



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Activación sostenida de la Respuesta al Daño en el ADN inducida por TNF- α en adipocitos maduros

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:

Aarón Gerardo Sánchez Brito

TUTOR PRINCIPAL

Dra. Mahara Angélica Valverde Ramírez
[Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. Marcia Hiriart Urdanivia
[Instituto de Fisiología Celular, UNAM](#)

Dr. Juan José Montesinos Montesinos
[Facultad de Medicina, UNAM](#)

Ciudad de México. Febrero, 2022



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

El presente trabajo se realizó en el laboratorio C239 del Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la Dirección de la Dra. Mahara Angelica Valverde Ramírez con el financiamiento de los proyectos del **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) A1-S-21417** y del **Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la DGAPA-UNAM IN209320**.

AGRADECIMIENTOS

A mi comité tutor: la Doctora Marcia Hiriart Urdanivia y el Doctor Juan José Montesinos Montesinos, por sus siempre valiosas aportaciones y opiniones hacia mi trabajo, las cuales, contribuyeron enormemente en él.

A mis compañeros de laboratorio: Tomas, Ricardo, Emmanuel, Paulina por su amistad y disposición constante para ayudarme en varios aspectos de mi vida personal y académica. Que sin su ayuda todo esto hubiera sido más difícil.

A la doctora Alexandra: por su ayuda y enseñanza constante que me ayudaron a comprender y ejercer correctamente las técnicas requeridas por el proyecto. Además de ofrecerme su amistad y apoyo.

A Jimena, mi compañera de vida; gracias a su comprensión, apoyo y cariño. Porque muchas de las cosas que he logrado en los últimos años, no habrían sido posibles sin su apoyo. Un paso más juntos.

A mi madre y a mi hermano: por ser siempre los pilares de mi vida, porque gracias a sus enseñanzas y apoyo; he sabido salir adelante en cualquier situación adversa.

A la doctora Mahara y al doctor Emilio: por haberme acogido en el laboratorio en un momento difícil. Por enseñarme a mirar siempre el lado positivo de las cosas y por haber hecho aportaciones invaluable a mi desarrollo profesional y personal. Por ello, muchas gracias

A la UNAM: por haberme permitido formar parte de sus filas. Porque es un orgullo ser parte de la máxima casa de estudios.

Al CONACYT por haberme otorgado la beca con número de C.V 925795.

INDICE

ABREVIATURAS.....	5
RESUMEN	6
ANTECEDENTES	7
El adipocito.....	7
Adipogénesis.....	10
Cascada transcripcional de la adipogénesis	11
Mecanismos de reparación del ADN	14
Capacidad de reparación del ADN a través de la adipogénesis.....	17
Respuesta al Daño en el ADN (DDR).....	19
Activación Sostenida de la DDR.....	22
Disfunción adipocitaria	24
Factor de Necrosis Tumoral α (TNF-α).....	26
HIPOTESIS	30
OBJETIVO GENERAL.....	30
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	31
ESQUEMA DE TRABAJO	32
.....	32
Cultivo celular	33
Diferenciación celular.....	33
Ensayo de Tinción con Rojo Oleoso.....	34
Tratamiento con TNF-α, como estímulo proinflamatorio	34
Una vez que se llegó al día 14 de diferenciación, las células fueron lavadas con PBS 1x, para eliminar remanentes celulares. Las células fueron expuestas a TNF-α a una concentración de 125ng/ml (reportada por Turner et al., como estímulo generador de disfunción de adipocitos) por 24 horas. La condición control únicamente tuvo cambio de medio. Transcurrido el tiempo de tratamiento, las células fueron sometidas a diferentes ensayos a continuación descritos.	35
Viabilidad Celular	35
Daño al ADN (Ensayo cometa alcalino pH >13)	35
Especies Reactivas de Oxígeno (ERO).....	37

Activación de la DDR.....	37
Detección de Potencial de Membrana Mitocondrial.....	38
ELISA.....	39
ANÁLISIS ESTADÍSTICO	40
RESULTADOS.....	40
• Cambios morfológicos a través de la diferenciación de células hAD-MSC.....	40
• Potencial de membrana mitocondrial.....	44
• Daño al ADN en adipocitos maduros tratados con TNF-α.....	45
• Incremento en los niveles de ERO´s inducidas por TNF-α.....	47
• Correlación positiva entre el daño en el ADN y ERO.....	48
• Activación de la DDR en adipocitos tratados con TNF-α.....	49
• Autorregulación de TNF-α en adipocitos maduros.....	51
• El medio de cultivo proveniente de adipocitos tratados con TNF-α (MCT) inhibe parcialmente el proceso adipogénico.....	52
• El MCT induce daño en el ADN al término de la diferenciación adipocitaria...53	53
• El MCT incrementa los DSB y la activación de la DDR en células hAD-MSC tratadas a partir del día 7 de la adipogénesis.....	55
DISCUSIÓN.....	57
CONCLUSIONES	67
MODELO PROPUESTO	68
REFERENCIAS.....	69

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
MSC	Células troncales/estromales mesenquimales
hAD-MSC	MSC derivadas de tejido adiposo humano adulto
DDR	Respuesta al daño en el ADN
ERO's	Especies Reactivas de Oxígeno
TNF- α	Factor de Necrosis Tumoral alpha
TNFR	Receptor de TNF- α
TG	Triacilgliceroles
RE	Retículo Endoplasmático
HSL	Lipasa sensible a hormonas
DSB	Rompimientos de doble cadena del ADN
SSB	Rompimientos de una cadena del ADN
8 OxoG	8-Oxo-Guanina
HR	Recombinación Homologa
NHEJ	Unión de extremos no homólogos
NER	Reparación por escisión de nucleótidos
BER	Reparación por escisión de bases
MMR	Reparación por error de apareamiento
ATM	Proteína Ataxia Telangectasia Mutada
γ H2AX	Histona gamma H2AX
CTE	Cadena de transporte de electrones
SASP	Fenotipo Secretorio Asociado a Senescencia

RESUMEN

Los adipocitos son el principal componente celular del tejido adiposo blanco. Por medio de moléculas señalizadoras solubles regulan numerosos procesos fisiológicos y fisiopatológicos que controlan el metabolismo de la glucosa, el apetito, respuesta inmunológica, presión sanguínea y funciones reproductivas, entre otras. El proceso encargado de la generación de adipocitos maduros es mejor conocido como adipogénesis. Trabajos previos realizados en nuestro laboratorio han demostrado que el proceso de adipogénesis, *per se*, involucra una pérdida gradual de la capacidad reparativa de lesiones en el ADN de adipocitos provenientes de células troncales/estromales mesenquimales derivadas de tejido adiposo humano (hAD-MSC). De ser persiste el daño en el ADN, se activará la Respuesta al Daño en el ADN (DDR). Sin embargo, de mantenerse activa por largos periodos de tiempo (días a meses) resulta perjudicial para la célula ya que puede inducir disfunción del del adipocito, senescencia y/o apoptosis. Por otra parte, el TNF- α ha sido estrechamente relacionado con varias fisiopatologías relacionadas con un mal funcionamiento del adipocito como la obesidad y la caquexia. No obstante, el mecanismo molecular no ha sido completamente elucidado.

El presente trabajo, es uno de los primeros en evidenciar la activación persistente de la DDR por medio de 125 ng/ml de TNF- α por 24 horas (concentración similar a la encontrada en el tejido adiposo durante diferentes patologías). Esta activación se correlaciona con un incremento en los niveles intracelulares de Especies Reactivas de Oxígeno (ERO's). Asimismo, se comprobó que los efectos de la activación persistente de la DDR van más allá de la célula directamente expuesta al TNF- α . Por medio de moléculas señalizadoras solubles (SASP, por sus siglas en inglés, Senescence-Associated Secretory Phenotype), la DDR influye en la diferenciación celular y procesos celulares reguladores. Con base en lo descrito, queda expuesto un mecanismo alternativo del TNF- α , mediante el cual, afecta no solo la funcionalidad del adipocito, sino también la generación de adipocitos nuevos (adipogénesis). Por ello, creemos necesaria una investigación al respecto de los

mecanismos de daño, que el TNF- α ejerce en el adipocito sano y, seguramente, en muchos otros tipos celulares.

ANTECEDENTES

El adipocito

Los adipocitos son el componente celular principal del tejido adiposo (Sherer P. et al., 2006; Lago F. et al., 2009). Son células especializadas en el almacenamiento de energía en forma de lípidos dentro de su citoplasma. Tienen la capacidad de recibir, procesar y responder a estímulos sistémicos (Liping L. et al., 2016; Tan C. et al., 2008).

Clásicamente, el adipocito maduro exhibe una forma esférica; con un tamaño aproximado de 25-150 μm (Jeanson Y. et al., 2015; Large V. et al., 2004). Su núcleo celular se encuentra desplazado a la periferia, debido a la presencia de una gota lipídica unilocular que abarca el 95% de su citoplasma. Almacena lípidos en forma de triacilgliceroles (TG), como consecuencia de la lipogénesis. Además, es capaz de liberar ácidos grasos libres (AGL) como resultado de la lipólisis (Grigoras A. et al 2018). Contiene un número pequeño de mitocondrias y una baja tasa oxidante (Jeanson Y. et al 2015). Expresa un amplio espectro de genes que codifican para marcadores propios adipocitarios, tales como: resistina, lipoproteína lipasa (LPL), gliceraldehido 3-fostato deshidrogenasa (G3PDH) (Esteve M. et al 2013; Park A. et al., 2014) y la proteína de unión a ácidos grasos tipo 4 (FABP4) (Furuhashi M. et al., 2015). Además, posee una alta capacidad de extensión y contracción, acorde al balance energético (Rigamonti A. et al., 2011).

El adipocito recibe y responde a señales sistémicas, ya sea para almacenar nutrientes o movilizarlos dependiendo de las necesidades energéticas del organismo. Ante una deprivación de nutrientes, el adipocito es estimulado por hormonas como el glucagón o la noradrenalina. Estas hormonas facilitan la activación de la lipasa sensible a hormonas (HSL) y la adipo-triglicerido lipasa

(ATGL). Permitiendo así, la lisis de los TG y la consecuente liberación de ácidos grasos no esterificados y glicerol a la circulación sanguínea. Estos dos últimos productos servirán como fuente de energía a órganos como el hígado, páncreas, y al musculo (Scherer.y Scherer, 2019). Por otra parte, ante un exceso de nutrientes, el adipocito responderá a estímulos como: altos niveles de glucosa y/o insulina; suprimiendo la acción de la HSL y ATGL. La supresión de estas enzimas favorece el consumo de glucosa y la síntesis de lípidos del *novo*. De esta manera, se propicia que el exceso de energía sea almacenado en vesículas lipídicas citoplasmáticas (Scherer y Scherer, 2019).

En los últimos años, se ha expandido el cooperativismo que desempeña el tejido adiposo, y el adipocito mismo, en la regulación del metabolismo. Esta función estará mediada por un amplio espectro de adipocinas (factores lipídicos y proteicos) secretadas por el adipocito (Lefterova, M.et al., 2009). Algunas de estas adipocinas con funciones autocrinas, paracrinas y endocrinas son: leptina, adiponectina, visfatina, apelina, vaspina, hepcidina, quemerina, omentina y un gran número de citosinas (TNF- α , IL-1 β , IL-6, TGF β , VEGF, IL-13, MCP-1, entre otras), ver **Tabla 1** (Lago F. et al., 2009; Klingenspor M. et al 2008). Muchas de esas adipocinas ayudan a coordinar el estado metabólico a nivel sistémico. Por ejemplo, la adiponectina suprime la producción de glucosa a nivel hepático y reduce la fibrosis e inflamación en otros tejidos; y la leptina actúa sobre el centro de saciedad en el cerebro para reducir el consumo de comida y promueve la lipólisis (Rigamonti A. et al., 2011).

Tabla 1. Listado de algunas de las adipocinas secretadas por el adipocito blanco y algunos de los receptores que expresa.

Adipocinas	Receptores
Adiponectina	Ob (receptor de Leptina)
Leptina	RBP4 (Proteína de unión a retinol)
Visfatina	IL-6R (Receptor de IL-6)
TNF- α (Factor de Necrosis Tumoral α)	TNFR's (Receptores de TNF- α)
Apelina	PPAR γ (Activados por proliferados de peroxisomas)
Quemerina	Receptor a hormonas tiroideas
IL-6 (Interleucina 6)	Receptor a estrógenos
TGF- β (Factor Transformante beta)	Receptor a progesterona
Prostaglandinas	Receptor a Glucocorticoides
MCP-1 (proteína quimiotáctica de Monocitos 1)	Receptor a Insulina
Factor Tisular	Receptor de Angiotensina II
VEGF (Factor de Crecimiento Endotelial Vascular)	Receptor a glucagón
Omentina	Receptor a Andrógenos
Hepcidina	Receptor a GLP-1
Resistina	Receptor a Colecistoquinina

Los adipocitos son considerados células de “vida larga”. Se calcula que aproximadamente <10% de los adipocitos humanos mueren anualmente, sin embargo; estos son reemplazados por otros “nuevos” (Rigamonti A. et al., 2011). Este reemplazo se da gracias a un proceso de diferenciación y especialización de

células precursoras, presentes en el tejido adiposo. Dicho proceso de diferenciación es mejor conocido como adipogénesis (Lefterova M. et al 2009).

Adipogénesis

Los adipocitos llegan a la madurez morfológica y funcional a través de un proceso denominado adipogénesis. La adipogénesis es el proceso de diferenciación y especialización de células precursoras, con morfología fibroblastoide, hacia adipocitos maduros cargados de lípidos y sensibles a insulina (Lefterova M. et al 2009) **Figura 1.**

Los precursores de adipocitos pueden ser clasificados en dos grupos: Células troncales/estromales mesenquimales (MSC) y preadipocitos. Las MSC son células multipotentes, capaces de diferenciarse a distintos linajes celulares del mesodermo. Mientras que los preadipocitos son células unipotentes que han adquirido un compromiso irreversible de diferenciación adipocitaria. Sin embargo, pueden mantenerse como preadipocitos por periodos largos de tiempo (James M. et al., 2009).

Este proceso de diferenciación celular involucra dos etapas: la primera es una etapa de compromiso, en la cual las MSC se diferencian hacia preadipocitos; y la segunda es cuando esos preadipocitos continúan su diferenciación hacia adipocitos maduros (Tariq A. et al., 2013). Ambas etapas son reguladas por factores transcripcionales específicos, **Figura 1.**

El abordaje *in vivo* de la adipogénesis ha resultado difícil; debido a las razones que enseguida se enumeran: 1) la heterogeneidad del tejido adiposo, en el cual, el porcentaje de células precursoras es relativamente bajo, comparado con el porcentaje de adipocitos maduros, células endoteliales, células nerviosas y fibroblastos presentes en el tejido (1-10 células precursoras por millón de células); 2) la dificultad para distinguir morfológicamente entre fibroblastos, MSC y preadipocitos; y 3) la incapacidad de sincronizar a las células precursoras en el mismo estadio del proceso. En conjunto, estos inconvenientes, dificultan el estudio *in vivo* de la adipogénesis (James M. et al., 2009). Sin embargo, esto ha sido

complementado por varios modelos *in vitro* de células precursoras; logrando un mejor entendimiento de la diferenciación y caracterización de los adipocitos (Lefterova M. et al 2009).

Con el fin de lograr esta exitosa transformación hacia adipocitos maduros, las MSC sufren cambios evidentes en su morfología y expresión de genes (Tariq A. et al., 2013). Dichos cambios serán propiciados, principalmente, por la expresión orquestada de factores transcripcionales; pertenecientes a la familia de proteínas C/EBP (del inglés, CCAAT/enhancer-binding protein) y de PPAR (del inglés, peroxisome proliferator activated receptor) (Tariq A. et al., 2013).

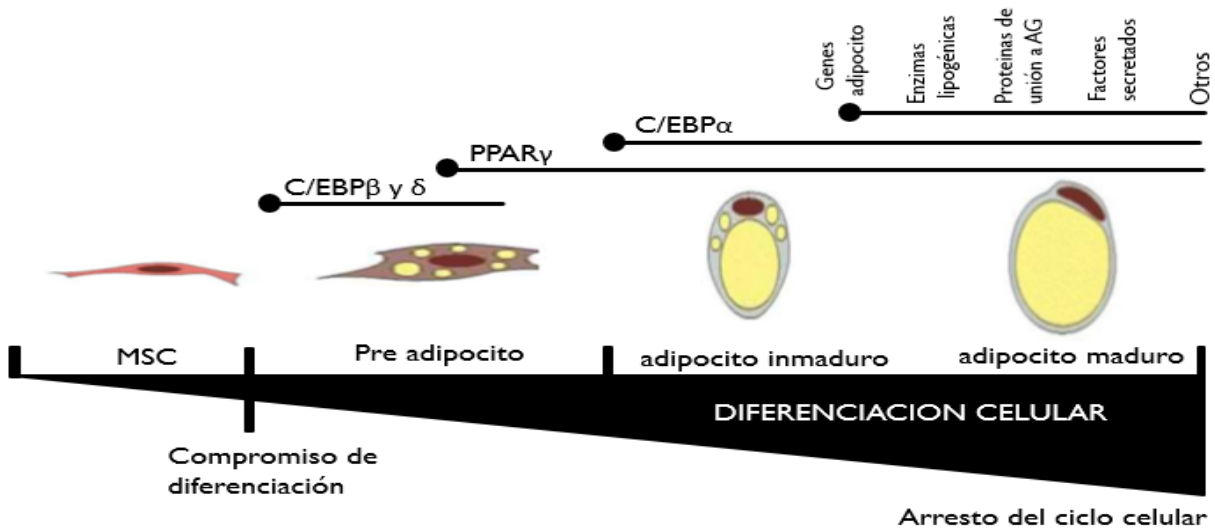


Figura 1. Adipogénesis. Este proceso consiste en la diferenciación de MSC hacia preadipocitos, seguido de la diferenciación de estos mismos preadipocitos a adipocitos maduros. Este proceso involucra la expresión de múltiples factores transcripcionales pertenecientes a las familias de C/EBP y de PPAR. Dichos factores propiciarán la expresión y secreción de la maquinaria molecular necesaria para el metabolismo de lípidos y glucosa.

