa.

Se sabe que la quiescencia es necesaria para el mantenimiento de la pluripotencia en células troncales, y se ha observado que la actividad desacetilasa de SIRT1 y los niveles NAD^+ son mayores en células troncales de músculo esquelético quiescentes en comparación con las células que han iniciado el proceso de diferenciación (activadas). En este trabajo observamos que, al final de los días de diferenciación adipogénica hay menor formación de adipocitos en las células que fueron tratadas con NAD^+ , y tanto su metabolismo glucolítico como el oxidativo se mantienen a una tasa mínima, lo cual indicaría que estas células se encuentran quiescentes. SIRT1 podría estar inhibiendo la maduración de estas células a través de inducir un estado de quiescencia (41).

En este trabajo, observamos también que al inhibir con FK866 a la enzima limitante de la ruta de salvamento del NAD^+ , la NAMPT, hay un incremento en la diferenciación adipogénica. Está reportado que dentro de los efectos que provoca la inhibición de NAMPT se encuentra el aumento a la susceptibilidad al estrés oxidativo. Análisis proteómicos de células tratadas con FK866 mostraron una disminución de las enzimas glutarredoxinas, en especial de la enzima glutatión peroxidasa 1 (GRX1) la cual oxida al glutatión para proteger a las células de las especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés), al disminuir estas enzimas, hay un aumento en la producción de ROS, y durante la diferenciación celular, este aumento es mayor debido a la reprogramación hacia el metabolismo oxidativo (103).

Las especies reactivas de oxígeno también tienen una función como moléculas de señalización. En este sentido, se ha visto que las ROS son un factor determinante para la diferenciación en una gran variedad de células troncales, de hecho, para prevenir la diferenciación de las células troncales embrionarias de ratón, se inhibe con antimicina A el complejo III de la cadena de transporte de electrones, la mayor fuente de ROS (104). Sin embargo, las vías que promueven la diferenciación por ROS no están bien caracterizadas. Existe un estudio donde diferenciaron MSC de médula ósea en adipocitos, y durante la diferenciación inhibieron el complejo III de la cadena de transporte de electrones, y observaron que la expresión de *PPAR γ* y otros factores adipogénicos estaba muy atenuada. Además, las tinciones con rojo oleoso mostraron poca formación de adipocitos.

Al utilizar antioxidantes, también observaron un efecto similar. Este estudio demuestra que las especies reactivas de oxígeno son necesarias para iniciar la maquinaria transcripcional para la adipogénesis (105). Esto podría explicar el incremento de la diferenciación adipogénica al tratar a las células con el inhibidor FK866, lo que provocaría que disminuya la respuesta al estrés oxidativo y, por lo tanto, es mayor el aumento de las ROS las cuales pueden promover la diferenciación adipogénica (Fig. 26).

Por medio del Seahorse Analyzer, se ha observado que el fenotipo metabólico de las MSC humanas es glucolítico en un estado basal (37). Esto concuerda con los resultados obtenidos en este trabajo, donde las MSC son principalmente glucolíticas. Los niveles de OCR y ECAR de las células tratadas con EX527 son muy similares al de las MSC, lo cual indica que las células están conservando su fenotipo metabólico y, por lo tanto, no se están diferenciando. Por ello, se concluye que SIRT1 es importante al inicio de la diferenciación adipogénica, y para que esta se lleve a cabo (Fig. 27). Esto podría ser debido a que SIRT1 desacetila y activa a PGC-1 α para que se lleve a cabo la biogénesis mitocondrial y así, la reprogramación metabólica.

En general, las células troncales son altamente glucolíticas, e incluso poseen mecanismos que suprimen la respiración mitocondrial. Sin embargo, cuando las células se diferencian experimentan un cambio metabólico en el cual las mitocondrias se activan y la producción de ATP es principalmente a través de la fosforilación oxidativa. Esta reprogramación metabólica es una característica distintiva de la diferenciación de las células troncales. Específicamente en MSC, la biogénesis mitocondrial y la regulación positiva de las enzimas antioxidantes se observan simultáneamente a la diferenciación. La glucólisis se reduce durante la diferenciación osteogénica de las MSC, como lo revela una disminución dramática en la producción de lactato, y un aumento en el OCR. Este mismo efecto también ha sido observado en MSC de ratón (38, 46, 106, 107). En este trabajo, también se observa la reprogramación metabólica en las células control (ADIPO), donde al pasar los días, el ECAR disminuye y el OCR aumenta.

Existen relativamente pocos estudios donde se evalúe el metabolismo de las células durante la diferenciación, debido a que clásicamente, se ha considerado que la activación del metabolismo mitocondrial en la diferenciación celular es necesaria para cubrir las altas necesidades metabólicas de las células diferenciadas. Sin embargo, se ha encontrado que

distintos componentes del metabolismo mitocondrial regulan varios aspectos de la diferenciación a través de moléculas de señalización y moduladores transcripcionales y epigenéticos. Por ello, el metabolismo oxidativo ya no se considera consecuencia de la diferenciación celular, sino un importante regulador de este proceso. Por ejemplo, se ha demostrado que el aumento de los niveles de ROS a través de la fosforilación oxidativa es un mecanismo fisiológico para activar la diferenciación celular. Interesantemente, durante los distintos días de diferenciación observamos que las células tratadas con FK866 son más oxidativas en comparación con los demás tratamientos, y su metabolismo glucolítico disminuye drásticamente, lo que puede indicar una mayor diferenciación celular, lo cual podría ser un efecto del metabolismo, independientemente de la inhibición de SIRT1 (Fig. 26).

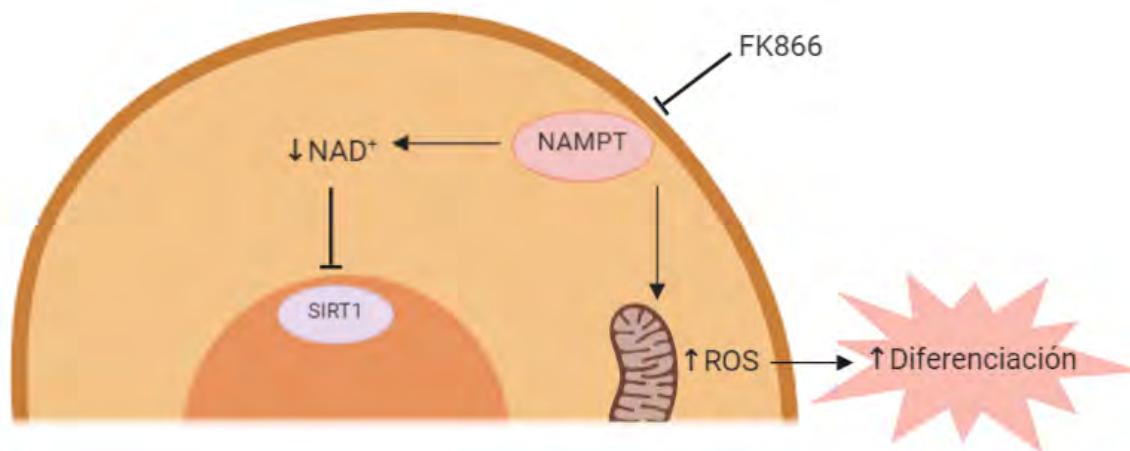


Figura 26. Modelo propuesto para las MSC tratadas con FK866 durante la diferenciación adipogénica. La inhibición de NAMPT aumenta las especies reactivas de oxígeno (ROS), las cuales promueven la diferenciación, independientemente de la inhibición de SIRT1.

La glucólisis y la fosforilación oxidativa afectan la relación NAD⁺/NADH, la cual está involucrada en la reprogramación metabólica, ya que, los niveles de NAD⁺ pueden regular el destino de las células troncales al afectar la actividad de SIRT1 (42). Al aumentar los niveles de NAD⁺, aumenta la actividad de SIRT1. Las células tratadas con NAD⁺ los primeros días de la diferenciación comienzan a adquirir un metabolismo más oxidativo, mientras que la glucólisis disminuye. Sin embargo, al día 12 se observa que el OCR disminuye dramáticamente, y el ECAR también permanece en niveles muy bajos, lo cual indica que las células no están llevando a cabo el metabolismo glucolítico ni el oxidativo, y, por lo tanto, presentan un fenotipo metabólico quiescente (Fig. 27).