Cascada transcripcional de la adipogénesis

In vitro, la adipogénesis es iniciada por estimulación hormonal, a través del uso de: dexametasona (DEX), isobutilmetilxantina (IBMX) e insulina (Chang E. et al., 2019). Sin embargo, *in vivo*, existen una gran variedad de estímulos que promueven o inhiben la adipogénesis. Por ejemplo, factores como PPAR, C/EBPs, CREB,

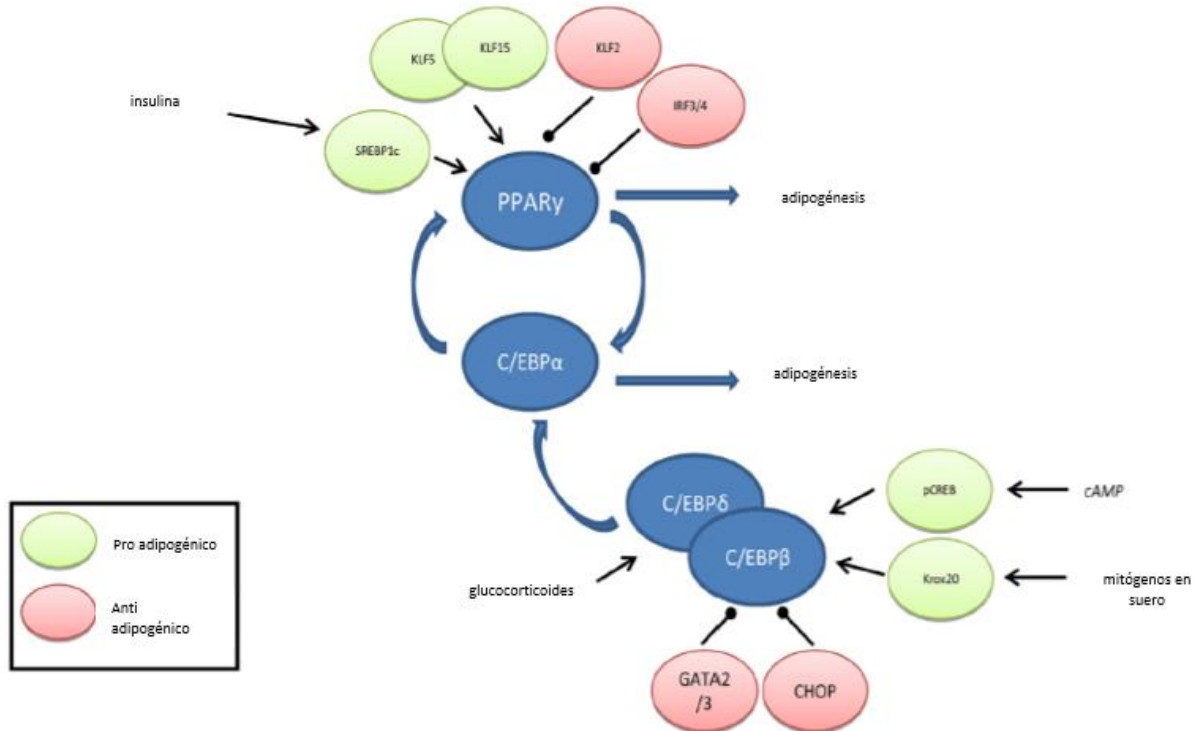
KROX20/EGR2, KLF 3-5/15, EBFs, SREBP1, ARNTL, miR-143 and 519d, BMP7 la inducen; mientras que es inhibida por TGF- β , Pref1, GATA2/3, IRF 3/4, KLF2/6 (Castanon N. et al., 2014) y TNF- α (William P. et al., 2007).

Ante dichos estímulos proadipogénicos, las MSC sufren restricciones en cuanto a su heredabilidad y adquieren un compromiso irreversible de diferenciación hacia adipocitos, convirtiéndose en preadipocitos (Lefterova M. et al 2009).

Una vez adquirido este compromiso, en el preadipocito se activan mecanismos moleculares necesarios para continuar con el proceso de la diferenciación. Estos mecanismos estarán dados por la interacción de diversos miembros de las familias C/EBP (C/EBP α , C/EBP β , C/EBP δ) y PPAR (PPAR α , PPAR γ y PPAR δ). Estos factores transcripcionales están encargados de la subsecuente expresión de otros genes involucrados en la inducción de cambios morfológicos y la producción de proteínas necesarias para el almacenaje de grasas (Gregoire F. et al., 2007). Las familias tanto de PPAR (factores de transcripción activados por ligandos de receptores hormonales nucleares) como de C/EBP (factores de transcripción con cremallera de leucina) han sido extensamente estudiadas por su papel en el mantenimiento de la homeostasis de grasas y glucosa. PPAR γ y PPAR α son proteínas expresadas, preponderantemente, en el adipocito y el hepatocito (Brey et al., 2009; Kersten S. et al., 2000). Ha sido reportado que una sobre expresión de PPAR γ es suficiente para inducir diferenciación adipocitaria. Caso contrario, una deficiencia de PPAR γ resulta en un fallo del programa adipogénico y, por ende, en lipodistrofia (Hegele RA et al., 2002). PPAR δ es expresado en diferentes tejidos y órganos como adiposo, cerebro y riñón (Brey et al., 2009; Kersten S. et al., 2000). Por otra parte, C/EBP α , C/EBP β , y C/EBP δ son expresadas, principalmente, en el tejido adiposo y han sido estrechamente relacionadas con el mantenimiento de los adipocitos terminalmente diferenciados, **Figura 2** (Yeh WC et al., 1995).

La activación, por parte de señales extracelulares, de los mecanismos moleculares involucrados en la adipogénesis resulta en una rápida expresión de C/EBP β y C/EBP δ (Turner J. et al., 1999). Los niveles de expresión de esas proteínas llegan a un máximo y declinan en un lapso aproximado de 48 horas, sin embargo, esto

favorece un aumento en los niveles de expresión de C/EBP α y PPAR γ que se mantiene durante la diferenciación. Posteriormente, PPAR γ y C/EBP α inducen su expresión mutua, formando una autorregulación positiva que permitirá a la célula sufrir una expansión clonal, hasta convertirse en adipocito inmaduro (Rosen ED. et al., 2002). Finalmente, se dará la expresión de la maquinaria molecular necesaria



para la incorporación y procesamiento de lípidos. De esta manera, al adipocito inmaduro alcanzará la madurez funcional y morfológica (Brey C. et al 2009).

Figura 2. Cascada transcripcional de la Adipogénesis. Existen diversos factores tanto inductores: SREBP, KLF5, KLF,15, pCREB, entre otros (verde-amarillo); como inhibidores de la adipogénesis: GATA2, CHOP, KLF2, IRF3/4 (rosa). Tantos los factores que inducen la adipogénesis (pro adipogénicos) como aquellos que la inhiben (anti adipogénicos) lo harán por medio de la regulación transcripcional o traduccional de los factores PPAR γ y C/EBP α . De los cuales, PPAR γ inducirá la expresión de C/EBP α y, a su vez; este regulará de manera positiva a PPAR γ y otros factores transcripcionales como C/EBP β y C/EBP δ para la culminación de la adipogénesis (Ali T- et al., 2013).

Una vez alcanzada la madurez, el adipocito sufre un arresto indefinido y estable del ciclo celular. Este arresto del ciclo celular, en G0, es mejor conocido como estado post mitótico. Dicho estado favorece el funcionamiento de estas células por tiempo prolongado. Sin embargo, el estado post mitótico resulta perjudicial para el

mantenimiento de la integridad genómica, ya que favorece la acumulación de distintos tipos de daño del ADN. Esto es debido a que la mayoría de los mecanismos de reparación del ADN son dependientes del ciclo celular (Fortini P. et al., 2013). En los mamíferos, el mantenimiento de la integridad genómica de las células post mitóticas como el adipocito, es requerido para preservar su correcto funcionamiento y, por lo tanto, el del organismo (Fortini P. et al., 2013).

Mecanismos de reparación del ADN

Todas nuestras células han adquirido, a lo largo de la evolución, mecanismos de reparación del ADN. Dichos mecanismos son altamente eficientes y específicos para contender con varios tipos de lesiones (Srivastava N. et al., 2008); manteniendo así la integridad genómica (Friedberg, E.C et al., 2008) **Figura 3.**

La actividad metabólica intrínseca y factores ambientales pueden causar daño al ADN nuclear y mitocondrial (Simonatto M. et al., 2007). Este ataque constante de agentes endógenos y/o exógenos que dañan la estructura del ADN, suele causar rompimientos de una de sus cadenas (SSB, del inglés, Single- Strand Breake) o de ambas (DSB, del inglés, Double-Strand Breakes). Las lesiones al ADN, de no ser reparadas, resultan en importantes alteraciones biológicas que favorecen el desarrollo de cáncer y otras patologías (Friedberg, E.C et al., 2008).

Estos mecanismos responderán dependiendo del tipo de daño y del estadio del ciclo celular en el que se encuentre la célula (Huertas P. et al., 2010). Dichos mecanismos pueden ser divididos con base a diversas características, sin embargo, hay cinco mecanismos de reparación del DNA principales en eucariontes, **Figura 3.**

Los mecanismos para reparar DSB son: recombinación homóloga (HR, del inglés, homologous recombination) y recombinación de extremos no homólogos (NHEJ, del inglés, non homologous end-joining). Durante la HR, las DSB son reparadas por medio del intercambio de regiones complementarias de ADN entre cromátides hermanas, mientras que en la NHEJ los DSB son religados sin el uso de algún templado (Tubbs A. et al., 2017). Una de las diferencias importantes entre la HR y la NHEJ es el grado de fidelidad que se guarda durante la reparación. El mecanismo

de NHEJ tiene una mayor probabilidad de error; debido a que frecuentemente lleva a inserciones o deleciones en el punto de lesión. Sin embargo, HR emplea un molde o templado de ADN (la cromátide hermana) que reduce, en buena medida, su probabilidad de error (Haber, J.E. et al., 2015).

Cabe mencionar que la funcionalidad de estos dos mecanismos cambia a través del ciclo celular; siendo HR el mecanismo de reparación que actúa preponderantemente en las fases S-G2 del ciclo celular. Mientras que NHEJ lo hace en G0-G1 (Haber, J.E. et al., 2015).

Los mecanismos que reparan lesiones distintas a los DSB son:

1) *Reparación por escisión de bases (BER, del inglés, base excision repair)*: corrige lesiones tales como la desaminación, oxidación o alquilación por exposición a agentes exógenos químicos o físicos (metales pesados, fármacos, radiación), o a agentes endógenos como las ERO's, que inducen SSB o sitios AP (sitiosapurínicos-apirimidínicos). Esta tarea será mediada por las ADN glicosilasas específicas de base; enzimas encargadas del reconocimiento y, en algunos casos, escisión de la base mal apareada (Lindahl T. et al., 1974).

2) *Reparación por escisión de nucleótidos (NER, del inglés, nucleotide excision repair)*: este mecanismo es el encargado de la reparación de las lesiones capaces de alterar la estructura helicoidal propia del ADN, como: dímeros de pirimidina, foto productos inducidos por UV, aductos y bases nitrogenadas modificadas por su interacción con agentes oxidantes endógenos como las ERO's. A su vez, este mecanismo puede subdividirse en: Reparación Global del Genoma (GG-NER) y Reparación Acoplada a la Transcripción (TC-NER), que únicamente diferirán en el paso de reconocimiento de la lesión. Este reconocimiento es dependiente de la actividad transcripcional de la célula (Forcales S.V. et al., 2005).

3) *Reparación por mal apareamiento (MMR, del inglés, mismatch repair)*: este mecanismo reconoce y repara el mal apareamiento base-base y la inserción-delección de secuencias repetidas de ADN, que surgen, principalmente, como errores o intermediarios de la replicación o de HR. En eucariontes, este mecanismo

estará dado por la acción de la familia de proteínas MSH y MutL (Larrea A. et al., 2010).

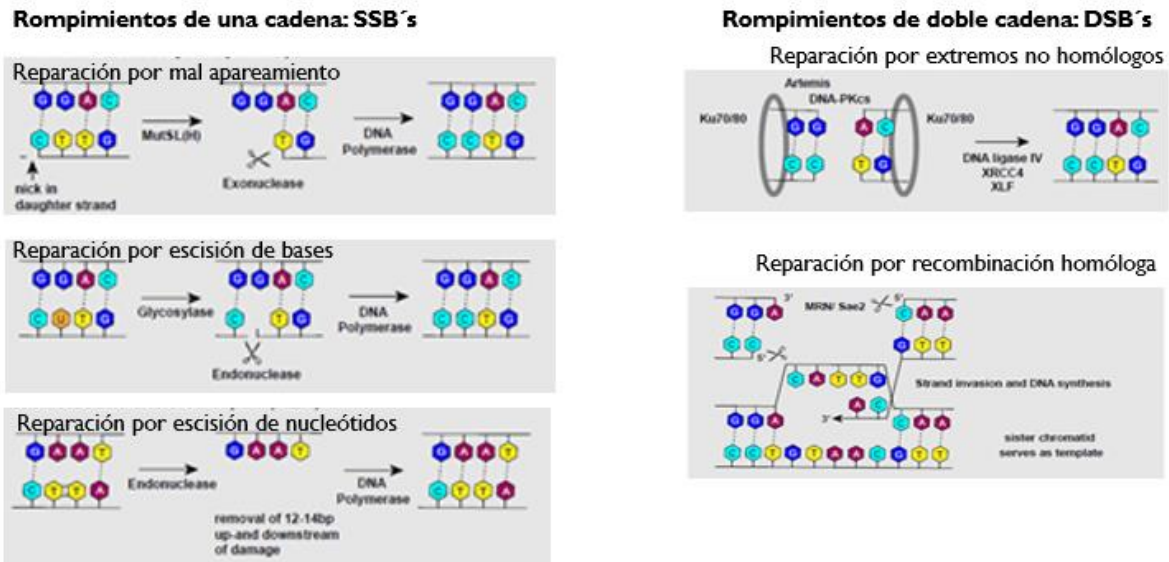


Figura 3. Mecanismos de reparación del ADN. De manera constitutiva, todas las células poseen mecanismos encargados de la reparación del ADN, dependiendo del tipo de lesión y del estadio del ciclo celular. Estos mecanismos pueden dividirse en dos grupos: los encargados de resolver rompimientos de doble cadena (HR y NHEJ) y los encargados de resolver lesiones de una sola cadena (NER, BER y MMR) (Chatterjee et al., 2017).

Como se ha descrito, los mecanismos arriba mencionados actúan en coordinación con la maquinaria del ciclo celular. Por ende, no resulta sorprendente que, en células fuera del ciclo (estado post mitótico), como los adipocitos, varios de estos mecanismos sean regulados negativamente a través de la diferenciación (Fortini P. et al 2013).

Capacidad de reparación del ADN a través de la adipogénesis

Debido a que las células terminalmente diferenciadas son células fuera del ciclo celular o post mitóticas; no es sorprendente suponer que muchos de los mecanismos antes descritos se encuentren inactivos. Para una célula post mitótica, el mantenimiento de la integridad de todo su genoma resulta algo prescindible; siempre y cuando la integridad de los genes de mantenimiento se mantenga intacta (Lyama T. et al., 2013). En la **Tabla 2**, se muestra la actividad de los diversos mecanismos de reparación del ADN, en función de su capacidad de replicación. Por ejemplo, tanto en adipocitos como células musculares terminalmente diferenciadas, se demostró que los mecanismos de BER y NER se encuentran subregulados; en comparación con células que prosiguen a través del ciclo celular (Fortini P. et al., 2007). Asimismo, para el caso específico de los adipocitos, se demostró que existe una sub-regulación de la vía HR que puede ser compensada por una mayor función de NHEJ (Meulle A. et al., 2009).

Tabla 2. Capacidad funcional de los diferentes mecanismos de reparación del ADN en células ciclantes y no ciclantes. En células no ciclantes, se observa que existe una pérdida de la funcionalidad de la mayoría de los mecanismos de reparación al ADN, cuando se comparan con células ciclantes (Modificado de Lyama T. et al., 2013).

<i>Mecanismo de Reparación</i>	<i>Capacidad de Reparación del ADN</i>	
	<i>Células ciclantes</i>	<i>Células no ciclantes</i>
<i>NER</i>	++	+
<i>BER</i>	+	+
<i>MMR</i>	++	+/-
<i>HR</i>	++	+/-
<i>NHEJ</i>	+	++

NER, reparación por escisión de nucleótidos. **BER**, reparación por escisión de bases. **MMR**, reparación por mal apareamiento de bases. **HR**, reparación por recombinación homóloga. **NHEJ**, reparación de extremos no homólogos. Capacidad de Reparación alta (++) , baja (+), muy baja o inexistente (-).

Esta sub-regulación de los mecanismos de reparación del ADN, a través de la diferenciación, presupone una pérdida de la capacidad reparativa del adipocito. En

este sentido, trabajos previos realizados en nuestro grupo de trabajo, evidenciaron que el proceso de la adipogénesis per se, representa una pérdida gradual de la capacidad de reparación de lesiones oxidativas en el ADN y SSB de células hAD- MSC (células troncales/estromales mesenquimales adultas derivadas de tejido adiposo humano), que fueron inducidas por el tratamiento con peróxido de Hidrógeno (H_2O_2) 100 μ M. De manera, que se favorece un mayor daño oxidativo (sitios Fpg) basal y su acumulación en el ADN de los adipocitos maduros (Valverde M. et al., 2018) **Figura 4.**

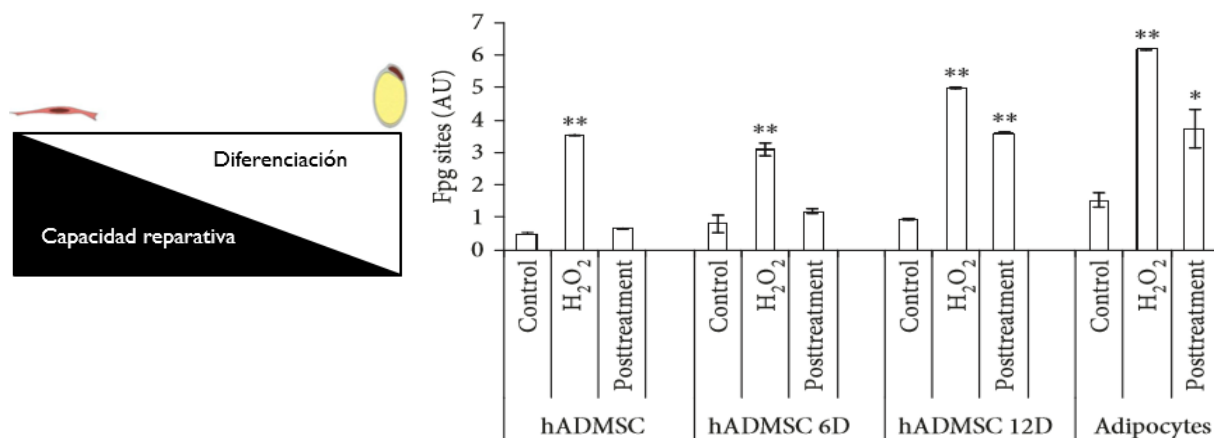


Figura 4. Pérdida de la capacidad de reparación del ADN a través de la adipogénesis. Daño inducido por el H_2O_2 a lo largo de la adipogénesis. El ADN de las células hAD-MSC, que transitan al linaje adipocitario, es más susceptible a sufrir y acumular lesiones de tipo oxidativo (DNA-Fpg sites) inducido por H_2O_2 . Asimismo, se observa que al retirar el estímulo inductor de daño (pos tratamiento), la capacidad de reparación disminuye a través de la diferenciación (Valverde M. et al., 2018).

Una célula que haya acumulado una gran cantidad de daños en el ADN, o que no pueda repararlos eficientemente, puede entrar en uno de dos estados posibles: apoptosis o senescencia (Haber, J.E. et al., 2015). Dichos procesos, serán facilitados por medio de una compleja red de vías de señalización que actúa en coordinación con los mecanismos de reparación. Esta compleja red es conocida como la Respuesta al Daño en el ADN (DDR, del inglés, DNA Damage Response) (Morandel S. et al., 2012).

Respuesta al Daño en el ADN (DDR)

La DDR es iniciada por medio de una serie de modificaciones postranscripcionales, encargadas de la propagación de la respuesta. Inicialmente, se requiere que “sensores” moleculares de daño localicen distorsiones o lesiones en el ADN. Esta función de censo estará a cargo de cinasas como: ATM (del inglés, Ataxia Telangectasia Mutated), ATR (del inglés, ATM and Rad related), y DNA-PKcs (del inglés, DNA-dependent Protein Kinase catalytic subunit). Dichas cinasas fosforilan, de manera focalizada, a múltiples sustratos cercanos al sitio de lesión. Uno de los principales sustratos es la histona H2AX (ya fosforilada se denomina γ H2AX). Esas modificaciones locales de la cromatina promueven el reclutamiento de amplificadores de la respuesta. Algunas de estas proteínas son: 53BP1 y MDC, los cuales, ayudan a amplificar estas modificaciones de la cromatina varias mega bases. Esto favorecerá la formación de estructuras macroscópicas llamadas focos de daño (*foci*) (Malaquin N. et al., 2015).

Por otro lado, se inducirá un arresto del ciclo celular mediante la activación de las cinasas efectoras Chk2 y Chk1. De esta manera, la vía ATM/Chk2 responderá, preponderantemente, a los DSB, mientras que, ATR/Chk1 lo hará para SSB o aductos. Las vías de señalización reguladas río abajo por estas proteínas, producen una variedad de respuestas celulares. Estas respuestas estarán encaminadas a la reparación o eliminación del daño, a través del arresto del ciclo celular, reparación del ADN, regulación transcripcional y post transcripcional de genes encargados de la reparación, modificación de la estructura de la cromatina, muerte celular y/o senescencia, **Figura 5** (Morandel S. et al., 2012).

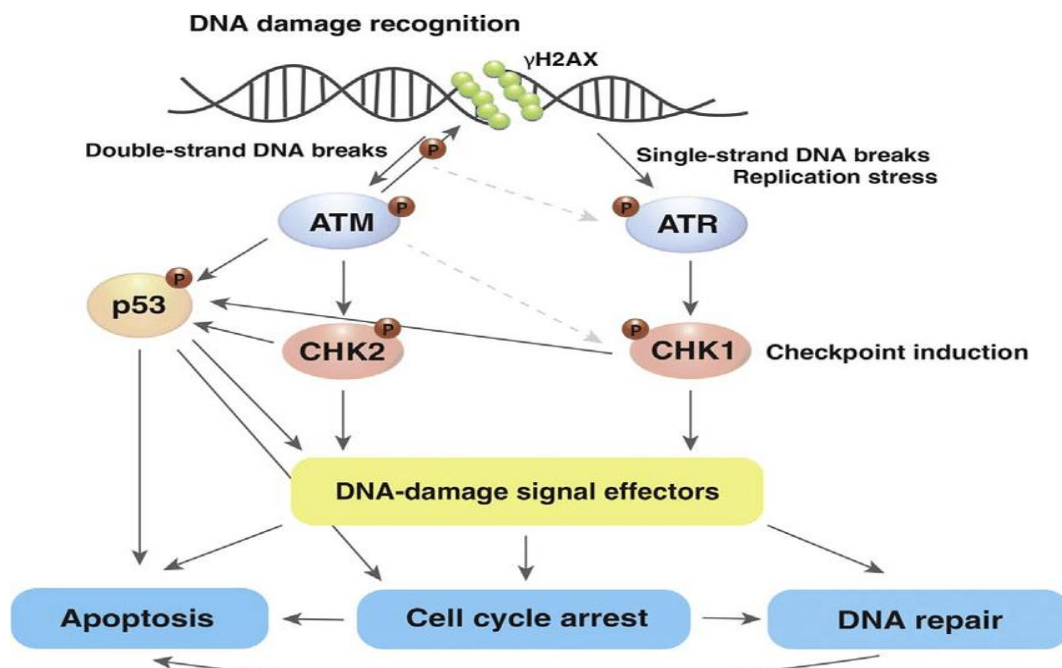


Figura 5. Respuesta al Daño en el ADN. La DDR es una red compleja de vías de señalización encargada de brindar temporalidad a los mecanismos de reparación al ADN, con el fin de reparar los insultos generados por agentes endógenos o exógenos. Dicho efecto lo hará por medio de la activación de las vías ATM/Chk2 y ATR/Chk1 que favorecerán el establecimiento de p53 para arrear el ciclo celular. Sin embargo, si el daño resulta irreparable, se activarán vías apoptóticas mediadas por p53 (Tsuiko O. et al., 2018).

El factor transcripcional nodal de la activación de las vías ATM/ATR - Chk2/Chk1 es p53. Este factor de transcripción induce la sobre expresión de inhibidores de cinasas dependientes de ciclinas (CDKs) como: p21 y p16^{INK4a}. Estos inhibidores producen un arresto del ciclo en la fase G1/S, principalmente. Así, la célula entrará a un estado metabólicamente activo de arresto permanente del ciclo celular o mejor conocido como senescencia. Sin embargo, si el daño es persistente, p53 inducirá a la célula hacia la apoptosis mediante la activación de genes como Noxa y Puma (Morandel S. et al., 2012).

Recientemente, el estudio de la cinética de fosforilación y desfosforilación de la histona H2AX ha propuesto clasificar a la DDR en dos: una respuesta transitoria o de corto tiempo y una respuesta sostenida o de largo tiempo. La respuesta transitoria está asociada a una rápida y efectiva reparación del daño; y a la pronta desfosforilación de la γH2AX a H2AX. Esta respuesta suele durar de minutos a

pocas horas. Mientras que la respuesta sostenida involucra la persistencia o exceso de los γ H2AX y otras proteínas involucradas en la DDR. Este segundo tipo está asociado a la senescencia y suele durar de varias horas hasta días, o incluso meses (Siddiqui M.S. et al., 2015). A pesar de que la DDR es activada con el fin de preservar la integridad genómica, una activación sostenida de esta tiene repercusiones importantes para el funcionamiento celular; ya que favorece procesos de senescencia y disfunción celular, **Figura 6** (Vergoni B. et al 2016; Meulle A. et al., 2008).

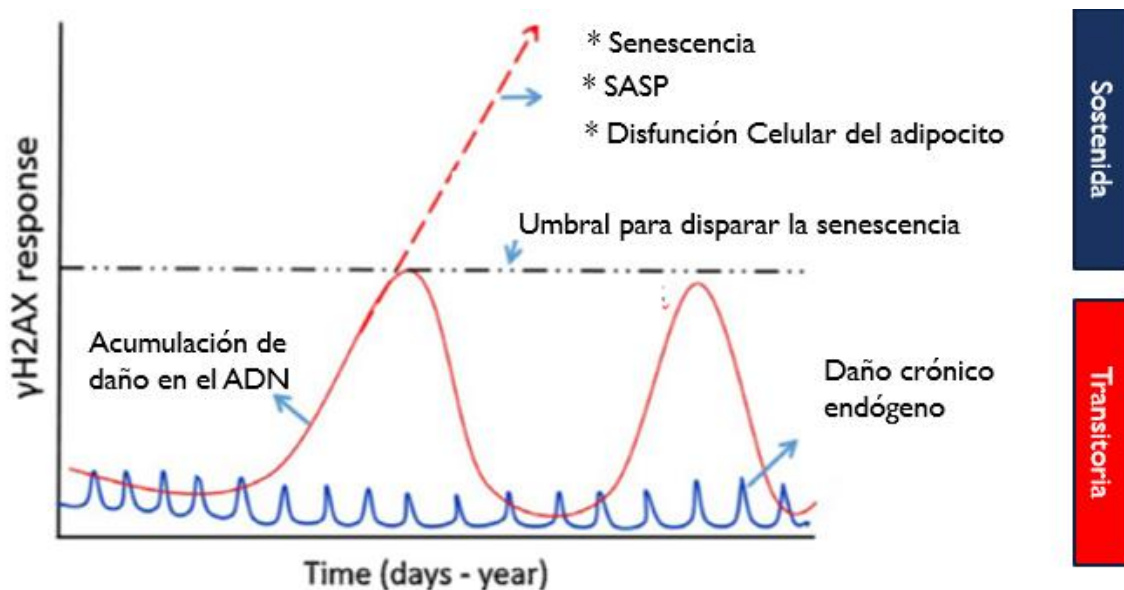


Figura 6. Modelo de la activación transitoria y sostenida de la DDR. Dependiendo de la cinética de fosforilación y desfosforilación de proteínas involucradas en la DDR (γ H2AX-H2AX); se ha propuesto clasificarla en un repuesta transitoria (minutos a pocas horas) y una respuesta sostenida (días a meses). Siendo esta última, correlacionada con disfunción celular y senescencia (modificado de Siddiqui M.S. et al., 2015).

Activación Sostenida de la DDR

La baja eficiencia de reparación de DSB o SSB, por largos periodos de tiempo (días, semanas o meses), contribuye a la persistencia de foci γ H2AX. La persistencia de la fosforilación de la histona H2AX y, por ende, la activación de la DDR ha sido implicada en diversas patologías metabólicas, como, por ejemplo: obesidad y diabetes (Meulle A. et al., 2008); caracterizadas por una disfunción del adipocito. Sin conocer a detalle los mecanismos moleculares involucrados.

Un buen ejemplo a este respecto es el trabajo realizado por Bastien V. et al., en 2016; en el cual se demostró que en adipocitos, de ratones C57BL6/J inducidos a la obesidad por una dieta rica en grasas (HFD), existía una pérdida de la funcionalidad metabólica. Además, argumentan que este hecho era precedido por una activación temprana de la DDR y se corroboró por métodos de inmunofluorescencia (γ H2AX) y Western Blot (p53). Se observó que, a partir de 2 semanas de persistencia de focos γ H2AX, existe un incremento significativo en la activación de estas proteínas en los animales obesos; comparado con ratones no obesos (NCD). Asimismo, se observó que esta activación se incrementaba hasta por 4 semanas. Además, se evidenció que un bajo grado de inflamación y estrés oxidante están involucrados en la inducción de alteraciones de la función del adipocito. De esta manera, queda claro que existe una correlación entre la activación sostenida de la DDR y la disfunción del adipocito (Vergoni B. et al 2016).

Queda claro que la activación sostenida de la DDR, como cascada de señalización intracelular, se correlaciona con una pérdida de la funcionalidad del adipocito. Sin embargo, en organismos superiores compuestos por tejidos multicelulares, la DDR se vale de los mecanismos de comunicación intercelular para disparar una “señal de alarma” extracelular. Esta señal de alarma es capaz de impactar y modular varios procesos de células vecinas, como la activación temprana de la DDR y la diferenciación celular (Malaquin N et al., 2015). Conceptualmente, es posible que células dañadas, cuya DDR está activa, señalicen a células vecinas del compromiso en su material genético. De esta manera, se genera una respuesta al estrés en todo el tejido. Esto permitirá a las células vecinas estar preparadas para contrarrestar el

estímulo estresor (Malaquin N et al., 2015). La DDR funciona por medio de moléculas señalizadoras solubles; que en conjunto reciben el nombre de Fenotipo Secretorio Asociado a la Senescencia (SASP, del inglés, Senescence-Associated Secretory Phenotype) (Bavik, C et al., 2006). El SASP estará conformado por citocinas proinflamatorias (i.e., IL-6, IL-8, GRO α , GRO β , MCP-1, TNF α), factores de crecimiento (i.e., GM-CS, G-CSF, HGF/S, IGF), metaloproteinasas (i.e., MMP-1,-2, y -3) y proteínas de la matriz extracelular no solubles (i.e., colágeno, fibronectina y laminina). Aunque su composición exacta varía considerablemente dependiendo del tipo celular que lo secrete, **Figura 7** (Bavik, C et al., 2006).

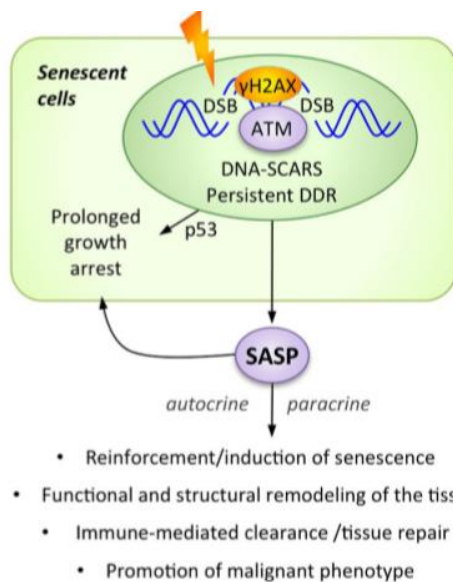


Figura 7. Señal de salida de una célula dañada en respuesta a una activación persistente de la DDR. La activación de compuestos moleculares de la DDR lleva a la expresión y secreción del SASP. El SASP es capaz de impactar en diferentes procesos de células vecinas (Malaquin N. et al.2015).

Actualmente, se propone que el daño continuo al ADN y la activación de diferentes vías de respuesta, están involucradas con la disfunción del adipocito (Hotamisligil GS et al., 2006; Furukawa S et al., 2004) Asimismo, es bien sabido que un incorrecto funcionamiento del adipocito es un evento clave para la aparición y mantenimiento de diversas patologías relacionadas con el metabolismo, enfermedades cardiacas, cáncer y el envejecimiento (Klötting N et al., 2014).

Disfunción adipocitaria

El evento clave, involucrado en la disfunción del adipocito, es el incremento excesivo del volumen celular. Este proceso es mejor conocido como hipertrofia adipocitaria. La hipertrofia del adipocito es descrita como la presencia de una gran cantidad de lípidos citoplasmático (>800pL), que se correlaciona con una insensibilidad a la insulina y el deterioro en el metabolismo de lípidos y glucosa. Esta hipertrofia es producto de diferentes estímulos, como un desequilibrio energético, estímulos inflamatorios y/o estímulos oxidantes (Cowen S. et al., 2015; Khalid S. et al., 2010). No obstante, algunos autores proponen que la hipertrofia es favorecida por una baja capacidad de adipogénesis de *novo* (Arner E. et al., 2010). Además, los adipocitos hipertróficos sufren una desregulación en la síntesis y secreción de varias adipocinas, por ejemplo, IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α , resistina, leptina, adipocina y MCP-1 (Cowen S. et al., 2015; Klötting N. et al., 2014).

El exceso de almacenamiento de lípidos causa alteraciones funcionales del retículo endoplásmico (RE) y la mitocondria, que son fundamentales para el establecimiento y mantenimiento de enfermedades metabólicas (Ferranti S. et al., 2009).

El RE es responsable de la síntesis y plegamiento de proteínas, la formación de gotas de lípidos y la detección y regulación de colesterol. En adipocitos disfuncionales, se ha descrito una situación de “estrés” del RE. Dicho término se refiere a una condición celular presente cuando la función del organelo es perturbada, de manera que el correcto plegamiento y modificación de proteínas, creación de gotas de lípidos y/o detección de colesterol, está inhibido.

Además de los efectos en el RE, la disfunción del adipocito se ha asociado con el estrés oxidativo a nivel de la mitocondria, **Figura 8** (Ferranti S. et al., 2009). En estas circunstancias, el procesamiento del exceso de ácidos grasos por la mitocondria produce desacoplamiento mitocondrial y liberación de ERO's, aunque el mecanismo exacto de este proceso aún permanece en debate (Fridlyand L.E. et al., 2006). Esta producción exacerbada de ERO's favorece la disfunción mitocondrial, caracterizada por una despolarización del potencial de membrana mitocondrial

(Fridlyand L.E. et al., 2006). Además, el estrés oxidante puede inducir daño oxidativo al ADN y favorecer la inestabilidad genética (Xu B. et al., 2014).

Asimismo, la disfunción del adipocito se caracteriza por un aumento en la liberación de ácidos grasos no esterificados y glicerol a la circulación. Estos son productos del constante catabolismo de los triacilgliceroles; que servirán como fuente de energía alterna para el desarrollo de patologías como el cáncer, **Figura 8** (Campbell P.J. et al., 1994).