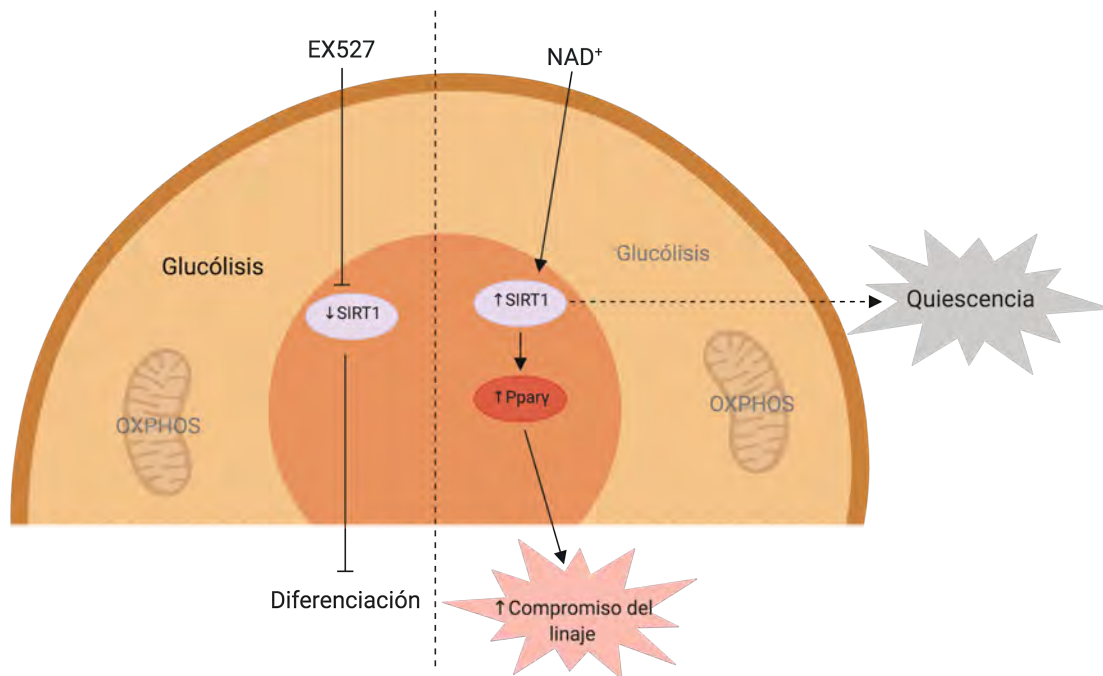


Figura 27. Modelo propuesto para las MSC tratadas con EX527 y NAD⁺ durante la diferenciación adipogénica. Las células tratadas con el inhibidor específico de SIRT1, EX527, no se diferencian en adipocitos y conservan su metabolismo glucolítico. Las células tratadas con NAD⁺ sobreactivan a SIRT1 y promueven el compromiso del linaje adipogénico a través de la regulación positiva de PPAR γ , al pasar los días de diferenciación, esta sobreactivación lleva a las células a un estado metabólico quiescente, impidiendo su maduración en adipocitos.

La quiescencia es un estado reversible de arresto del ciclo celular que puede proteger a las células de daños ambientales al disminuir la actividad metabólica, la replicación del DNA, la transcripción y traducción. En algunos sistemas, la quiescencia celular se asocia con un bajo estado metabólico caracterizado por una disminución de la glucólisis, así como bajas tasas de consumo de oxígeno (108, 109).

La quiescencia se ha identificado en distintos tipos de células troncales, tales como musculares (MuSC), hematopoyéticas (HSC), y neurales (NSC). La regulación de la quiescencia requiere una interacción compleja de diferentes mecanismos moleculares. Estos incluyen vías de señalización intrínseca de las células troncales y reguladores epigenéticos, entre otros componentes (108). En MuSC, se ha observado que SIRT1 es un factor importante que regula la transición del estado quiescente al estado activado en la diferenciación. En el caso de las MuSC, la reprogramación metabólica se da de la oxidación de ácidos grasos a la glucólisis, lo cual disminuye los niveles intracelulares de NAD⁺ y, por

lo tanto, la actividad de SIRT1, lo que lleva a una elevada acetilación de H4K16 y a la activación de la transcripción de los genes de diferenciación miogénica (41, 108).

En distintos sistemas de quiescencia, incluidos *Saccharomyces cerevisiae*, linfocitos de mamíferos y HSC, la vía de señalización PI3K/mTOR integra la información sobre la disponibilidad de nutrientes con las tasas de crecimiento celular. Las señales de quiescencia inactivan a mTOR, lo que da como resultado una disminución del ciclo celular y de la síntesis de biomoléculas (109). Es posible que, en este trabajo, la sobreactivación de SIRT1 con el tratamiento con NAD⁺, lleve a las células a un estado de quiescencia a través de la inhibición de la cinasa mTOR, uno de los blancos de SIRT1, lo que impide la maduración de las células en adipocitos.

10. Conclusiones

10.1. Conclusión general.

De manera global, los datos obtenidos en este trabajo muestran que SIRT1 promueve el compromiso del linaje adipogénico a través de la regulación positiva de PPAR γ . Además, juega un papel muy importante en la reprogramación metabólica para que se lleve a cabo la diferenciación adipogénica. Cuando SIRT1 se inhibe, no hay reprogramación metabólica y, por lo tanto, no hay diferenciación. Sin embargo, se requiere un correcto balance energético de NAD⁺ para que la diferenciación pueda llegar a la maduración, y las células no sean arrestadas en un estado metabólico quiescente.

10.2. Conclusiones particulares.

- SIRT1 es importante para el compromiso del linaje adipogénico.
- El NAD⁺ estabiliza la proteína SIRT1 evitando su degradación y promoviendo su acumulación, sucede el efecto contrario con el inhibidor EX527, el cual desestabiliza a SIRT1 y, por lo tanto, promueve su degradación. FK866, también disminuye su estabilidad al disminuir a su cofactor, el NAD⁺.
- SIRT1 podría estar participando en el compromiso hacia el linaje adipogénico, a través de la regulación de PPAR γ .
- Se requiere un correcto balance energético de NAD⁺ para que la diferenciación pueda llegar a la maduración.
- Un exceso de NAD⁺ inhibe la maduración de los preadipocitos posiblemente llevándolos a un estado de quiescencia.
- SIRT1 es importante para iniciar la reprogramación metabólica.
- El inhibidor de NAMPT, FK866, aumenta la diferenciación adipogénica, probablemente relacionado con el aumento de especies reactivas de oxígeno, las cuales promueven la diferenciación celular.

11. Perspectivas

- Medir la acetilación durante la diferenciación adipogénica con los distintos tratamientos.
- Medir el ciclo celular para confirmar quiescencia de las células tratadas con NAD⁺.
- Caracterizar a SIRT1 durante la diferenciación osteogénica, ya que se ha descrito que la osteogénesis y la adipogénesis son mutuamente excluyentes desde el compromiso del linaje.
- Realizar RNA-seq a los días 0, 8 y 16 de diferenciación adipogénica y con los distintos tratamientos para saber a qué nivel se está dando la regulación transcripcional por parte de SIRT1 y qué genes están expresados durante esta reprogramación metabólica.