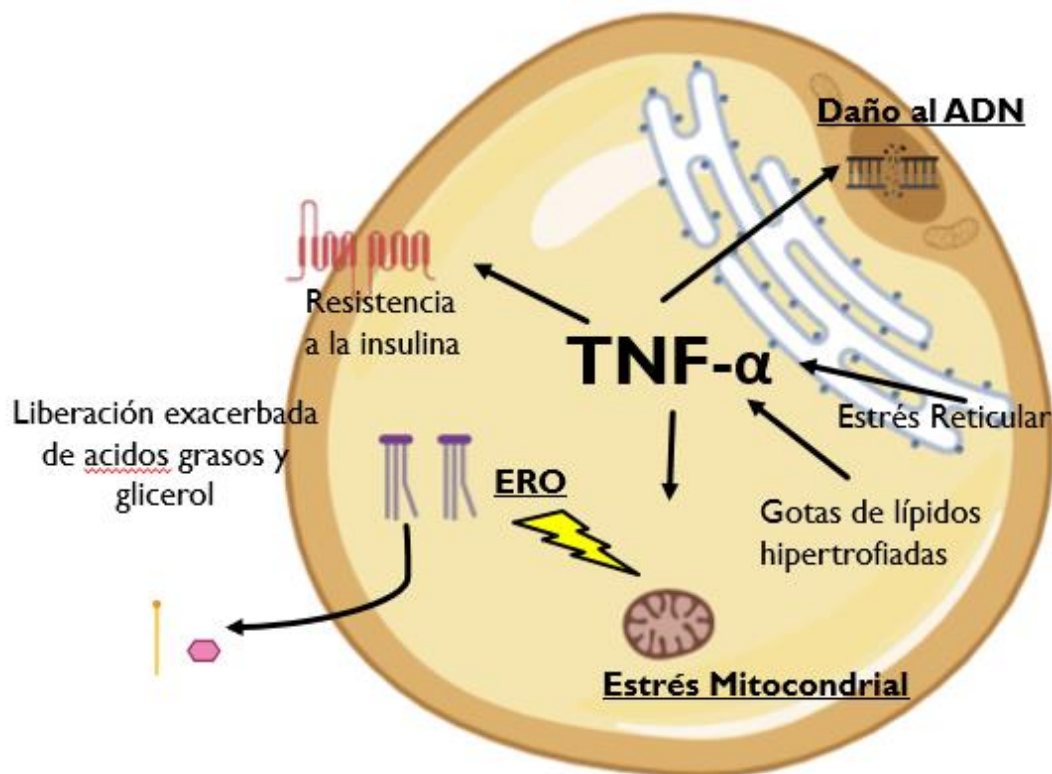


Figura 8. Disfunción del adipocito debido al exceso de nutrientes. La acumulación de lípidos lleva a un aumento en la actividad del RE, que altera su capacidad para plegar apropiadamente las proteínas nacientes. La UPR (del inglés Unfolded Protein Response) puede compensar esta situación en cierta medida, sin embargo, si el proceso avanza provoca apoptosis. El estrés de RE puede producir estrés oxidante en la mitocondria, así como exceso de ácidos grasos libres (AGL). El estrés oxidante se produce por especies reactivas de oxígeno (ERO). La producción de TNF- α es estimulada por AGL, que a su vez actúan sobre JNK (del inglés c-Jun-N-terminal Kinase) para contribuir a la resistencia a insulina celular. (Modificado de Ferranti S. et al., 2009).

Un bajo grado de inflamación y estrés oxidante están estrechamente relacionados con alteraciones en la función del adipocito (Hotamisligil GS et al., 2006; Furukawa S et al., 2004). Dichos procesos han sido propuestos como los principales instigadores de la desregulación del metabolismo de lípidos, metabolismo de glucosa y resistencia a la insulina, en el adipocito (Turner P. et al 2015,). Sin embargo, los mecanismos no han sido del todo elucidados.

En este sentido, varios trabajos han evidenciado el papel multifuncional que desempeña el Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF- α) en la aparición y mantenimiento de diversas patologías metabólicas y no metabólicas. Ya que ha sido reportado como un potente inductor de inflamación, estrés oxidante y, de manera más reciente, de disfunción del adipocito.

Factor de Necrosis Tumoral – α (TNF- α)

El TNF- α es una citocina clave en los procesos de inflamación, inmunidad, y homeostasis celular. Es requerido para la proliferación y activación de células NK (del inglés, Natural Killer), linfocitos T y B, macrófagos y células dendríticas (Balkwill et al.,2009). Es sintetizado como una proteína transmembrana con un peso molecular de 26 kDa, sin embargo; posteriormente se escinde por la proteína convertidora del TNF- α (TACE, del inglés, TNF- α Converting Enzyme) transformándola en su forma soluble de 17kDa (Gooz M et al., 2010). A pesar de que los macrófagos activados son la mayor fuente de TNF- α , esta proteína también puede ser producida por otros tipos celulares, entre ellos: fibroblastos, astrocitos, células de musculo liso (Wu Y. et al., 2010) y adipocitos (Castanon N. et al., 2014). EL TNF- α regula un gran número de procesos biológicos como repuesta inflamatoria, diferenciación celular, proliferación, apoptosis y metabolismo energético (Tamai M. et al., 2010).

El efecto biológico ejercido por el TNF- α será a través de dos receptores triméricos de membrana, el TNFR1 y TNFR2, **Figura 9** (Fragoso M. et al., 2014;

Parameswaran N. et al., 2010). El TNFR2 es únicamente expresado en células endoteliales y del sistema inmunológico, donde promueve angiogénesis y reparación tisular (Wu Y. et al., 2010). Sin embargo, el TNFR1 es expresado de manera universal en todos los tipos celulares y está más relacionado con el proceso de apoptosis, debido a que posee un dominio de muerte, **Figura 9** (Aggarwal B.B. et al., 2012).

La unión del TNFR1 a su ligando, activa la vía de señalización encargada del reclutamiento de proteínas con dominio de muerte, asociadas a TNFR1 (TRADD, del inglés, TNF-R1-associated Death Domain Protein). A su vez, TRADD favorece el reclutamiento de TRAF (del inglés, TNF Receptor Associated factor) y FADD (del inglés, Fas-Associated Domain Death protein), las cuales, finalmente activaran la vía de apoptosis mediada por caspasas (Aggarwal B.B. et al., 2012).

La vía de TNFR1 también puede inducir la activación y translocación nuclear del factor de transcripción NF- κ B, el cual se encuentra secuestrado en el citoplasma por la proteína I κ B. Sin embargo, una vez que NF- κ B es liberado de I κ B, a través de la fosforilación mediada por varias cinasas, se transloca al núcleo celular y favorece la expresión de proteínas relacionadas con la respuesta inmune, la inflamación y la supervivencia celular, **Figura 9** (Wu Y. et al., 2010).

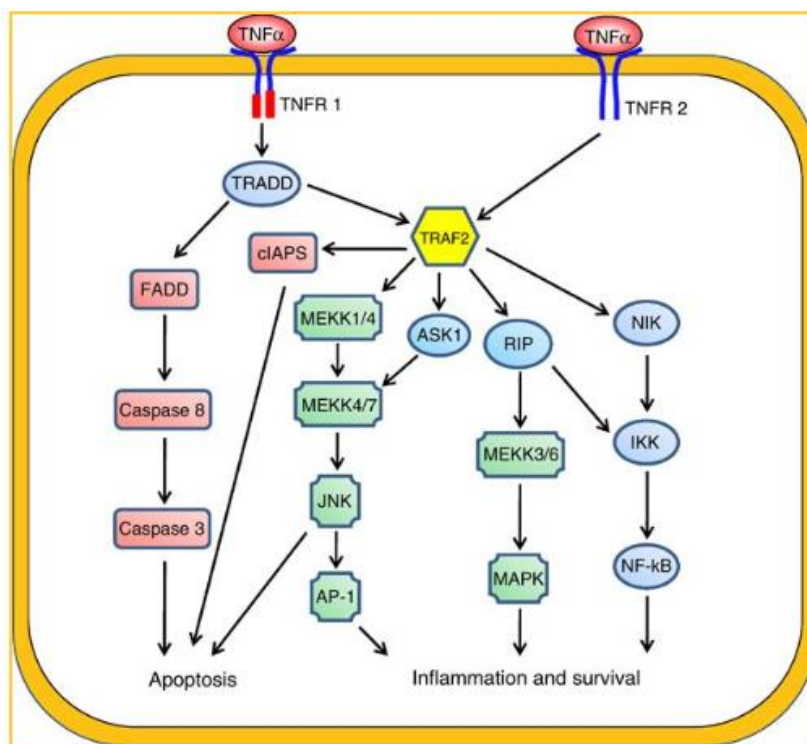


Figura 9. Vía de señalización del TNF- α . La activación del TNFR1 o TNFR2, por parte del TNF- α , puede inducir la apoptosis, maduración de la respuesta inmune o supervivencia celular. La apoptosis se induce por medio de la vía de las caspasas, mientras que la inflamación y supervivencia celular, lo hace por medio de la vía NF- κ B y la cascada de la MEKK cinasa (Wu Y. et al., 2010).

Además de su papel indiscutible en procesos inflamatorios, el TNF- α ha sido relacionado con diversas patologías, debido a su capacidad de generar ERO's vía NADPH oxidasa, particularmente la isoforma NOX4 (Nanami O. et al., 2005). Asimismo, ha sido reportado como un potente inductor de DSB en el ADN (Cotillard A et al., 2014). Además de que diversos trabajos lo han relacionado con la disfunción adipocitaria (Brey C. et al., 2009; Tubbs A. et al., 2017). En este sentido, se demostró tanto en un modelo 2D como 3D, de adipocitos maduros provenientes de la línea celular de ratón 3T3-L1, que el tratamiento con TNF- α (125ng/ml) por 24

horas, inducía disfunción del adipocito, **Figura 10a**, involucrando la secreción de ácidos grasos libres y glicerol, **Figura 10b-c** (Turner P. et al., 2018).

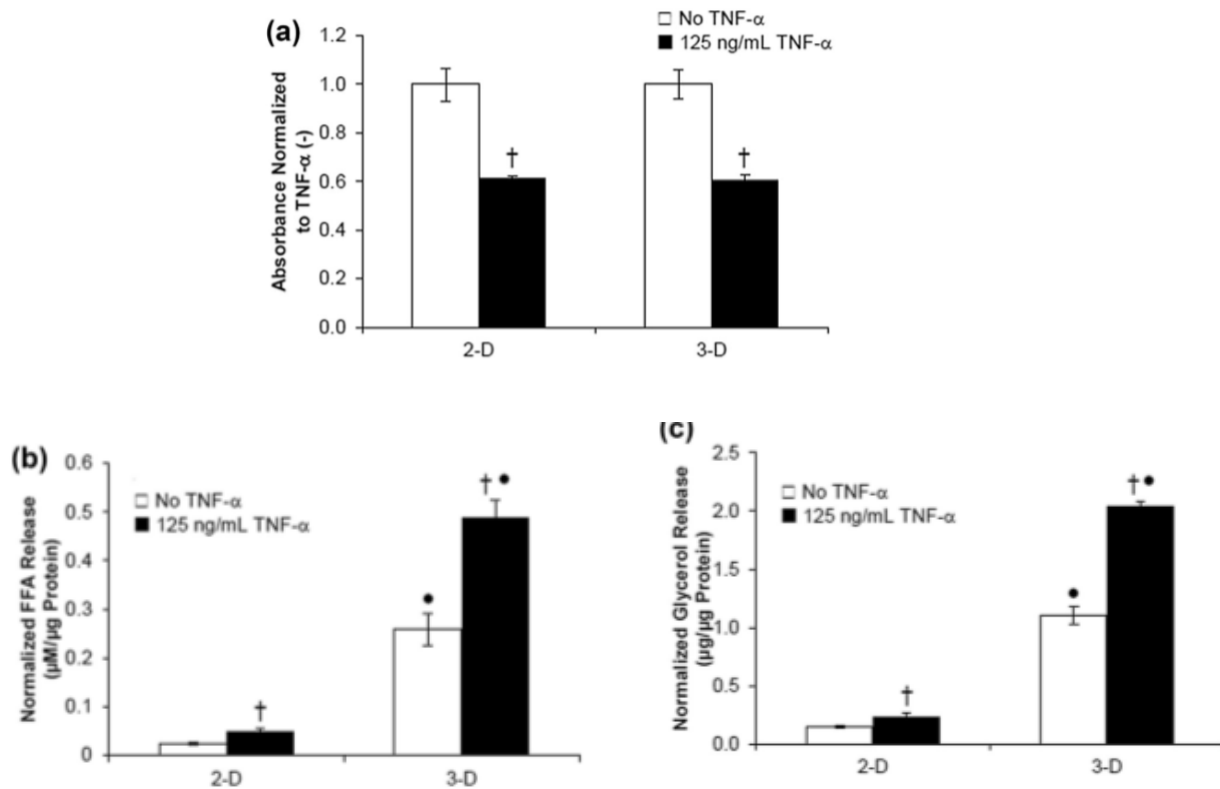


Figura 10. TNF- α induce disfunción metabólica en adipocitos maduros de la línea celular 3T3-L1. a) disfunción metabólica de los adipocitos en un 40% (MTT). b) ácidos grasos libres y c) glicerol. Los ensayos fueron realizados tanto en un modelo 2D como 3D, observando comportamientos similares (Turner P. et al., 2018).

A pesar de que todos estos resultados representan una prueba contundente del efecto negativo de altos niveles de TNF- α sobre la funcionalidad del adipocito, los mecanismos moleculares involucrados aún no están del todo resueltos. Sin embargo, es posible suponer que existe una estrecha relación entre el estímulo inflamatorio y el estrés oxidativo, que favorecen la disfunción del adipocito.

PLANTEAMIENTO DE INVESTIGACION

El presente trabajo tiene como propósito establecer evidencia de la disfunción del adipocito humano recién diferenciado, a partir de células mesenquimales derivadas de tejido adiposo (por sus siglas en inglés, hAD-MSC), las cuales acumulan daño oxidativo en el ADN y SSB y una reducida capacidad reparativa, al exponerse a niveles de TNF- α similares a los que presentan adipocitos bajo estímulos obesogénicos (125 ng/ml, 24 h). El objeto del presente planteamiento es evidenciar si la activación sostenida de la Respuesta al Daño en el ADN (DDR) es inducida por el estímulo del TNF- α promoviendo la adquisición de Fenotipo Secretor Asociado a Senescencia (SASP), describiendo nueva evidencia de la disfunción del adipocito sano.

HIPOTESIS

“El TNF- α induce la disfunción del adipocito por medio de la activación sostenida de la respuesta al daño en el ADN”

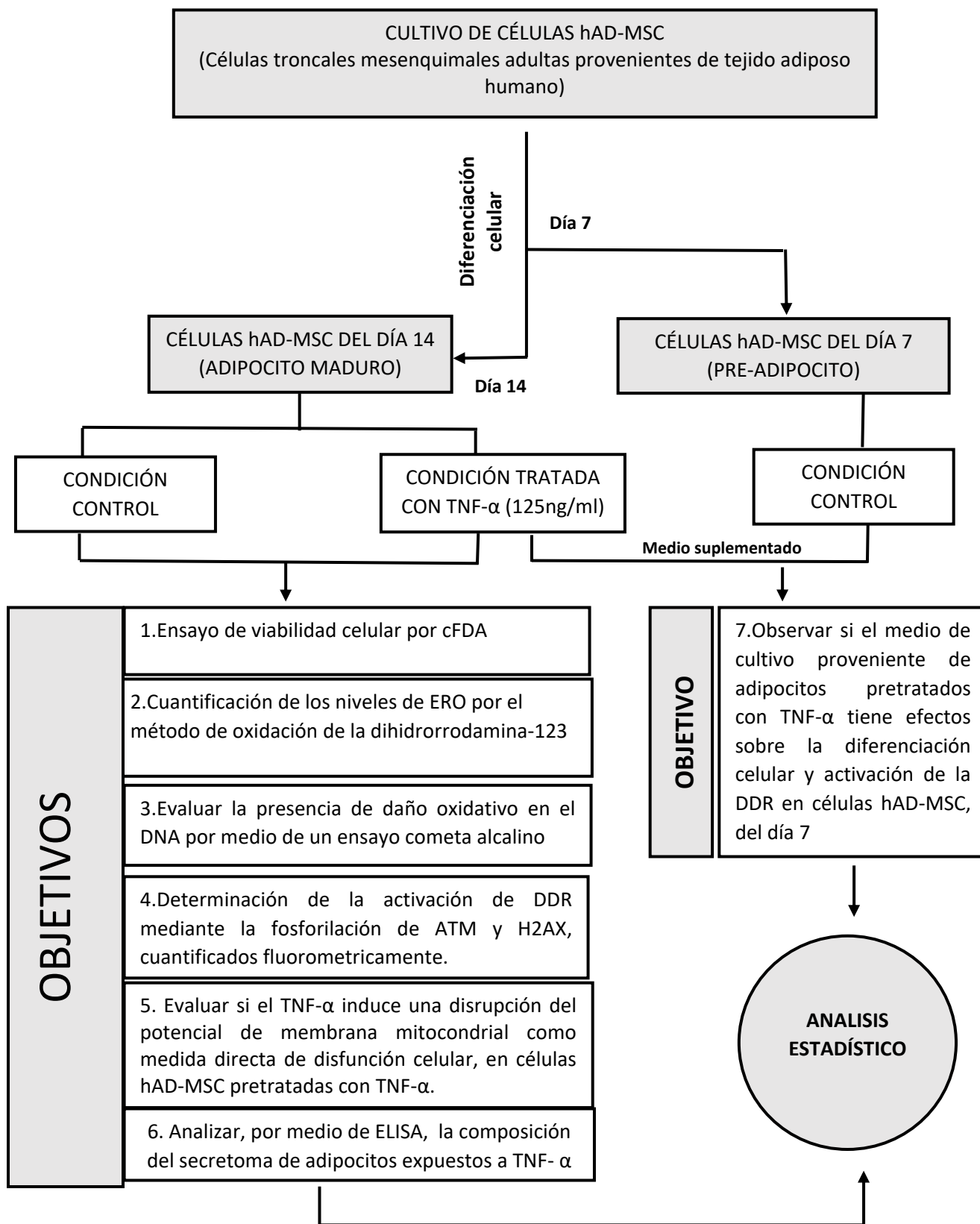
OBJETIVO GENERAL

Determinar si el TNF- α induce lesiones en el ADN que conlleven a una activación sostenida de la DDR, favoreciendo la disfunción del adipocito.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar el efecto que tiene el TNF- α en la viabilidad de adipocitos provenientes de la línea celular hAD-MSC.
2. Establecer si el TNF- α , genera ERO's en adipocitos provenientes de la línea celular hAD-MSC.
3. Evaluar la presencia de daño en el ADN de adipocitos previamente expuestos al TNF- α .
4. Determinar si el TNF- α induce la activación de la DDR a través de la fosforilación de ATM y H2AX, en adipocitos.
5. Evaluar si el TNF- α induce la disrupción del potencial de membrana mitocondrial como medida directa de disfunción celular, en adipocitos.
6. Cuantificar niveles de adipocinas presentes en el medio de cultivo de adipocitos control y tratados con TNF- α .
7. Observar si el secretoma (medio de cultivo), proveniente de adipocitos control y tratados con TNF- α , tiene efectos sobre la diferenciación de células hAMSC.