12. Referencias

1. Potten CS, Loeffler M. Stem cells: attributes, cycles, spirals, pitfalls and uncertainties. Lessons for and from the crypt. *Development*. 1990;110(4):1001-20.
2. Morrison SJ, Kimble J. Asymmetric and symmetric stem-cell divisions in development and cancer. *Nature*. 2006;441(7097):1068-74.
3. Watt FM, Driskell RR. The therapeutic potential of stem cells. *Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences*. 2010;365(1537):155-63.
4. Hadjantonakis A-K, Papaioannou VE. The stem cells of early embryos. *Differentiation*. 2001;68(4):159-66.
5. Brook FA, Gardner RL. The origin and efficient derivation of embryonic stem cells in the mouse. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1997;94(11):5709-12.
6. Nichols J, Smith A. Pluripotency in the embryo and in culture. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 4(8):a008128-a.
7. Zeisig BB, So CWE. Combinatorial Tethering: A Novel Mode to Recruit Non-canonical PRC1 for Normal and Malignant GC B Cell Development. *Cancer cell*. 2016;30(2):185-7.
8. Chamberlain G, Fox J, Ashton B, Middleton J. Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. *Stem cells*. 2007;25(11):2739-49.
9. Uccelli A, Moretta L, Pistoia V. Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nat Rev Immunol*. 2008;8(9):726-36.
10. Friedenstein AJ, Gorskaja JF, Kulagina NN. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Experimental hematology*. 1976;4(5):267-74.
11. Caplan AI. The mesengenic process. *Clinics in plastic surgery*. 1994;21(3):429-35.
12. Bianco P, Robey PG, Simmons PJ. Mesenchymal Stem Cells: Revisiting History, Concepts, and Assays. *Cell Stem Cell*. 2008;2(4):313-9.
13. Le Blanc K. Mesenchymal stromal cells: tissue repair and immune modulation. *Cytotherapy*. 2006;8(6):559-61.
14. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;8(4):315-7.
15. Sordi V. Mesenchymal Stem Cell Homing Capacity. 2009;87(9S):S42-S5.
16. Wulf GG, Jackson KA, Goodell MA. Somatic stem cell plasticity: current evidence and emerging concepts. *Experimental hematology*. 2001;29(12):1361-70.
17. Phinney DG, Isakova I. Plasticity and therapeutic potential of mesenchymal stem cells in the nervous system. *Current pharmaceutical design*. 2005;11(10):1255-65.
18. Mayani H, Guilbert LJ, Janowska-Wieczorek A. Biology of the hemopoietic microenvironment. *European Journal of Haematology*. 1992;49(5):225-33.
19. Kaundal U, Bagai U, Rakha A. Immunomodulatory plasticity of mesenchymal stem cells: a potential key to successful solid organ transplantation. *J Transl Med*. 2018;16(1):31-.
20. Jiang X-X, Zhang Y, Liu B, Zhang S-X, Wu Y, Yu X-D, et al. Human mesenchymal stem cells inhibit differentiation and function of monocyte-derived dendritic cells. *Blood*. 2005;105(10):4120.
21. Krampera M, Cosmi L, Angeli R, Pasini A, Liotta F, Andreini A, et al. Role for interferon-gamma in the immunomodulatory activity of human bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem cells (Dayton, Ohio)*. 2006;24(2):386-98.
22. Janderova L, McNeil M, Murrell AN, Mynatt RL, Smith SR. Human mesenchymal stem cells as an in vitro model for human adipogenesis. *Obesity research*. 2003;11(1):65-74.
23. Rosen ED, MacDougald OA. Adipocyte differentiation from the inside out. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2006;7(12):885-96.
24. Christodoulides C, Lagathu C, Sethi JK, Vidal-Puig A. Adipogenesis and WNT signalling. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*. 2009;20(1):16-24.
25. Sarjeant K, Stephens JM. Adipogenesis. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 4(9):a008417-a.
26. Aprile M, Ambrosio MR, D'Esposito V, Beguinot F, Formisano P, Costa V, et al. PPAR γ in Human Adipogenesis: Differential Contribution of Canonical Transcripts and Dominant Negative Isoforms. *PPAR research*. 2014;2014:537865.

27. De Gemmis P, Lapucci C, Bertelli M, Tognetto A, Fanin E, Vettor R, et al. A real-time PCR approach to evaluate adipogenic potential of amniotic fluid-derived human mesenchymal stem cells. *Stem cells and development*. 2006;15(5):719-28.
28. Aprile M, Ambrosio MR, D'Esposito V, Beguinot F, Formisano P, Costa V, et al. PPAR γ in Human Adipogenesis: Differential Contribution of Canonical Transcripts and Dominant Negative Isoforms. *PPAR Res*. 2014;2014:537865-.
29. Schofield R. The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood cells*. 1978;4(1-2):7-25.
30. Morrison SJ, Spradling AC. Stem cells and niches: mechanisms that promote stem cell maintenance throughout life. *Cell*. 2008;132(4):598-611.
31. Flores-Figueroa E, Montesinos JJ, Mayani H. Células troncales mesenquimales: historia, biología y aplicación clínica. *Revista de investigación clínica*. 2006;58:498-511.
32. Spencer JA, Ferraro F, Roussakis E, Klein A, Wu J, Runnels JM, et al. Direct measurement of local oxygen concentration in the bone marrow of live animals. *Nature*. 2014;508(7495):269-73.
33. Mohyeldin A, Garzon-Muvdi T, Quinones-Hinojosa A. Oxygen in stem cell biology: a critical component of the stem cell niche. *Cell stem cell*. 2010;7(2):150-61.
34. Harvey AJ, Rathjen J, Gardner DK. Metaboloepigenetic Regulation of Pluripotent Stem Cells. *Stem cells international*. 2016;2016:1816525.
35. Shyh-Chang N, Daley GQ, Cantley LC. Stem cell metabolism in tissue development and aging. *Development (Cambridge, England)*. 2013;140(12):2535-47.
36. Suda T, Takubo K, Semenza GL. Metabolic regulation of hematopoietic stem cells in the hypoxic niche. *Cell stem cell*. 2011;9(4):298-310.
37. Nuschke A, Rodrigues M, Wells AW, Sylakowski K, Wells A. Mesenchymal stem cells/multipotent stromal cells (MSCs) are glycolytic and thus glucose is a limiting factor of in vitro models of MSC starvation. *Stem Cell Res Ther*. 2016;7(1):179.
38. Forni MF, Peloggia J, Trudeau K, Shirihai O, Kowaltowski AJ. Murine Mesenchymal Stem Cell Commitment to Differentiation Is Regulated by Mitochondrial Dynamics. *Stem Cells*. 2016;34(3):743-55.
39. Ryall JG, Dell'Orso S, Derfoul A, Juan A, Zare H, Feng X, et al. The NAD(+)-dependent SIRT1 deacetylase translates a metabolic switch into regulatory epigenetics in skeletal muscle stem cells. *Cell stem cell*. 2015;16(2):171-83.
40. Cho YM, Kwon S, Pak YK, Seol HW, Choi YM, Park DJ, et al. Dynamic changes in mitochondrial biogenesis and antioxidant enzymes during the spontaneous differentiation of human embryonic stem cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2006;348(4):1472-8.
41. Ryall JG, Dell'Orso S, Derfoul A, Juan A, Zare H, Feng X, et al. The NAD(+)-dependent SIRT1 deacetylase translates a metabolic switch into regulatory epigenetics in skeletal muscle stem cells. *Cell Stem Cell*. 2015;16(2):171-83.
42. Khacho M, Slack RS. Mitochondrial activity in the regulation of stem cell self-renewal and differentiation. *Curr Opin Cell Biol*. 2017;49:1-8.
43. Cho YM, Kwon S, Pak YK, Seol HW, Choi YM, Park DJ, et al. Dynamic changes in mitochondrial biogenesis and antioxidant enzymes during the spontaneous differentiation of human embryonic stem cells. *Biochemical and biophysical research communications*. 2006;348(4):1472-8.
44. Chung S, Yao H, Caito S, Hwang J-W, Arunachalam G, Rahman I. Regulation of SIRT1 in cellular functions: role of polyphenols. *Arch Biochem Biophys*. 2010;501(1):79-90.
45. Chen CT, Shih YR, Kuo TK, Lee OK, Wei YH. Coordinated changes of mitochondrial biogenesis and antioxidant enzymes during osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Stem cells (Dayton, Ohio)*. 2008;26(4):960-8.
46. Zhang Y, Marsboom G, Toth PT, Rehman J. Mitochondrial respiration regulates adipogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *PloS one*. 2013;8(10):e77077.
47. Khacho M, Clark A, Svoboda Devon S, Azzi J, MacLaurin Jason G, Meghaizel C, et al. Mitochondrial Dynamics Impacts Stem Cell Identity and Fate Decisions by Regulating a Nuclear Transcriptional Program. *Cell Stem Cell*. 2016;19(2):232-47.
48. Lyublinskaya OG, Borisov YG, Pugovkina NA, Smirnova IS, Obidina JV, Ivanova JS, et al. Reactive Oxygen Species Are Required for Human Mesenchymal Stem Cells to Initiate Proliferation after the Quiescence Exit. *Oxid Med Cell Longev*. 2015;2015:502105-.
49. Hwang I-Y, Kwak S, Lee S, Kim H, Lee Sang E, Kim J-H, et al. Psat1-Dependent Fluctuations in α -Ketoglutarate Affect the Timing of ESC Differentiation. *Cell Metabolism*. 2016;24(3):494-501.

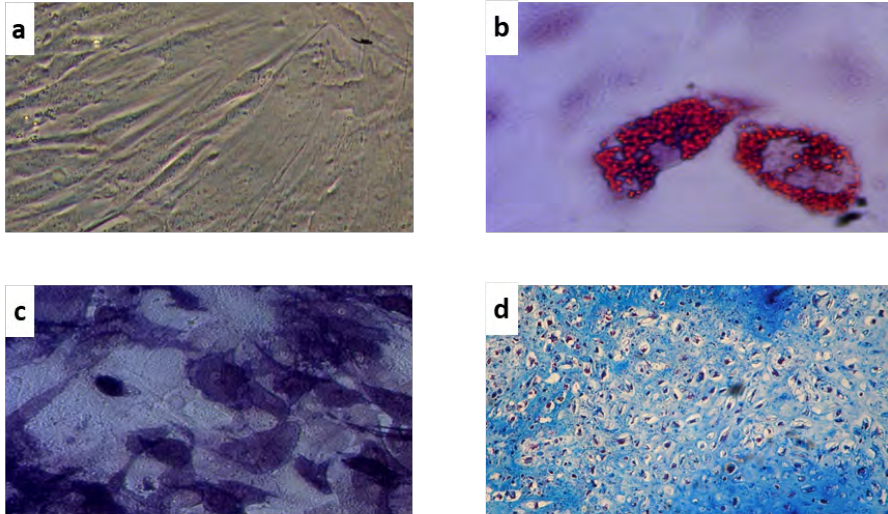
50. Lu C, Thompson CB. Metabolic regulation of epigenetics. *Cell metabolism*. 2012;16(1):9-17.
51. Imai S, Guarente L. NAD⁺ and sirtuins in aging and disease. *Trends in cell biology*. 2014;24(8):464-71.
52. Stein LR, Imai S. The dynamic regulation of NAD metabolism in mitochondria. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*. 2012;23(9):420-8.
53. Berger SL, Sassone-Corsi P. Metabolic Signaling to Chromatin. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 2016;8(11).
54. Houtkooper RH, Argmann C, Houten SM, Canto C, Jenjira EH, Andreux PA, et al. The metabolic footprint of aging in mice. *Scientific reports*. 2011;1:134.
55. Houtkooper RH, Canto C, Wanders RJ, Auwerx J. The secret life of NAD⁺: an old metabolite controlling new metabolic signaling pathways. *Endocrine reviews*. 2010;31(2):194-223.
56. Imai S. Nicotinamide phosphoribosyltransferase (Nampt): a link between NAD biology, metabolism, and diseases. *Current pharmaceutical design*. 2009;15(1):20-8.
57. Strømland Ø, Niere M, Nikiforov AA, VanLinden MR, Heiland I, Ziegler M. Keeping the balance in NAD metabolism. *Biochemical Society Transactions*. 2019;47(1):119.
58. Zhang T, Kraus WL. SIRT1-dependent regulation of chromatin and transcription: linking NAD(+) metabolism and signaling to the control of cellular functions. *Biochimica et biophysica acta*. 2010;1804(8):1666-75.
59. Houtkooper RH, Pirinen E, Auwerx J. Sirtuins as regulators of metabolism and healthspan. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2012;13(4):225-38.
60. Michan S, Sinclair D. Sirtuins in mammals: insights into their biological function. *The Biochemical journal*. 2007;404(1):1-13.
61. Aguilar-Arnal L, Katada S, Orozco-Solis R, Sassone-Corsi P. NAD(+)-SIRT1 control of H3K4 trimethylation through circadian deacetylation of MLL1. *Nature structural & molecular biology*. 2015;22(4):312-8.
62. Liou GG, Tanny JC, Kruger RG, Walz T, Moazed D. Assembly of the SIR complex and its regulation by O-acetyl-ADP-ribose, a product of NAD-dependent histone deacetylation. *Cell*. 2005;121(4):515-27.
63. Picard F, Kurtev M, Chung N, Topark-Ngarm A, Senawong T, Machado De Oliveira R, et al. Sirt1 promotes fat mobilization in white adipocytes by repressing PPAR-gamma. *Nature*. 2004;429(6993):771-6.
64. Chung S, Yao H, Caito S, Hwang JW, Arunachalam G, Rahman I. Regulation of SIRT1 in cellular functions: role of polyphenols. *Arch Biochem Biophys*. 2010;501(1):79-90.
65. Backesjo CM, Li Y, Lindgren U, Haldosen LA. Activation of Sirt1 decreases adipocyte formation during osteoblast differentiation of mesenchymal stem cells. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. 2006;21(7):993-1002.
66. Zhang T, Kraus WL. SIRT1-dependent regulation of chromatin and transcription: linking NAD(+) metabolism and signaling to the control of cellular functions. *Biochim Biophys Acta*. 2010;1804(8):1666-75.
67. O'Hagan HM, Mohammad HP, Baylin SB. Double strand breaks can initiate gene silencing and SIRT1-dependent onset of DNA methylation in an exogenous promoter CpG island. *PLoS genetics*. 2008;4(8):e1000155.
68. Prozorovski T, Schulze-Topphoff U, Glumm R, Baumgart J, Schroter F, Ninnemann O, et al. Sirt1 contributes critically to the redox-dependent fate of neural progenitors. *Nature cell biology*. 2008;10(4):385-94.
69. Howitz KT, Bitterman KJ, Cohen HY, Lamming DW, Lavu S, Wood JG, et al. Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan. *Nature*. 2003;425(6954):191-6.
70. Gertz M, Fischer F, Nguyen GTT, Lakshminarasimhan M, Schutkowski M, Weyand M, et al. Ex-527 inhibits Sirtuins by exploiting their unique NAD⁺-dependent deacetylation mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2013;110(30):E2772-E81.
71. Hasmann M, Schemainda I. FK866, a highly specific noncompetitive inhibitor of nicotinamide phosphoribosyltransferase, represents a novel mechanism for induction of tumor cell apoptosis. *Cancer research*. 2003;63(21):7436-42.
72. Felsenfeld G. A brief history of epigenetics. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 2014;6(1).
73. Allis CD, Jenuwein T. The molecular hallmarks of epigenetic control. *Nature reviews Genetics*. 2016;17(8):487-500.
74. Kouzarides T. SnapShot: Histone-modifying enzymes. *Cell*. 2007;131(4):822.
75. Felsenfeld G, Groudine M. Controlling the double helix. *Nature*. 2003;421(6921):448-53.