ESQUEMA DE TRABAJO



METODOLOGIA

Cultivo celular

Para el presente trabajo, se emplearon células troncales mesenquimales derivadas de tejido adiposo humano (hAMSC) normales (ATCC® Cat. No. PCS500011™). Las células (en fase 4) fueron sembradas en cajas de cultivo (p100) de poliestireno, donde se empleó medio de cultivo “MesenPRO RS™ Medium GIBCO” (Cat. No. 12746-012) preparado de acuerdo con las especificaciones del proveedor. Se mantuvieron en incubación a 37 °C con 95% de humedad y 5% de CO₂. Cada 48 horas hubo cambio de medio de cultivo hasta que alcanzaron una confluencia del 80-85%. Posteriormente, las células fueron cosechadas como a continuación se describe: **1)** se retiró el medio de cultivo y se realizó 2 lavados consecutivos con solución de fosfatos estéril (PBS al 1X), **2)** se añadió 1.5 - 2 ml de tripsina-EDTA 0.05% (Gibco, Cat. No. 25300-054) y se dejó incubar por 3 minutos, **3)** se adicionó un volumen igual de medio de cultivo fresco, con el fin de inactivar a la tripsina. **4)** La suspensión celular fue re suspendida y transferida a un tubo cónico de 15 ml para ser centrifugada a 1,200 rpm durante 5 minutos, **5)** finalmente, el sobrenadante fue desechado y la pastilla fue re suspendida en medio de cultivo fresco. A partir de esta suspensión celular, se tomaron alícuotas para resembrar en cajas p35 para ensayos posteriores.

Diferenciación celular

Una vez que las células sembradas en cajas p35 alcanzaron una confluencia del 85%, se procedió a dar el estímulo de diferenciación hacia adipocitos de la siguiente manera: el medio MesenPRO fue desechado. Posteriormente, se realizó un lavado con PBS 1X estéril y se suministró medio fresco de diferenciación “StemPro® Adipogenesis Differentiation Kit, Gibco” (Cat. No. A10070-01). Se mantuvieron en incubación a 37 °C con 95% de humedad y 5% de CO₂. Cada 72 horas hubo un

cambio de medio fresco (StemPro®) hasta que llegaron al día de diferenciación deseado (día 14). Posteriormente, las células fueron cosechadas con un protocolo similar al descrito anteriormente para células hAMSC; con una variación en la concentración de la tripsina utilizada (se utiliza Tripsina-EDTA 0.25% (Gibco, Cat. No. 25200-056)).

Ensayo de Tinción con Rojo Oleoso

Una vez alcanzado el día de diferenciación deseado, cajas de cultivo del día 7 y 14 (confluencia del 85%) se sometieron a la tinción con Oil Red O para evidenciar el grado de generación de vesículas lipídicas, que refleja el grado de diferenciación adipocitaria.

La tinción con rojo de oleoso consiste en teñir las vacuolas lipídicas, presentes en el citoplasma de estas células, para posteriormente, cuantificar el colorante extraído, mediante espectrofotometría. 1) Inicialmente, el medio de cultivo fue desechado, se lavó dos veces consecutivas con PBS (1X); 2) las células fueron fijadas con paraformaldehído al 10% a temperatura ambiente por 30 minutos; 3) el paraformaldehído fue descartado y se hicieron dos lavados consecutivos con PBS; 4) se adiciono a la caja p35 500µL de solución de trabajo de Rojo Oleoso (Oil Red O, Trevigen 5010-024-05), previamente preparado de acuerdo al proveedor; 5) después, se incubó durante 30 minutos en agitación y protegido de la luz por 30 minutos; 6) enseguida se lavó con PBS (1X) dos veces, 7) se adiciono 750 µL de isopropanol; 8) se dejó incubar por 10 minutos en agitación y en oscuridad; 9) finalmente, transcurrido el tiempo, se transfirió el sobrenadante de la caja a una celda de cuarzo (Quartz Spectrophotometer Cell Semi Micro, 9-Q-10 mm, Bio-Rad Labs) para medir su absorbancia con ayuda de un espectrofotómetro (Ultrospec 3000, Pharmacia Biotech, Model: 80-2106-20) a 500 nm.

Tratamiento con TNF- α , como estímulo proinflamatorio

Una vez que se llegó al día 14 de diferenciación, las células fueron lavadas con PBS 1x, para eliminar remanentes celulares. Las células fueron expuestas a TNF- α a una concentración de 125ng/ml (reportada por Turner et al., como estímulo generador de disfunción de adipocitos) por 24 horas. La condición control únicamente tuvo cambio de medio. Transcurrido el tiempo de tratamiento, las células fueron sometidas a diferentes ensayos a continuación descritos.

Viabilidad Celular

La viabilidad celular fue evaluada por el método de cFDA-BrET (Diacetato de fluoresceína – Bromuro de etidio). Se realizó una mezcla de 15 μ l de suspensión celular con 15 μ l de solución de (20 μ L de BrEt (0.02 μ g/ml) + 3 μ L de cFDA (0.015 μ g/ml), preparada al momento de la evaluación. De esta mezcla, se colocan 10 μ l en un portaobjetos (Pearl Microscope Slides). Se cubrió la muestra con un cubreobjetos (Pearl cover glass, 0.13-0.17 mm espesor) y posteriormente, se procedió a observar la preparación en un microscopio de fluorescencia (Olympus BX60), utilizando un filtro de doble emisión a una magnificación 20x. Una célula metabólicamente activa metabolizara el 5,6 carboxifluoresceina diacetato (por medio de esterasas), emitiendo fluorescencia en el citoplasma de color verde. Sin embargo, el Br-ET alcanzara el núcleo de las células con la membrana nuclear dañada, emitiendo fluorescencia en rojo. Con este fundamento, se realizó un conteo del número de células metabólicamente activas (verdes) y células muertas (rojas) de varios campos y expresando el resultado como porcentaje.

Daño al ADN (Ensayo cometa alcalino pH >13)

Los SSB en el ADN fueron detectados y analizados por medio del ensayo cometa o electroforesis celular en condiciones de alcalinidad (pH >13). El protocolo que se utilizó fue el desarrollado por Valverde y Rojas en 2009, el cual consiste en:

- *Preparación de laminillas*

- 1)** Inicialmente, las células cosechadas, fueron centrifugadas a 1200 rpm por 5 minutos y el sobrenadante fue desechado; **2)** al botón celular se le adicionó un volumen de 75 µl de agarosa de bajo punto de fusión (LMP) 0.5% por laminilla y se re suspendió cuidadosamente; **3)** Esta suspensión celular fue extendida sobre laminillas previamente revestidas con 150 µl de agarosa regular al 0.5%, ya deshidratada por calor; **4)** posteriormente, se colocó un cubreobjetos (Cover Glass, Cat. No. 2935) y se dejó solidificar a una temperatura de 4°C, por 5 minutos; **5)** una vez que solidificó la segunda capa de agarosa se retiró el cubreobjetos gentilmente, hacia uno de los lados; **6)** se adicionaron otros 75 µl de LMP 0.5% sobre las 2 capas de agarosa anteriores y se colocó nuevamente el cubreobjetos; **7)** se dejó solidificar a una temperatura de 4°C, por 5 minutos; y **8)** finalmente, el cubreobjetos fue retirado y las laminillas fueron sumergidas en una solución de lisis, previamente preparada y mantenida a 4°C.

- *Electroforesis*

Este procedimiento se realiza en obscuridad o bajo luz amarilla. Se requiere de una cámara de electroforesis horizontal montada y nivelada sobre una cama de hielo (para evitar el sobrecalentamiento). **1)** Inicialmente, las laminillas inmersas en el buffer de lisis fueron posicionadas a lo largo de la cámara de electroforesis, manteniendo la misma dirección; **2)** una vez colocadas todas las laminillas se vertió el buffer de corrida (pH >13), dentro de la cámara de electroforesis, hasta cubrir las laminillas completamente, incubando por un periodo de 20 minutos para permitir el desenrollamiento del ADN. **3)** Posteriormente, se inició el corrimiento de la electroforesis a un voltaje aproximado de 22 a 25 volts, ajustando el amperaje con el volumen del medio a 300 mA, y con una duración de 20 minutos; **4)** una vez transcurrido el tiempo de electroforesis, las laminillas fueron transferidas a una charola para ser neutralizadas con 2 lavados de solución Tris pH 7.5; **5)**

posteriormente, las laminillas son deshidratadas con dos incubaciones en alcohol al 96% por 5 minutos; **6)** las laminillas fueron escurridas y almacenadas hasta su análisis.

- *Evaluación de laminillas*

Para su evaluación: **1)** las laminillas se tiñen adicionando 20 μ l de bromuro de etidio (2 μ g/ml) y se les colocó un cubreobjetos; **2)** se colocan bajo el microscopio de epifluorescencia (Olympus BX60) usando una magnificación 20x, acoplado a un digitalizador de imágenes y a través del software KOMET 5.0 (Kinetic imaging) se evalúan 100 nucleoides por condición experimental (50 por replica experimental) y se obtienen los diversos parámetros de daño en el ADN.

Especies Reactivas de Oxígeno (ERO)

El principio de esta técnica se basa en la lectura de la fluorescencia emitida por la oxidación de la dihidrorrodamina-123 (Calbiochen, Cat. 309825) a rodhamina, dependiendo de la concentración intracelular de ERO. El protocolo es el siguiente: **1)** de las células previamente cosechadas, se tomó un volumen de suspensión celular conteniendo 150,000 células, **2)** este fue centrifugado a 1,200 rpm durante 5 minutos, **3)** el sobrenadante fue desechado y al botón celular se le adicionó 180 μ l de solución A (140mM NaCl, 5mM KCl, 0.8mM MgSO₄, 1.8mM CaCl₂, 5mM Glucosa y 15mM HEPES) + 20 μ l de solución stock de dihidrorrodamina-123 (1 μ M), **4)** la mezcla fue cuidadosamente resuspendida y transferida a una placa de 96 pozos para fluorescencia, donde se dejó incubar a 37°C por 2 minutos. **5)** La placa fue leída usando un fluorómetro Thermo Scientific Multiskan GO (Cat. no. 51119200) con filtro de excitación de 505 nm.

Activación de la DDR.

Con el fin de evaluar la activación de la DDR se realizó el ensayo de citometría de flujo que se basó en la detección por fluorescencia de anticuerpos marcados contra proteínas involucradas en la vía de señalización de la DDR; la histona H2AX (Anti-phospho-Histone H2AX, EMD Milipore Corp) y ATM (Anti-phospho-ATM, EMD Milipore Corp).

Las células ya cosechadas fueron centrifugadas a 1200 rpm, por 5 minutos. **1)** el sobrenadante fue descartado y al botón celular se le añadió un volumen de 100 µL de una mezcla 1:1 de buffer de ensayo (1X) y solución de fijado; **2)** la suspensión celular fue cuidadosamente re suspendida y se dejó reposar por 10 minutos, en hielo; **3)** transcurrido el tiempo, las células fueron centrifugadas a 1200 rpm, por 5 minutos. Y el sobrenadante fue desechado; **4)** se adicionó un volumen de 100 µL de buffer de permeabilizado y se dejó reposar, en hielo, por 10 min; **5)** transcurrido el tiempo, las células fueron centrifugadas a 1200 rpm, por 5 minutos y el sobrenadante fue desechado; **6)** al botón celular se le agrego 90 µL de buffer de ensayo (1X) y 10 µL de una solución 1:1 de anticuerpos (de ATM y H2AX); **7)** se dejó reposar por 30 minutos a temperatura ambiente, en oscuridad; **8)** transcurrido el tiempo, se agregó 100 µL de buffer de ensayo a las células y fueron centrifugadas a 1200 rpm, por 5 minutos, y el sobrenadante fue desechado; y **9)** finalmente, el botón celular fue re suspendido en 200 µL de buffer de ensayo para, posteriormente, ser cuantificado mediante el citómetro Muse® cell analyzer.

Detección de Potencial de Membrana Mitocondrial.

En cualquier tipo celular, la mitocondria juega un papel vital en el correcto funcionamiento del metabolismo celular. Ante un estrés constante, como altos niveles de ERO's, la membrana mitocondrial se vuelve permeable y el gradiente electroquímico de la membrana mitocondrial colapsa. De esta manera, la célula es incapaz de llevar a cabo su metabolismo a niveles óptimos y, en el peor de los casos, es inducida a la apoptosis por medio de la liberación del citocromo c y la activación de las caspasas. Para determinar si existe una disfunción mitocondrial que permita suponer un mal funcionamiento del adipocito, se analizó la disrupción del potencial de membrana mitocondrial. Este ensayo se realizó con ayuda del Mitochondrial Membrane Potential Detection Kit (Catalog #280002) conforme a las indicaciones del proveedor (Copyright © 2004, Stratagene).

1) Inicialmente, se prepara la solución de trabajo Muse™ MitoPotential working solution en una solución de 1: 1000 con Buffer de ensayo 1X. 2) Posteriormente, las células son cosechadas y lavadas con PBS 1X. 3) El botón celular es incubado con 95 µl de solución de trabajo Muse Mitopotential por 20 minutos, a 37 °C. 4) Después, son incubadas con 5 µl de 7 AAD por 5 minutos, a temperatura ambiente. 5) Finalmente, la fluorescencia es leída con ayuda de Muse™ Cell Analyzer.

ELISA

El tiempo de vida media del TNF- α , tanto in vivo como in vitro, es relativamente muy corto (aproximadamente 50 minutos). Sin embargo, se sabe que la presencia de TNF- α puede permanecer por largos periodos a través de su autorregulación. Con el fin de evaluar de manera cuantitativa la concentración de TNF- α presente en el medio de cultivo se realizó un ELISA. Este ensayo se realizó de acuerdo a las indicaciones del proveedor (Quantikine®QuicKit™ ELISA. RD Systems # KQ210) . Este medio fue recolectado de adipocitos maduros pretratados con 125 ng/ml de TNF- α , por 24 horas y adipocitos no tratados.

a) Preparación de Placas

- 1) Se agregó 50 µl de la muestra por pocillo.
- 2) Se agregó 50 µL del cóctel de anticuerpos a cada pocillo y se cubrió de la luz.
- 3) Se incubo durante 1 hora a temperatura ambiente en un agitador de microplacas
- 4) Transcurrido el tiempo, se aspiró cada pocillo y se realizaron tres lavados
- 5) Posteriormente, se adicionaron 100 µL de solución de sustrato a cada pocillo.
- 6) Se incubo durante 20 minutos a temperatura ambiente y protegido de la luz.
- 7) Finalmente, se adiciono 50 µL de solución de bloqueo a cada pocillo.
- 8) Transcurridos 30 minutos se procedió a leer la placa por medio de Thermo Scientific Multiskan GO (Cat. no. 51119200).

b) Lectura de placa

Se determinó la densidad óptica de cada pocillo usando un lector de microplacas ajustado a 450 nm. Además, se realizó una corrección de longitud de onda, restando las lecturas a 540 nm de las lecturas a 450 nm, tal y como lo indica el proveedor.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los ensayos, anteriormente descritos, fueron realizados por triplicado (**n=3**), con replica experimental. Una vez que se obtuvo este número de n mínimo, se realizó un análisis estadístico por medio de pruebas paramétricas. Esto fue debido a que los datos muestrales se comportan de manera Gaussiana. Dichos análisis fueron: ANOVA (One-Way ANOVA on Ranks), Prueba de Turkey y T-Student. Estas pruebas se realizaron con ayuda del software GraphPad Prism 6. Con el fin de desestimar diferencias aleatorias, se tomó como parámetro de significancia un valor de *** = p<0.05**, **** = p<0.01**

RESULTADOS

- **Cambios morfológicos a través de la diferenciación de células hAD-
MSC**

Inicialmente, se evidenció la capacidad de diferenciación de las células hAD-MSC hacia el linaje adipocitario, a través de la adquisición de cambios morfológicos. En la figura 11 se observa que existe una pérdida gradual de la morfología fibroblastoide, típica de las hAD-MSC (día 0), para adquirir una morfológica más abultada y con una mayor refringencia, propia de la incorporación de ácidos grasos en el día 14 de la diferenciación. Estos cambios morfológicos corresponden con lo observado por nuestro grupo de trabajo (Valverde M. et al., 2018) y por Gibco

Technologies, 2014, en donde se demuestra que este mismo modelo celular, ante el mismo estímulo de diferenciación comienzan a expresar dos proteínas propias del linaje adipocitario como son la proteína humana transportadora de ácidos grasos de cadena larga-1 (hFATP) y la proteína de unión a ácidos grasos-4 (FABP4), respectivamente.