76. Lalonde ME, Cheng X, Cote J. Histone target selection within chromatin: an exemplary case of teamwork. *Genes & development*. 2014;28(10):1029-41.
77. Inbar-Feigenberg M, Choufani S, Butcher DT, Roifman M, Weksberg R. Basic concepts of epigenetics. *Fertility and sterility*. 2013;99(3):607-15.
78. Zhou Y, Kim J, Yuan X, Braun T. Epigenetic modifications of stem cells: a paradigm for the control of cardiac progenitor cells. *Circulation research*. 2011;109(9):1067-81.
79. Bernstein BE, Mikkelsen TS, Xie X, Kamal M, Huebert DJ, Cuff J, et al. A Bivalent Chromatin Structure Marks Key Developmental Genes in Embryonic Stem Cells. *Cell*. 2006;125(2):315-26.
80. Boland MJ, Nazor KL, Loring JF. Epigenetic regulation of pluripotency and differentiation. *Circulation research*. 2014;115(2):311-24.
81. Hawkins RD, Hon GC, Lee LK, Ngo Q, Lister R, Pelizzola M, et al. Distinct epigenomic landscapes of pluripotent and lineage-committed human cells. *Cell stem cell*. 2010;6(5):479-91.
82. Chen R, Ren L, Cai Q, Zou Y, Fu Q, Ma Y. The role of epigenetic modifications in the osteogenic differentiation of adipose-derived stem cells. *Connective Tissue Research*. 2019:1-14.
83. Tsumura A, Hayakawa T, Kumaki Y, Takebayashi S, Sakaue M, Matsuoka C, et al. Maintenance of self-renewal ability of mouse embryonic stem cells in the absence of DNA methyltransferases Dnmt1, Dnmt3a and Dnmt3b. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms*. 2006;11(7):805-14.
84. Li H-x, Xiao L, Wang C, Gao J-l, Zhai Y-g. Epigenetic regulation of adipocyte differentiation and adipogenesis. *Journal of Zhejiang University Science B*. 2010;11:784-91.
85. Musri MM, Corominola H, Casamitjana R, Gomis R, Párrizas M. Histone H3 Lysine 4 Dimethylation Signals the Transcriptional Competence of the Adiponectin Promoter in Preadipocytes. 2006;281(25):17180-8.
86. Laugesen A, Helin K. Chromatin repressive complexes in stem cells, development, and cancer. *Cell stem cell*. 2014;14(6):735-51.
87. Atlasi Y, Stunnenberg HG. The interplay of epigenetic marks during stem cell differentiation and development. *Nature Reviews Genetics*. 2017;18:643.
88. Lin N, Chang KY, Li Z, Gates K, Rana ZA, Dang J, et al. An evolutionarily conserved long noncoding RNA TUNA controls pluripotency and neural lineage commitment. *Molecular cell*. 2014;53(6):1005-19.
89. Mehlem A, Hagberg CE, Muhl L, Eriksson U, Falkevall A. Imaging of neutral lipids by oil red O for analyzing the metabolic status in health and disease. *Nature Protocols*. 2013;8:1149.
90. Rao X, Lai D, Huang X. A new method for quantitative real-time polymerase chain reaction data analysis. *Journal of computational biology : a journal of computational molecular cell biology*. 2013;20(9):703-11.
91. Aguilar-Arnal L, Ranjit S, Stringari C, Orozco-Solis R, Gratton E, Sassone-Corsi P. Spatial dynamics of SIRT1 and the subnuclear distribution of NADH species. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2016;113(45):12715.
92. Kim BS, Lee CH, Chang GE, Cheong E, Shin I. A potent and selective small molecule inhibitor of sirtuin 1 promotes differentiation of pluripotent P19 cells into functional neurons. *Sci Rep*. 2016;6:34324.
93. Rosenberg MI, Parkhurst SM. Drosophila Sir2 is required for heterochromatic silencing and by euchromatic Hairy/E(Spl) bHLH repressors in segmentation and sex determination. *Cell*. 2002;109(4):447-58.
94. Tanno M, Sakamoto J, Miura T, Shimamoto K, Horio Y. Nucleocytoplasmic shuttling of the NAD⁺-dependent histone deacetylase SIRT1. *The Journal of biological chemistry*. 2007;282(9):6823-32.
95. Gao Z, Zhang J, Kheterpal I, Kennedy N, Davis RJ, Ye J. Sirtuin 1 (SIRT1) protein degradation in response to persistent c-Jun N-terminal kinase 1 (JNK1) activation contributes to hepatic steatosis in obesity. *The Journal of biological chemistry*. 2011;286(25):22227-34.
96. Lecker SH, Goldberg AL, Mitch WE. Protein degradation by the ubiquitin-proteasome pathway in normal and disease states. *J Am Soc Nephrol*. 2006;17(7):1807-19.
97. Lee JE, Ge K. Transcriptional and epigenetic regulation of PPARgamma expression during adipogenesis. *Cell Biosci*. 2014;4:29.
98. Yu JH, Song SJ, Kim A, Choi Y, Seok JW, Kim HJ, et al. Suppression of PPARgamma-mediated monoacylglycerol O-acyltransferase 1 expression ameliorates alcoholic hepatic steatosis. *Sci Rep*. 2016;6:29352.
99. Qiang L, Wang L, Kon N, Zhao W, Lee S, Zhang Y, et al. Brown remodeling of white adipose tissue by SirT1-dependent deacetylation of Ppargamma. *Cell*. 2012;150(3):620-32.
100. Choi Y, Um SJ, Park T. Indole-3-carbinol directly targets SIRT1 to inhibit adipocyte differentiation. *International journal of obesity (2005)*. 2013;37(6):881-4.

101. Zhou Y, Zhou Z, Zhang W, Hu X, Wei H, Peng J, et al. SIRT1 inhibits adipogenesis and promotes myogenic differentiation in C3H10T1/2 pluripotent cells by regulating Wnt signaling. *Cell & bioscience*. 2015;5:61.
102. Guarente L. Sirtuins, aging, and metabolism. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology*. 2011;76:81-90.
103. Xu R, Yuan Z, Yang L, Li L, Li D, Lv C. Inhibition of NAMPT decreases cell growth and enhances susceptibility to oxidative stress. *Oncology reports*. 2017;38(3):1767-73.
104. Kubli DA, Sussman MA. Eat, breathe, ROS: controlling stem cell fate through metabolism. *Expert review of cardiovascular therapy*. 2017;15(5):345-56.
105. Tormos KV, Anso E, Hamanaka RB, Eisenbart J, Joseph J, Kalyanaraman B, et al. Mitochondrial complex III ROS regulate adipocyte differentiation. *Cell metabolism*. 2011;14(4):537-44.
106. Chen CT, Hsu SH, Wei YH. Mitochondrial bioenergetic function and metabolic plasticity in stem cell differentiation and cellular reprogramming. *Biochim Biophys Acta*. 2012;1820(5):571-6.
107. Shum LC, White NS, Mills BN, Bentley KL, Eliseev RA. Energy Metabolism in Mesenchymal Stem Cells During Osteogenic Differentiation. *Stem Cells Dev*. 2016;25(2):114-22.
108. Valcourt JR, Lemons JM, Haley EM, Kojima M, Demuren OO, Collier HA. Staying alive: metabolic adaptations to quiescence. *Cell Cycle*. 2012;11(9):1680-96.
109. Valcourt JR, Lemons JMS, Haley EM, Kojima M, Demuren OO, Collier HA. Staying alive: metabolic adaptations to quiescence. *Cell Cycle*. 2012;11(9):1680-96.

13. Figuras suplementarias

A



B

Marcador	% de expresión
CD105	97.3±3.7
CD90	99.6±0.5
CD73	99.3±0.5
CD45	0.1±0.7
CD34	0.4±0.5
CD14	0.2±0.2

Figura S1. Caracterización de las células troncales mesenquimales de médula ósea humana. A, a) Cultivo de MSCs, Objetivo Leica 40X del microscopio Leica DMi1.; b) Diferenciación adipogénica de MSC. La diferenciación adipogénica es indicada por la formación de vacuolas lipídicas positivas a la tinción con Rojo Oleoso, Objetivo Leica 40X del microscopio Leica DMi1.; c) Diferenciación osteogénica de MSC. La diferenciación osteogénica está indicada por la positividad a la actividad de fosfatasa alcalina, la positividad se observa de color morado y negro. Diferenciación condrogénica de MSC. La diferenciación condrogénica es indicada por la presencia de colágena producida en las micromasas de MSC, la positividad se observa por la colágena teñida de color azul por la tinción de Tricrómico de Masón, Objetivo Leica 20X del microscopio Leica DMi1. B, Expresión de marcadores de superficie de MSCs determinado por citometría de flujo. Los valores se muestran en porcentajes de células positivas para los diferentes marcadores y corresponde a la media de los valores a partir de experimentos separados (n=3).

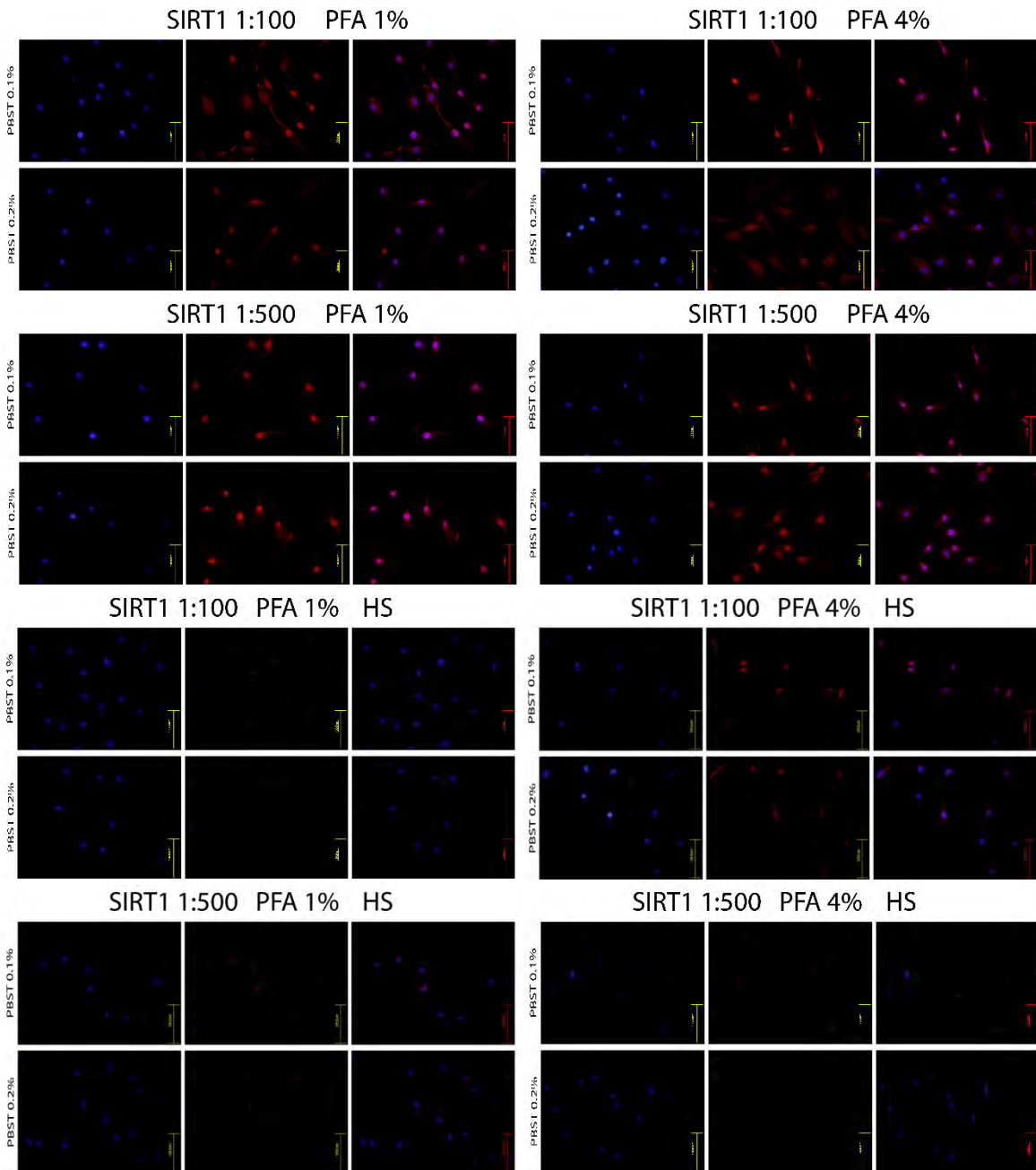


Figura S2. Estandarización de las inmunofluorescencias para SIRT1. Se probaron distintas condiciones de fijación PFA al 1 ó 4%, permeabilización PBST al 0.1 ó 0.2%, dilución del anticuerpo primario anti-SIRT1 1:100 ó 1:500 y bloqueo con BSA al 2% o Suero de caballo (HS) al 10%. Se determinó la concentración del anticuerpo primario anti-SIRT1 1:500, ya que, disminuye la señal inespecífica, se escogió PFA al 1% para fijar las células porque se maltratan menos, para permeabilizar se escogió PBST al 0.1% debido a que también disminuye la señal inespecífica, y para bloquear, se escogió BSA, ya que con el suero de caballo (HS) se pierde mucha señal. Escala 100 μm .

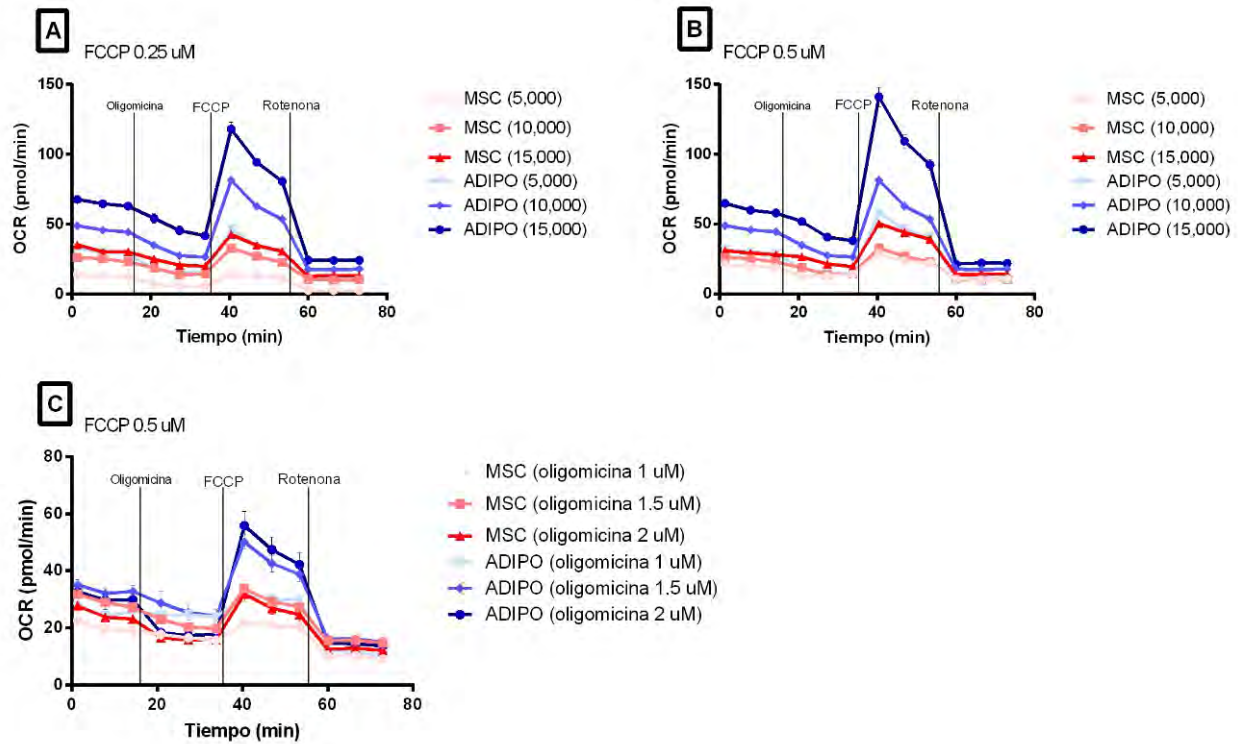


Figura S3. Estandarización Seahorse XFe96 Analyzer. Se utilizaron células MSC sin diferenciar, y células MSC con inducción adipogénica al día 8. A) Se sembraron distintas densidades celulares y se probó una concentración de FCCP 0.25 uM, se escogió la densidad de 10,000 células, porque permite ver cambios hacia arriba y hacia abajo. B) Se probaron las mismas densidades celulares y una concentración de FCCP 0.5 uM, se determinó esta concentración como la mejor, ya que lleva al máximo la respiración celular. C) Se sembraron 10,000 células y se probaron distintas concentraciones de oligomycin, se escogió la concentración 2 uM, porque abate mejor la respiración celular debida a la producción de ATP. Se determinaron los parámetros: 10,000 células, FCCP 0.5 uM y oligomycin 2 uM.