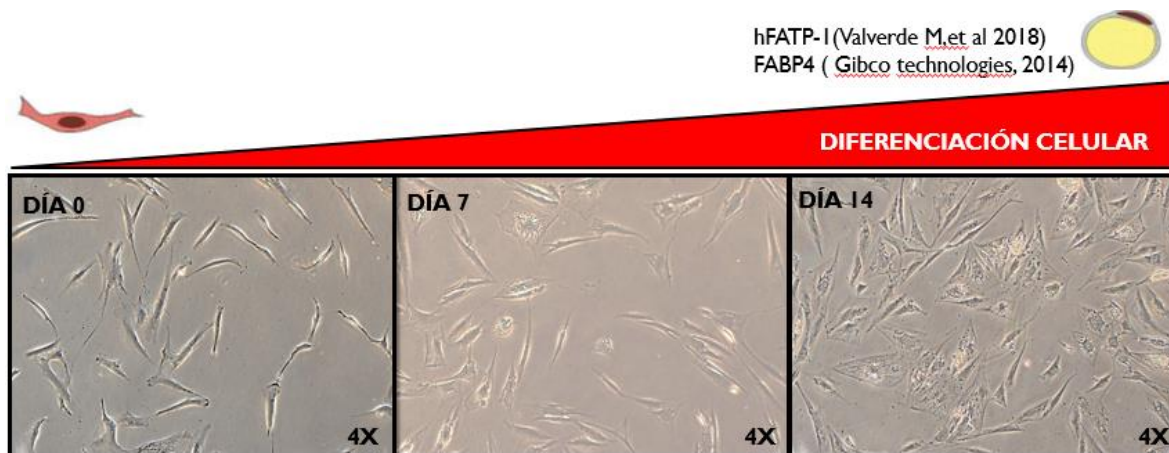
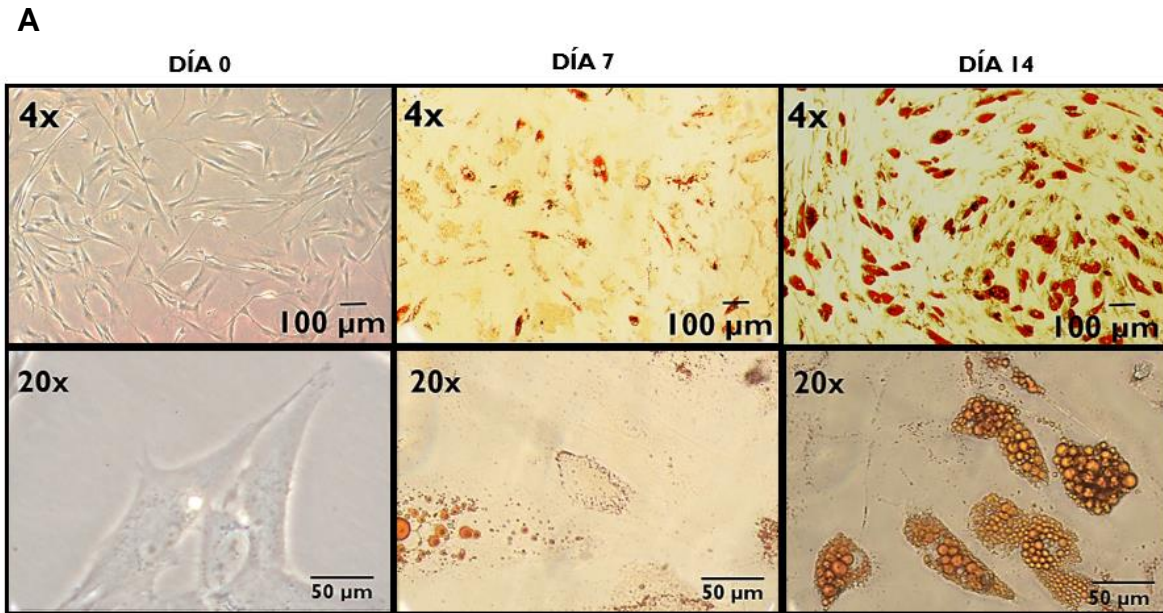


Figura 11. Cambios morfológicos a través de la diferenciación adipocitaria. Ante el estímulo de diferenciación, las células hAD-MSc, comienzan a perder de manera gradual su estructura fibroblastoide típica para adquirir una morfología más abultada y con mayor refringencia del adipocito.

Por otra parte, se observó que durante el proceso de diferenciación in vitro, ocurre una mayor incorporación del colorante lipofílico, rojo oleoso. Esto refleja la adquisición de capacidad secretora de lípidos de los adipocitos sanos (día 14), que aumenta gradualmente a partir del día 7 de diferenciación. Esto se determinó cualitativa (Figura 12A) y cuantitativamente por medio de espectrofotometría (Figura 12B).



Tinción con Rojo Oleoso

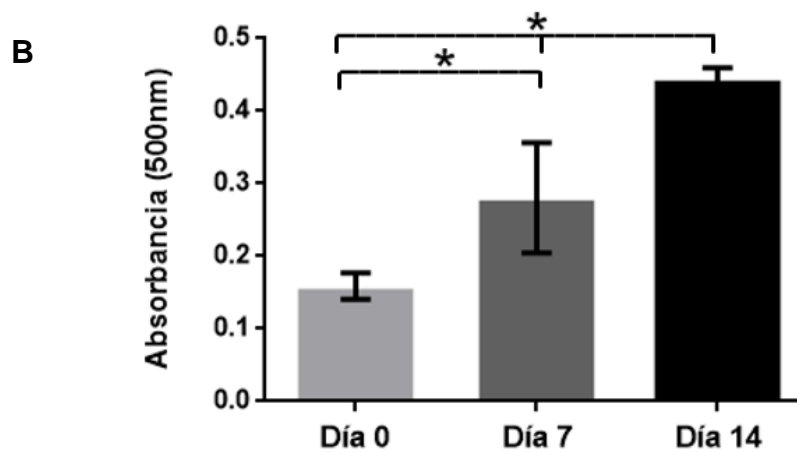


Figura 12. Tinción con Rojo oleoso. A) A través de la diferenciación hay una mayor incorporación del colorante lipofílico, Oil Red O. B) Gráfica de la cuantificación espectrofotométrica, encontrando valores significativamente más altos de absorbancia en el día 7 y 14 de la diferenciación con respecto al día 0. *= $p < 0.05$

Con base en los experimentos y observaciones antes mencionadas (cambios morfológicos, expresión de marcadores del linaje adipocitario e incremento en la incorporación de lípidos), mostramos la diferenciación adipogénica exitosa, que nos permite trabajar con adipocitos sanos.

Una vez siendo capaces de partir de adipocitos maduros, evaluamos el efecto que causa en ellos el TNF- α . Para dicho objetivo, decidimos tomar como punto de partida las condiciones propuestas por Turner et al., TNF- α 125 ng/ml por 24 horas, que induce la pérdida de función de adipocitos, provenientes de la línea celular murina 3T3-L1.

- **El TNF- α (125 ng/ml por 24 horas) no afecta la viabilidad celular de adipocitos maduros**

Como ya se mencionó, parte de la señalización del TNF- α involucra la activación de ciertas vías proapoptóticas, por medio de receptores de muerte expresados en la membrana de adipocitos, entre otros tipos celulares. Por ello, es importante determinar el efecto inducido por el TNF- α (125 ng/ml por 24 horas) en la viabilidad de los adipocitos sanos. Esto se realizó por medio de un ensayo de actividad metabólica con cFDA-BrET (Diacetato de fluoresceína – Bromuro de etidio). Se observó que no hay efecto citotóxico del TNF- α con respecto a los adipocitos no tratados (control) **Figura 13**. Esto nos permitió evaluar los parámetros de interés sabiendo que no hay algún proceso de muerte involucrado que interfiera en la interpretación de los resultados, sobre todo los de daño en el ADN.

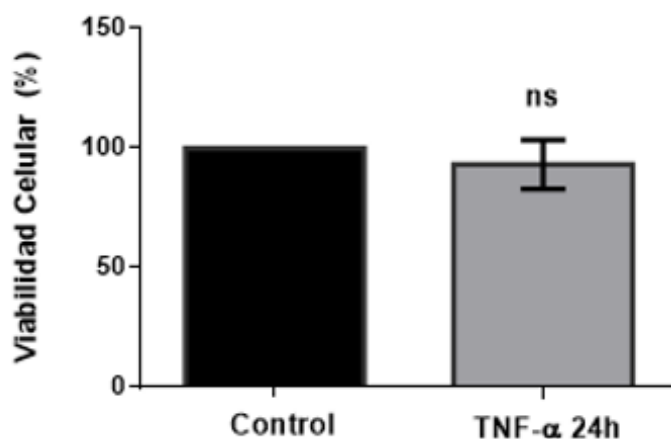


Figura 13. El tratamiento con TNF- α (125 ng/ml por 24 horas) no modifica la viabilidad celular de los adipocitos al compararlo con adipocitos no tratados (control). El ensayo se realizó por triplicado. La diferencia estadísticamente significativa fue considerada a partir de un valor de * $p < 0.05$.

- **Potencial de membrana mitocondrial**

A pesar de que el TNF- α (125 ng/ml por 24 horas) no afecta la viabilidad de los adipocitos *in vitro*; se evaluó el funcionamiento de estos. Esto se realizó por medio de un ensayo semicuantitativo que evalúa la funcionalidad mitocondrial. La pérdida de la funcionalidad mitocondrial, el principal organelo encargado de la producción de energía conlleva a una reducción significativa en los niveles de ATP y, por ende, la desregulación de muchos procesos celulares. La reducción de la funcionalidad mitocondrial ocurre como resultado de alguno de los siguientes eventos: 1) pérdida del mantenimiento del potencial electroquímico de la membrana interna mitocondrial, 2) alteraciones en el funcionamiento de la cadena de transporte de electrones o 3) una reducción en el transporte de metabolitos importantes para la mitocondria. Con base en esto, se evaluó si el TNF- α induce alguna alteración en el potencial de membrana mitocondrial que pudiera suponer alguna disfunción a nivel celular. Esto se realizó por medio de citometría de flujo (Mitochondrial Membrane Potential Detection Kit Catalog

#280002). En la **Figura 14** se observa un incremento del 30% de adipocitos con un bajo potencial de membrana mitocondrial, generado por el tratamiento con TNF- α .

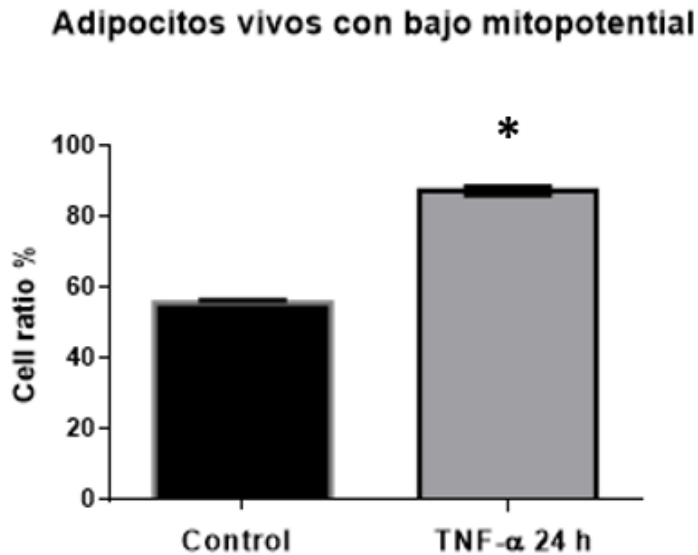


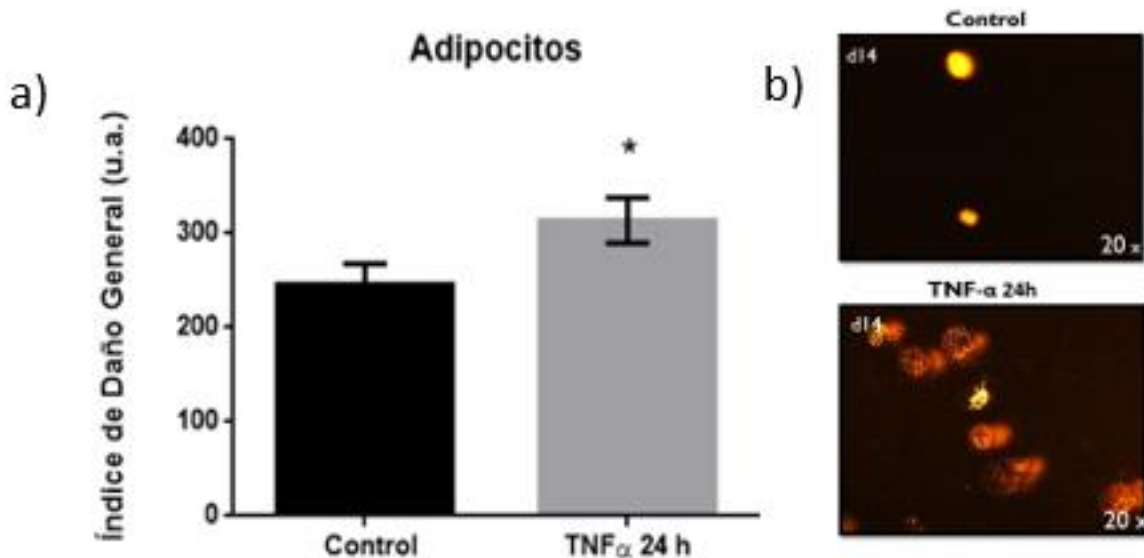
Figura 14. EL TNF- α induce un incremento en el porcentaje de adipocitos con bajo potencial de membrana mitocondrial. Este incremento fue determinado por citometría de flujo. En dicho ensayo, se utilizaron colorantes catiónicos como el 7-AAD y el mitopotential dye. El ensayo se realizó por triplicado y la diferencia estadísticamente significativa fue considerada a partir de un valor de * $p < 0.05$ (t-Student).

- **Daño al ADN en adipocitos maduros tratados con TNF- α**

Posteriormente, se evaluó el efecto que tiene el TNF- α sobre la integridad genómica de adipocitos maduros. Para dicho fin, se usó del ensayo cometa alcalino (pH >13), que evidencia las lesiones de cadena sencilla, lesiones oxidativas y sitios AP (apirimidicos y/o apurínicos) en el ADN.

El nivel de daño en el ADN fue expresado como un Índice de Daño General (IDG). Este IDG pondera la cantidad de nucleoides (número de eventos) distribuidos en

cinco categorías de daño (C0, C1, CII, CIII, CIV). En la **figura 15a** se muestra que el IDG de adipocitos expuestos al TNF- α por 24 horas, se incrementó un 30%, con respecto al IDG de adipocitos no tratados (control). Este incremento de daño en el ADN, también se puede apreciar como incremento en la longitud de las colas de los cometas y por la pérdida de compactación de la cromatina, **Figura 15b**. Asimismo, la distribución del daño en el ADN categorizado, **Figura 15c**, muestra que el tratamiento con TNF- α genera nucleoides de las categorías de mayor daño, con respecto a los adipocitos control.



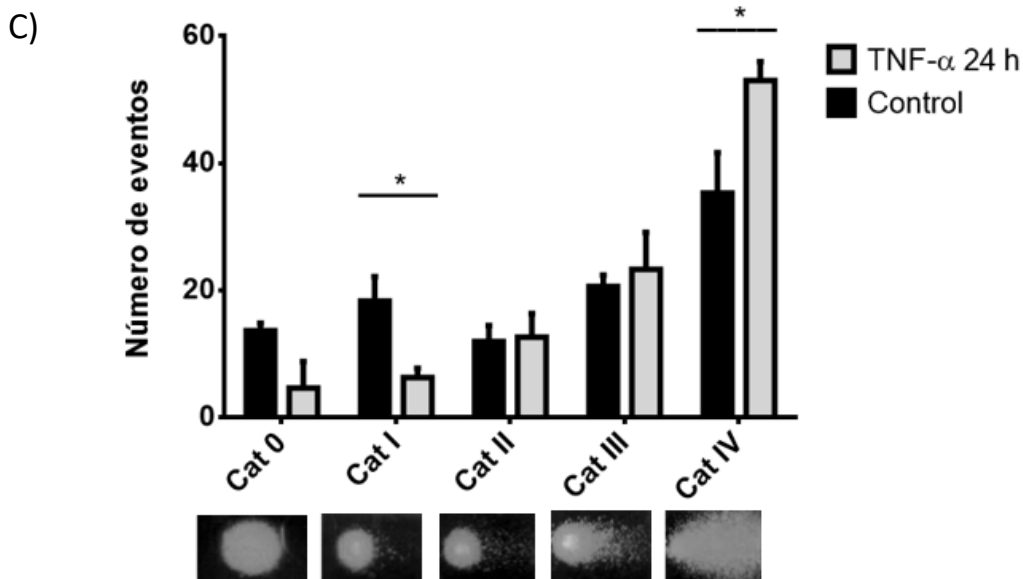


Figura 15. EL tratamiento de TNF- α (125 ng/ml por 24 horas) induce daño oxidativo en el ADN de adipocitos sanos. Por medio de ensayo cometa alcalino (pH >13) se evidencia incremento en el IDG de adipocitos tratados con TNF- α con respecto a los adipocitos no tratados (a). Mayor longitud en las colas de los cometas y menor compactación de la cromatina en adipocitos tratados con TNF- α (b). Incremento en el número de nucleoides de categorización de mayor nivel de daño en el ADN de los adipocitos tratados con respecto al control (c). *= p<0.05

- **Incremento en los niveles de ERO's inducidas por TNF- α**

Se ha documentado ampliamente que el TNF- α genera EROs, la cuales tienen la capacidad de inducir rompimientos en el ADN. Por ello, una vez habiendo identificado la genotoxicidad inducida por TNF- α , quisimos determinar si estaba relacionada con los niveles intracelulares de ERO. Los niveles de ERO se determinaron mediante un ensayo de oxidación de dihidrorrodamina-123 a rodhamina. Esta oxidación es dependiente de ERO, por lo cual determinará de manera indirecta la concentración citosólica de las mismas. En la **figura 16** podemos observar que, los niveles citosólicos de ERO incrementaron en adipocitos tratados con TNF- α , en comparación con adipocitos control (no tratados).

Concentración citosólica de ERO's

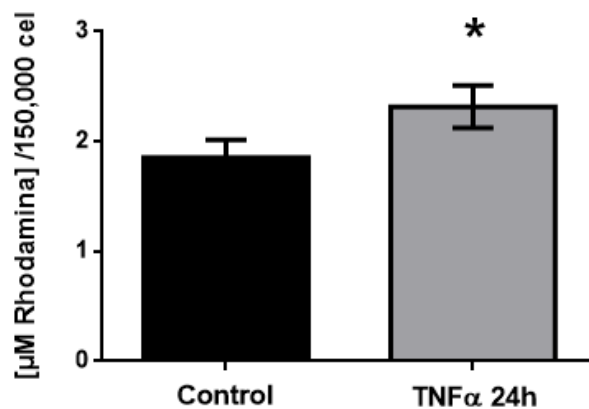


Figura 16. El TNF- α incrementa los niveles de ERO en adipocitos. Se observa un incremento estadísticamente significativo (* $p < 0.05$) en los niveles de ERO inducidos por el TNF- α 125 ng/ml, comparado con adipocitos control. Los experimentos se realizaron tres veces de forma independiente con replicas experimentales.

- **Correlación positiva entre el daño en el ADN y ERO**

Una vez determinado que el TNF- α incrementa los niveles de ERO y el daño al ADN en adipocitos maduros; se evaluó si existía una correlación entre estas dos variables. Para ello, se determinó el coeficiente de correlación de Pearson a partir de los datos recabados en los ensayos anteriores, cuyo resultado se muestra en la **figura 17**. En ella, observamos que la distribución de los datos describe una pendiente positiva con un coeficiente de correlación de 0.87, estadísticamente significativo. De esta manera, es posible suponer que el TNF- α induce daño oxidativo al ADN por medio de la generación de ERO en adipocitos sanos provenientes de la línea celular, hAD-MSc.

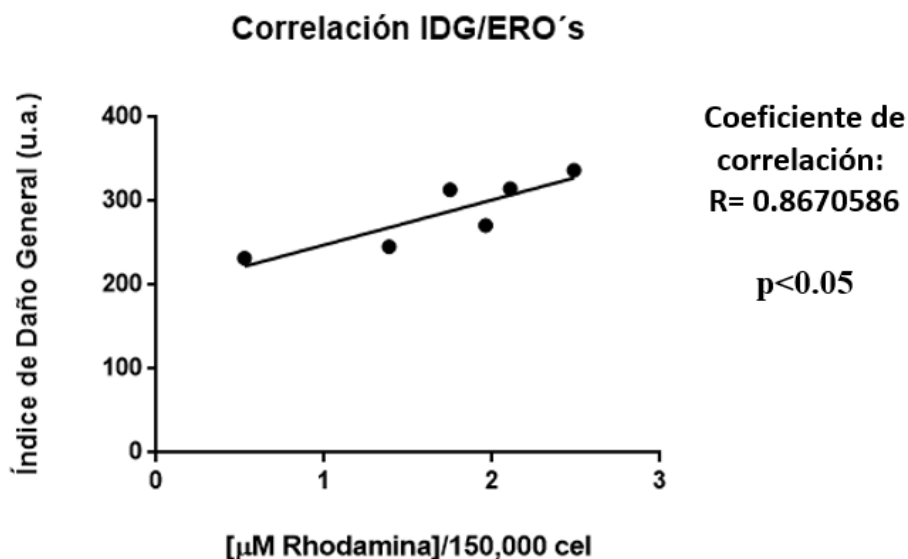
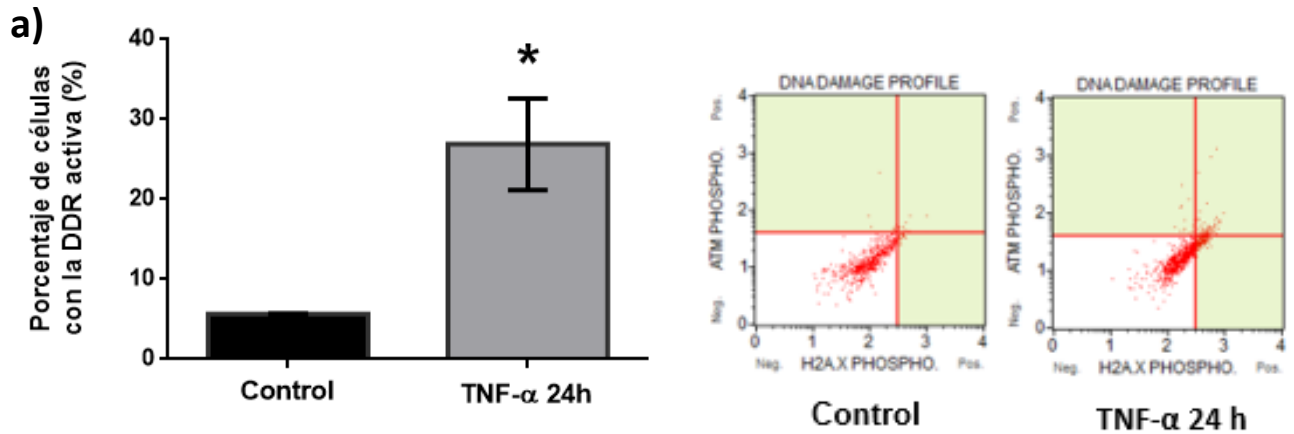


Figura 17. Correlación positiva entre el IDG y los niveles intracelulares de ERO inducidos por TNF- α en adipocitos maduros provenientes de la línea celular hAD-MSC. * p<0.05

- **Activación de la DDR en adipocitos tratados con TNF- α**

Después, se evaluó si el daño al ADN inducido por TNF- α induce la activación de la respuesta al daño en el ADN (DDR). Esto se determinó por medio de citometría de flujo, en donde se analizó de manera cuantitativa el porcentaje de células positivas a la fosforilación de proteínas sensores de la DDR como: la histona γ H2AX y la cinasa ATM. De esta manera, cuantificamos el porcentaje de activación de la DDR, calculado como el número de células positivas para γ H2AX, pATM y el doble marcaje que denota rompimientos de doble cadena del ADN (DSB) resultado del tratamiento con TNF- α por 24 h. No obstante, es importante mencionar que, este incremento significativo en la actividad de la DDR corresponde, únicamente a un 25% de nuestra población celular (**Figura 18a**). Asimismo, evidenciamos que este efecto en la DDR, principalmente se reflejó de un aumento significativo en la fosforilación de γ H2AX. Mientras que para DSB este incremento no es significativo, **Figura 18b**.



Fosforilación de ATM y γ H2AX

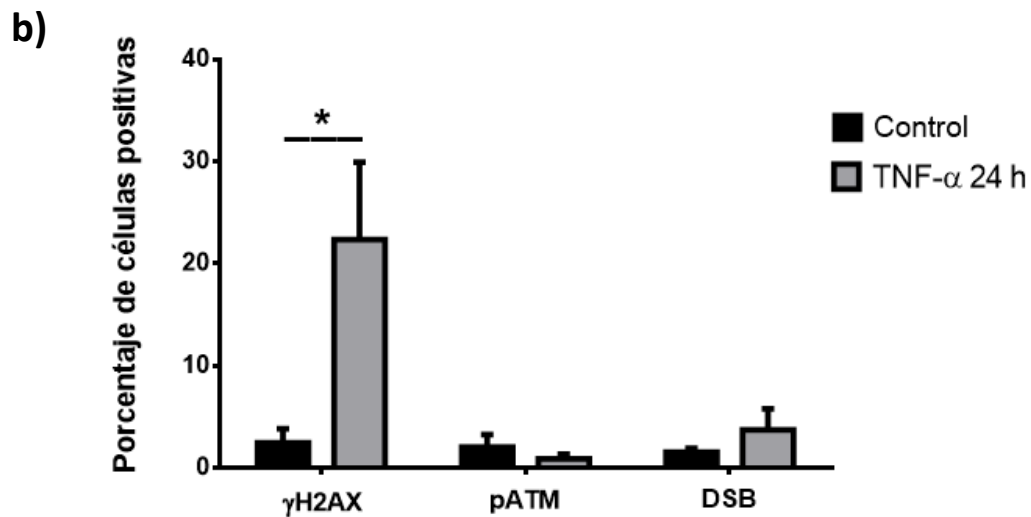


Figura 18. Activación de la DDR en adipocitos tratados con TNF- α . Por medio de citometría de flujo se analizó de manera cuantitativa el porcentaje de activación de la DDR a través de la fosforilación de proteínas involucradas en la DDR como la histona γ H2AX y la cinasa pATM (a). Observamos que el TNF- α (125 ng/ml) aumenta la activación de la DDR al inducir la fosforilación de ambas proteínas con respecto a su condición control (b). El ensayo se realizó por triplicado y la diferencia estadísticamente significativa fue considerada a partir de un valor de * $p < 0.05$.

- **Autorregulación de TNF- α en adipocitos maduros.**

A pesar de su potente acción, las citocinas como el TNF- α poseen un tiempo de vida relativamente corto (aproximadamente 50 minutos) tanto *in vivo* como *in vitro*. No obstante, son capaces de inducir su propia expresión durante tiempos prolongados. Con base en esto, se evaluó si el TNF- α induce su propia regulación. Esto se analizó por medio de un ensayo tipo ELISA, la **figura 19**, muestra la determinación de los niveles secretados de TNF- α en el medio de cultivo de los adipocitos tratados después de 24 horas que dura el tratamiento, en comparación con el nivel de secreción determinado en el medio de cultivo de adipocitos no tratados (control).

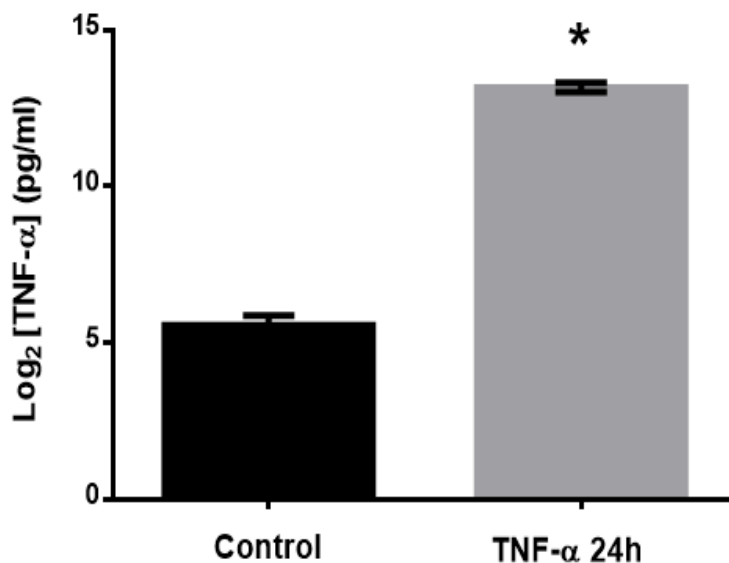


Figura 19. Autorregulación de TNF- α . Posterior al tratamiento con TNF- α se cuantificó mediante ELISA, altos niveles de adipocina secretada al medio, con respecto a la secreción de adipocitos control. El resultado fue expresado como Log₂ de la concentración de TNF- α presente en el sobrenadante. El ensayo se realizó por triplicado y la diferencia estadísticamente significativa fue considerada a partir de un valor de *p \leq 0.05.

- **El medio de cultivo proveniente de adipocitos tratados con TNF- α (MCT) inhibe parcialmente el proceso adipogénico**

Como ya se mencionó, múltiples trabajos han evidenciado que una activación sostenida de la DDR induce alteraciones en diversos procesos celulares como la diferenciación. Estas alteraciones no solo repercuten en el funcionamiento de la célula dañada, sino también en células vecinas (Malakin N. et al., 2015). Esta señal de alarma extracelular se genera por medio de moléculas solubles que en conjunto reciben el nombre de SASP. Debido a esto, se analizó si el secretoma de adipocitos tratados con TNF- α , por 24 horas (MCT), altera el proceso adipogénico de células hAD-MSCs expuestas a este estímulo a partir del día 7 hasta el 14 de la diferenciación. Por medio de la tinción con rojo oleoso, se observó que las células expuestas al MCT incorporan una menor cantidad de dicho colorante, con respecto a células tratadas con un medio condicionado de adipocitos no tratados (MCC), **Figura 20.**

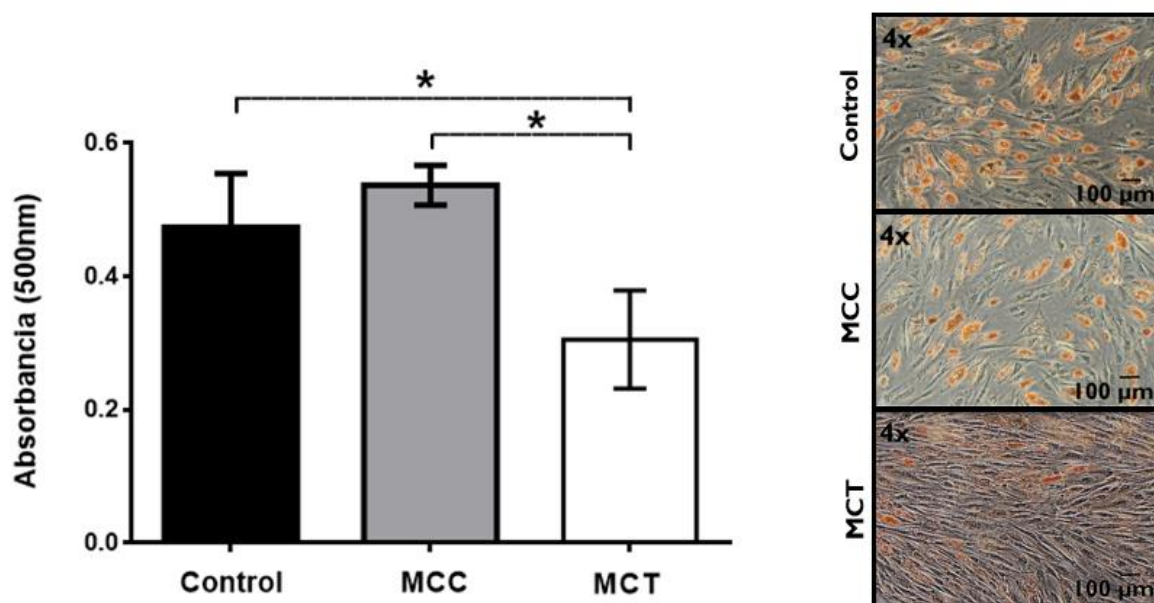


Figura 20. Tinción con rojo oleoso de células expuestas a medio condicionado, al cabo de la diferenciación de 14 días. Células hAD-MSCs en el día 7 de la diferenciación (preadipocitos) fueron expuestas al medio condicionado de adipocitos control (MCC) o tratados con TNF- α (MCT) hasta el día 14 de la diferenciación. Por medio de

espectrofotometría se determinó la incorporación de rojo oleoso en ambas condiciones. El ensayo se realizó por triplicado y la diferencia estadísticamente significativa fue considerada a partir de un valor de $*p \leq 0.05$.

De igual manera, comparamos el efecto que tenían los medios condicionados (MCC y MCT) con respecto a adipocitos control. Observamos que no existe diferencia estadística, de la incorporación de rojo oleoso, entre las células expuestas al MCC y los adipocitos control. Mientras que, las células tratadas con MCT incorporan una cantidad significativamente menor del colorante Oil Red O, con respecto a los adipocitos control, **Figura 20**. Esto refleja una disminución en la capacidad de diferenciación adipogénica óptima de hAD-MSCs, ocasionada por el TNF- α presente en el secretoma.

- **El MCT induce daño en el ADN al término de la diferenciación adipocitaria**

El proceso de la diferenciación celular es promovido o inhibido por múltiples factores, entre ellos, el daño al ADN. Con base en esto, se evaluó si el efecto observado sobre la adipogénesis estaba relacionado a la genotoxicidad. Para ello, por medio de ensayo cometa alcalino se evidenció que el daño en el ADN de células expuestas al MCT, incrementa de manera significativa cuando se compara con el daño en el ADN en células tratadas con MCC, **Figura 21a**. La diferencia se debe al número de nucleoides en categoría IV, la de mayor grado de daño.

Aunque este efecto fue estadísticamente significativo, el daño inducido al ADN por el TNF- α en adipocitos sanos fue mayor, **Figura 21b,c**. Por otra parte, la genotoxicidad inducida por el MCT no mostró significancia estadística con respecto a los adipocitos control.

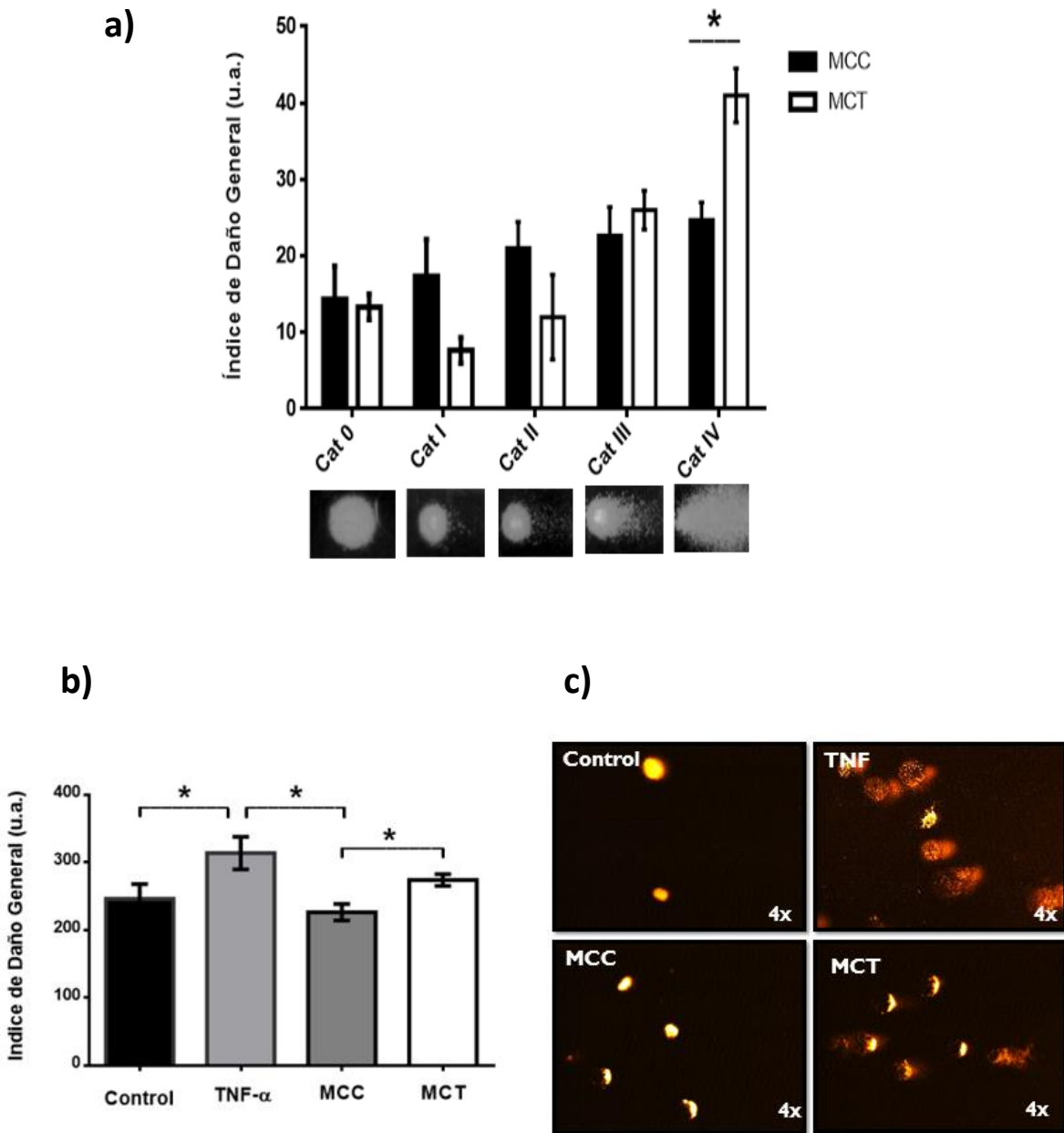


Figura 21. Daño oxidativo en el ADN inducido por la exposición al medio condicionado de adipocitos tratados por 24 h con TNF- α (MCT). a) Distribución del daño al ADN por categorías. Células hAD-MSC en el día 7 de la diferenciación fueron expuestas al MCT o MCC hasta el día 14 de la diferenciación; b) proporción de daño genotóxico con respecto al inducido por TNF- α . c) Se observó por medio de cometa alcalino que el MCT incrementa el IDG con respecto a células expuestas al MCC. El ensayo se realizó por triplicado, la diferencia estadísticamente significativa fue considerada a partir de un valor de * $p < 0.05$.