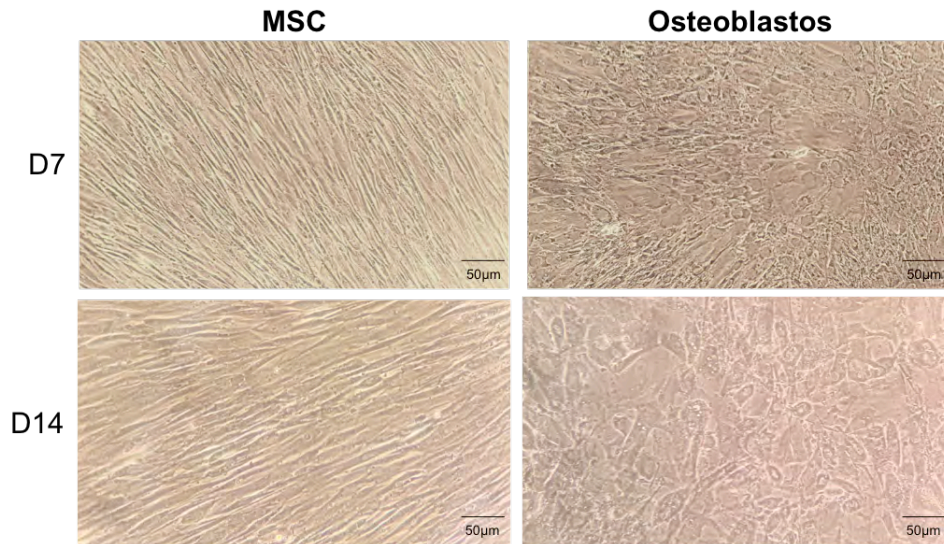


Figura S4. Las MSC se diferenciaron en osteoblastos. Del lado izquierdo se muestran las MSC sin tratamiento, a los días 7 y 14, del lado derecho se muestran las MSC tratadas con medio de diferenciación osteogénico a los días 7 y 14, presentan la morfología poligonal típica de los osteoblastos. Escala 50 μm .

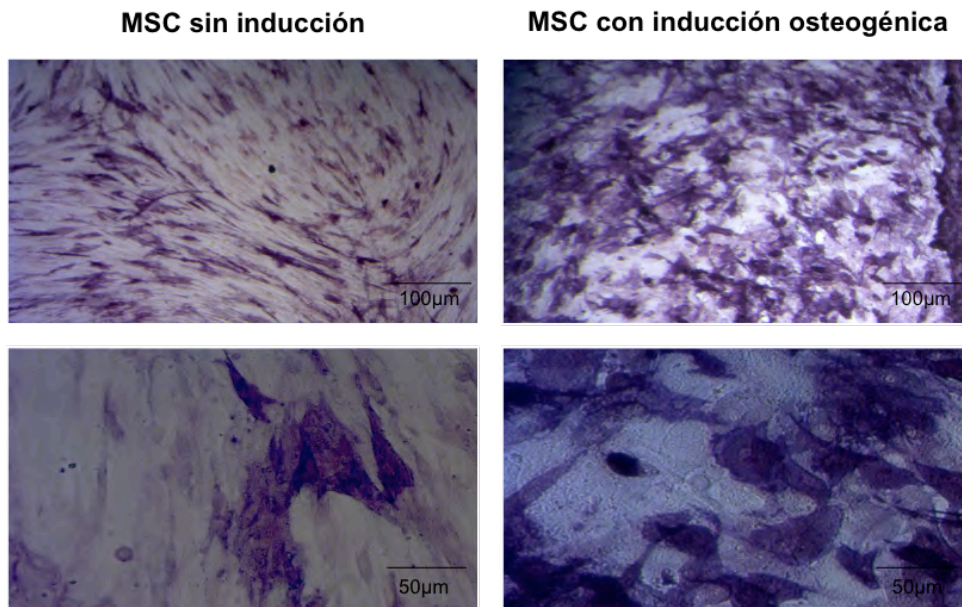


Figura S5. Las MSC inducidas a la diferenciación osteogénica fueron positivas a fosfatasa alcalina. Las imágenes de la izquierda corresponden a las MSC sin tratamiento, y las de la derecha a las MSC tratadas con medio de diferenciación osteogénico al día 14, las cuales se observan más oscuras, indicando un aumento de la actividad de la enzima fosfatasa alcalina y, por lo tanto, diferenciación osteogénica. Escalas 100 y 50 μm .

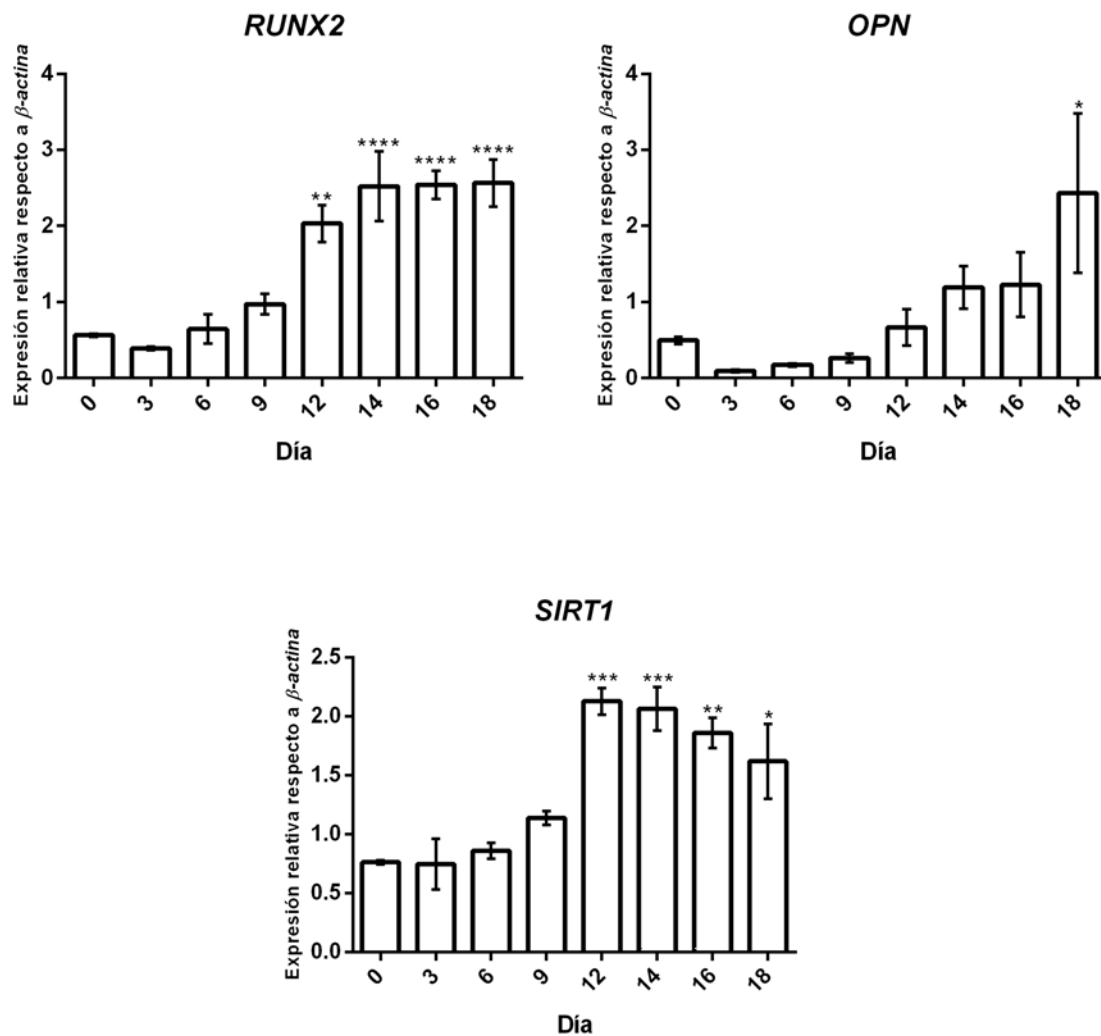


Figura S6. La expresión de *SIRT1* y de los genes de diferenciación osteogénica aumentó en MSC a diferentes días de la inducción osteogénica. Se determinó la expresión por PCR en tiempo real, utilizando β -actina como gen endógeno de referencia. Todos los resultados representan los promedios \pm SEM de tres experimentos independientes ($n=3$). La significancia se determinó mediante una prueba de ANOVA de una vía seguida de una prueba post hoc de Dunnett's para múltiples comparaciones, con respecto al día cero. * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$, **** $P \leq 0.0001$.

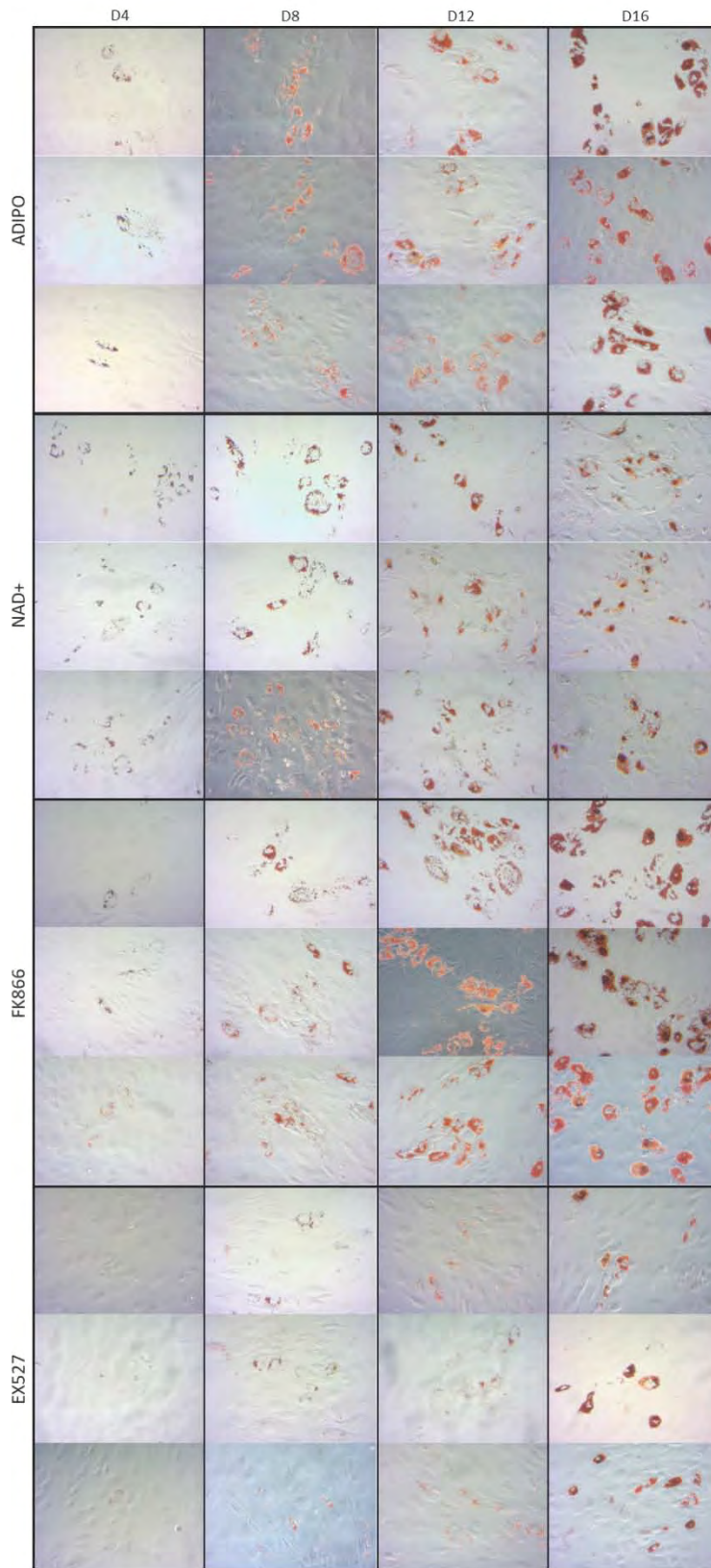


Figura S7. Replicados biológicos de la tinción con rojo oleoso. Se realizó una tinción con rojo oleoso a los días 4, 8, 12, 16 de la diferenciación adipogénica de las células tratadas con NAD⁺, FK866 y EX527.

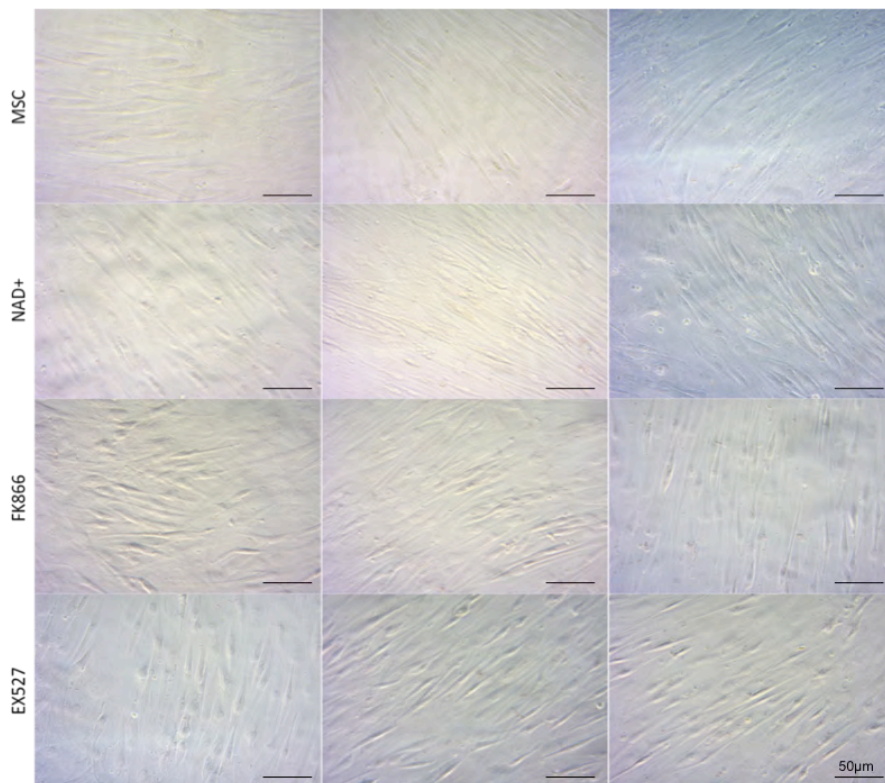


Figura S8. Tinción con rojo oleoso control. Se realizó una tinción con rojo oleoso a las células MSC el día 16 del tratamiento con NAD^+ , FK866 y EX527 ($n=3$), pero sin la inducción adipogénica para comprobar que la formación de adipocitos no esté dada por los tratamientos por sí solos, no se observa formación de adipocitos en ningún tratamiento. Escala 50 μm .

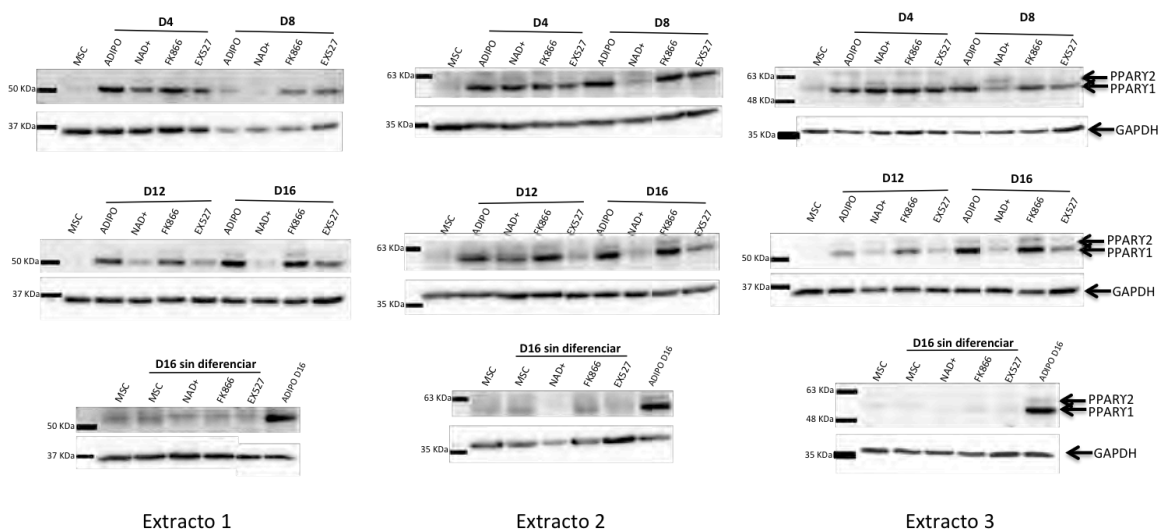


Figura S9. Replicados biológicos del *Western blot* de $\text{PPAR}\gamma$. $\text{PPAR}\gamma$ en tres extractos proteicos diferentes durante la diferenciación adipogénica de MSC, con los distintos tratamientos: NAD^+ , FK866 y EX527, además de los extractos de células que sólo fueron tratadas, pero no se les indujo la diferenciación como control.