- **El MCT incrementa los DSB y la activación de la DDR en células hAD-
MSC tratadas a partir del día 7 de la adipogénesis.**

Se evaluó si el incremento en la genotoxicidad, producida por el MCT, tenía algún efecto sobre la activación de la DDR. En la **Figura 22a** se muestra el porcentaje de células con la DDR activa, considerando todas las respuestas captadas, γH2AX^{++} pATM^{+} + $\text{DSB}=\gamma\text{H2AX}^{+}/\text{pATM}^{+}$ (doble marcaje). Se observó la activación de la DDR estadísticamente significativa por el tratamiento con MCT en preadipocitos y adipocitos tratados con $\text{TNF-}\alpha$; ambos con respecto a los adipocitos no tratados. Sin embargo, debido a la alta variabilidad en la respuesta, el incremento en la activación de la DDR inducido por el MCC en los preadipocitos no es estadísticamente significativo.

No obstante, al analizar la activación de la DDR mediante las respuestas individuales, **Figura 22b**, es posible observar que el tratamiento con el MCT muestra valores mayores que el tratamiento con MCC. Principalmente, hay mayor efecto en el doble marcaje, $\text{DSB}=\gamma\text{H2AX}^{+}/\text{pATM}^{+}$ y en la fosforilación de ATM (pATM); mientras que γH2AX muestra valores más altos sin ser significativos estadísticamente.

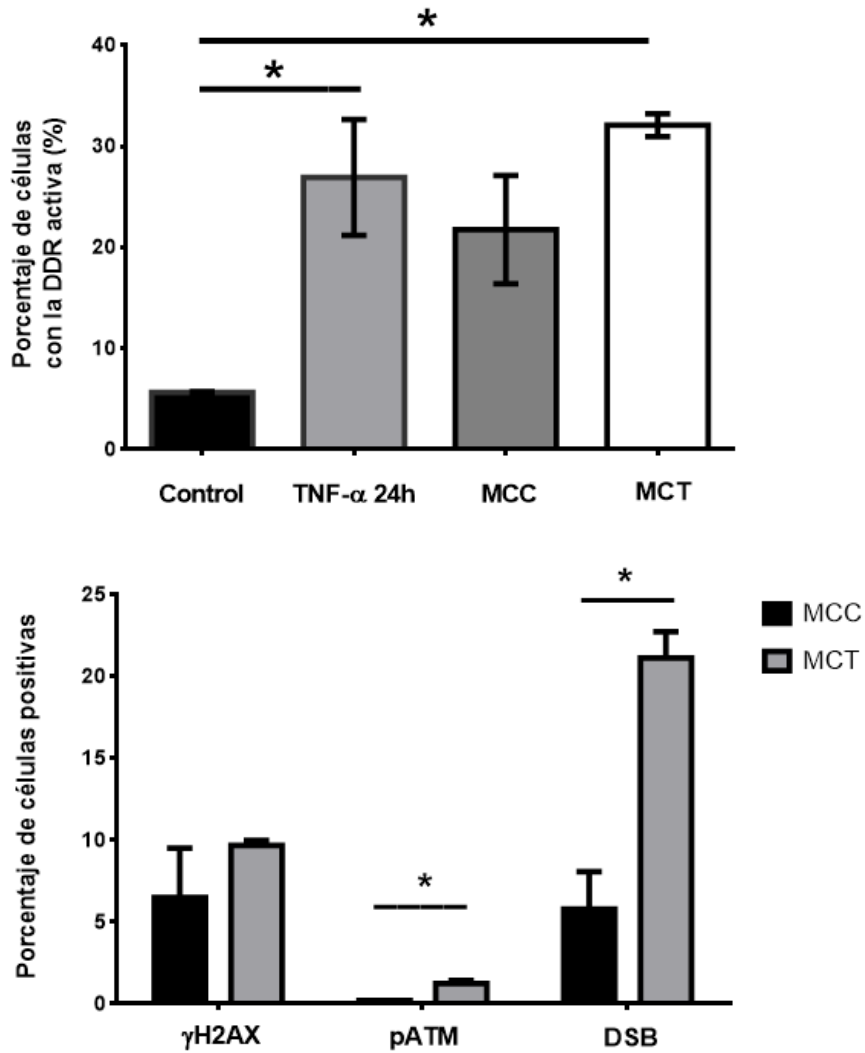


Figura 22. El MCT induce un incremento en la activación de la DDR y DSB (γ H2AX⁺ pATM⁺). a) Las células hAD-MSC, tratadas con el MCT a partir del día 7 de la diferenciación, incrementaron la activación de la DDR con respecto a los adipocitos no tratados, en magnitud semejante a los adipocitos tratados con TNF- α . B) La activación de la DDR inducida por el MCT involucra la persistencia de DSB y pATM. ANOVA * $p < 0.05$.

DISCUSIÓN

La disfunción del adipocito ha sido extensamente reportada como una pieza clave en la aparición y mantenimiento de diferentes patologías metabólicas (Cotillard A. et al., 2014). Esta disfunción es iniciada por una secuencia de mecanismos fisiopatológicos intracelulares; entre los que destaca la activación sostenida de diferentes vías de respuesta a estrés (Kloting N. et al., 2014). Algunos estudios han demostrado que la activación temprana de una de las vías de estrés, denominada DDR (Respuesta al Daño en el ADN); precede a la pérdida de función del adipocito. Sin embargo, las causas y los mecanismos que lo producen no han sido establecidos (Bastien V. et al., 2016; Minamino et al., 2009).

La DDR es una red de vías de señalización que responde al daño inducido por diferentes agentes genotóxicos. Algunos de estos agentes inductores de daño son la radiación ionizante, la luz UV, agentes oxidantes o, incluso, productos del metabolismo intrínseco celular como las ERO (Malaquin N. et al., 2015, Wang H. et al., 2015). Así mismo, algunos estímulos inflamatorios, como el TNF- α , han sido asociados a la inducción de daño al ADN (Fehsel K. et al., 1991).

El Factor de Necrosis Tumoral- α (TNF- α) es una citocina proinflamatoria que, en diversas patologías metabólicas como la obesidad y la diabetes mellitus; se encuentra en concentraciones altas y constantes en el tejido adiposo. La persistencia del TNF- α ha sido estrechamente relacionado con la aparición y mantenimiento de patologías metabólicas y no metabólicas. Esto se debe a su importante papel como inductor de estrés oxidante, apoptosis y daño al ADN. Trabajos recientes, realizados por Turner et al., han evidenciado que la presencia de TNF- α (125 ng/ml por 24 horas) induce la disfunción de adipocitos provenientes de la línea celular 3T3-L1. Sin embargo, el mecanismo no fue del todo elucidado (Turner P. et al., 2018). Con base en esto, resulta interesante y necesario seguir abordando nuevos y más detallados mecanismos moleculares, mediante los cuales, el TNF- α ejerce efectos perjudiciales para el adipocito y, con ello, para el organismo

en general. Esto con el fin de evidenciar nuevos y mejores blancos terapéuticos que permitan el desarrollo de nuevas herramientas terapéuticas para distintas patologías metabólicas. El presente trabajo estuvo enfocado en dar una aproximación *in vitro*, acerca de la función que ejerce el TNF- α en la disfunción del adipocito; abordando su papel como inductor de estrés oxidante y daño al ADN, para establecer si conducen a la persistencia en la DDR.

De manera inicial, replicamos el proceso de adipogénesis descrito por nuestro grupo de trabajo en 2018. Donde se demostró que, en este modelo de diferenciación celular, las hAD-MSC (células Troncales Estromales/Mesenquimales derivadas de tejido adiposo adulto), para el día 14, expresa marcadores propios del linaje adipocitario (hFAT-1) y el 95% de la población celular se encuentra arrestada en la fase G1 del ciclo celular (Valverde M. et al., 2018). De esta manera, por medio de microfotografías y ensayos con rojo oleoso, se corroboró que el proceso de diferenciación adipogénica fue exitoso, **Figura 11 y 12**. Si bien, es verdad que las células no muestran la unilocularidad propia del adipocito blanco; es importante destacar que el proceso de la diferenciación *in vivo* requiere de todo un nicho o microambiente difícil de replicar en un modelo *in vitro* (Turner P. et al., 2018). Este microambiente está caracterizado por una heterogeneidad celular que, por medio de factores solubles y no solubles, regula el proceso de la adipogénesis. Esta morfología es muy similar a la observada por otros grupos de trabajo; los cuales demostraron que dicho cambio morfológico de las hAD-MSC, se correlaciona con un incremento en la secreción de adiponectina (Martella E. et al., 2014). A pesar de que nuestro modelo posee ciertas limitaciones; como cualquier otro, representa una fuente confiable de información debido a que reduce variables propias de un modelo 3D e *in vivo*. Algunos de estas variables son: la dificultad para discernir entre distintas poblaciones celulares, la exposición diferencial a los nutrientes y/o al tratamiento y la diferenciación asincrónica.

Una vez corroborado que el proceso de diferenciación se llevó a cabo de manera adecuada; evaluamos el efecto que tiene el TNF- α sobre adipocitos sanos, provenientes de la línea celular hAD-MSC. Para dicho objetivo, se tomó como punto

de partida las condiciones propuestas por Turner et al., (125 ng/ml de TNF- α , por 24 horas). Dichas condiciones asemejan a las encontradas en el tejido adiposo de sujetos que sufren patologías relacionadas a la disfunción del adipocito, como la obesidad y la diabetes (Turner P. et al., 2015).

Un efecto bien conocido del TNF- α es la inducción de la apoptosis. Este efecto depende de distintos factores como el tipo celular, la concentración y tiempo de exposición a dicha citocina (Aggarwal B.B. et al., 2012). Al evaluar el impacto del TNF- α sobre los adipocitos, se observó que no presenta algún efecto significativo sobre su viabilidad, **Figura 13**. No obstante, a pesar de este nulo efecto, se comprobó al igual que el modelo de Turner et al., que existe un incremento significativo en el porcentaje de los adipocitos con alteraciones metabólicas, **Figura 14**. Dichas alteraciones metabólicas fueron evidenciadas como alteraciones en el funcionamiento mitocondrial de los adipocitos. La mitocondria es, por excelencia, el principal organelo regulador del metabolismo celular. En células especializadas en el almacenamiento de energía, como el adipocito, las mitocondrias cumplen un papel crucial en su correcto funcionamiento. Por ende, alteraciones a nivel mitocondrial son característica clave de la disfunción del adipocito. Dichas alteraciones están dadas por: 1) pérdida del mantenimiento del potencial electroquímico de la membrana interna mitocondrial, 2) alteraciones en el funcionamiento de la cadena de transporte de electrones o, 3) una reducción en el transporte de metabolitos importantes para la mitocondria. El método elegido para la evaluación de este objetivo se basa en la cuantificación del porcentaje de adipocitos cuyo potencial de membrana mitocondrial se ha perdido. Dicho método nos permite evitar artefactos propios del aislamiento mitocondrial, en un contexto de mayor relevancia fisiológica. Existen múltiples mecanismos responsables de alterar el correcto funcionamiento mitocondrial, siendo la sobreproducción de ERO (estrés oxidante) uno de los más reportados. Trabajos realizados por Mariappan N et al., 2008 lograron evidenciar que, el TNF- α induce disfunción celular en el ventrículo izquierdo por medio de daño mitocondrial. Este daño es atribuido a un incremento importante en ERO, provocado por alteraciones en la permeabilidad de membrana y la consecuente inhibición de la cadena de transporte de electrones. En nuestro

modelo, al analizar la producción de ERO citosólicas, se observó que sus niveles se incrementaron de manera significativa en los adipocitos tratados con TNF- α , con respecto al control, **Figura 16**. Sin embargo, esto puede ser tanto una causa como efecto de la disfunción mitocondrial anteriormente mostrada en la **Figura 14**. Como ya se mencionó, el TNF- α ha sido reportado como un potente inductor de estrés oxidante en diferentes tejidos. En adipocitos, el incremento de ERO está más asociado a una sobreexpresión de la NOX4 (NADPH oxidasa-4), la isoforma más expresada en este tipo celular (Wlodarczyk, M et al., 2018). Asimismo, se ha reportado que el TNF- α puede incrementar la expresión de la NOX4 en diferentes tejidos, como el adiposo (Nanami M et al., 2005). Además, al TNF- α también se le ha atribuido la subregulación de ciertas proteínas antioxidantes. Las ERO son altamente reactivas, debido a que poseen uno o más electrones desapareados que pueden oxidar a otro tipo de moléculas, alterando su estructura y función. Uno de los principales blancos de ataque de las ERO es el ADN (Wlodarczyk, M et al., 2018). Al evaluar el efecto del TNF- α sobre la integridad genómica de los adipocitos, **Figura 15**, se observó que a pesar de que la adipogénesis *per se*, involucra una acumulación de rompimientos de cadena del ADN (Valverde M. et al., 2018), el TNF- α los incrementa en un 25%, con respecto a los adipocitos no tratados (control). Este incremento es claramente reflejado en microfotografías, las cuales muestran que el tratamiento induce la descompactación y fragmentación de la cromatina. No obstante, existen mecanismos alternos a las ERO, por los cuales, el TNF- α puede inducir daño al ADN. Como podría ser la activación del TNFR1; la unión del TNF- α al TNFR1 favorece la escisión y activación de la caspasa 3. Esta caspasa activa a la DNAsa activada por caspasas (CAD), que subsecuentemente viaja al núcleo y degrada al ADN en pequeños fragmentos (Aggarwal B.B. et al., 2012). Sin embargo, esta vía está estrechamente relacionada con procesos apoptóticos, los cuales, no son evidenciados bajo nuestra concentración y tiempo de tratamiento. Debido a esto, proponemos que existe una relación estrecha entre la sobreproducción de ERO y el incremento en el daño al ADN al establecer una correlación simple de Pearson, que arrojo un coeficiente de correlación (r) de 0.87 y una $p < 0.05$, lo cual nos indica que el daño genotóxico inducido por TNF- α está influenciado por los

niveles de ERO. Sin embargo, es necesario mencionar que correlación no necesariamente conlleva a alguna causalidad. El uso de algún agente antioxidante, como la N-acetilcisteína, despejaría por completo cualquier especulación. Hasta entonces, no es posible descartar del todo, que el daño observado en la **Figura 15** es producto de otros mecanismos asociados a las vías de señalización activadas por TNF- α , y no a las ERO. Para ese momento, quedo claro que, la disfunción del adipocito inducida por TNF- α está relacionada a el daño en el ADN, posiblemente causado por la sobreproducción de ERO citosólicas. Sin embargo, para establecer un vínculo más claro entre el daño al ADN y la disfunción del adipocito, decidimos ir más allá contestando la siguiente pregunta ¿El daño inducido por el TNF- α es suficiente para activar de manera sostenida la DDR en los adipocitos?

Ante una acumulación de daños en el ADN se produce la activación de la DDR. Esto con el fin de reparar, de manera pronta y eficiente, las lesiones (Tubbs A. et al., 2017; Haber J. E. et al., 2015). Sin embargo, trabajos previos realizados por Bastien V. et al., han evidenciado que una activación sostenida de la DDR (de horas a meses) precede a la disfunción del adipocito (Bastien V. et al., 2015). De manera sorprendente, corroboramos que, el TNF- α induce un incremento de casi el 400% del porcentaje de adipocitos con la DDR activada. Este porcentaje se calculó por medio de la cuantificación citofluorométrica de las proteínas: pATM y γ H2AX. La fosforilación de estas dos proteínas es un importante paso en la activación de la DDR; por ello, han sido ampliamente utilizadas como marcadores de la activación de la DDR y daño en el ADN (N. Bhogal et al., 2009; A.J. Nakamura et al., 2010). Además, se evidenció que del porcentaje de adipocitos expuestos a TNF- α , cuya DDR está activada, un 85% corresponde a células positivas, únicamente, a γ H2AX. Sin embargo, las células positivas para pATM y DSB= γ H2AX+pATM (doble marcaje) presentan una clara tendencia a incrementar, con respecto a la condición control, **Figura 18**. Este incremento significativo en la fosforilación de γ H2AX sugiere varios escenarios. En primer lugar, se puede suponer que este incremento en γ H2AX corresponde a un proceso de señalización temprana de la DDR. Puesto que, γ H2AX favorece el reclutamiento de otras proteínas efectoras de la DDR. Además, se sabe que, en el adipocito la expresión y función de algunas proteínas

involucradas en la reparación del ADN se encuentra subregulada. Mientras que la de otras se encuentra enriquecida (Narciso L. et al., 2007), **Tabla 2**. Un ejemplo de estas últimas es la proteína DNA PK (Meulle A. et al., 2008). Esta proteína, junto con ATM y ATR, son las principales proteínas encargadas de censar lesiones en el ADN y reclutar a otras proteínas efectoras (H.Wang et al., 2005), dependiendo del tipo de lesión. De esta manera, otra posible explicación de la baja presencia de pATM, observada en la **Figura 18**, corresponde a que las lesiones inducidas por TNF- α pueden estar siendo censadas por DNA PK o, incluso, ATR. Esto, puede ser corroborado por medio de la cuantificación de la expresión de estas proteínas, por medio de Western Blot. Otro aspecto importante a notar es que dicha activación de la DDR se dio de manera sostenida (24 horas). Si bien es cierto que, la activación de la DDR está dada con el fin de preservar la integridad genómica; una activación sostenida favorece procesos como senescencia y disfunción celular (Hernández-Segura A. et al., 2018). Debido a esto, no se puede descartar la posibilidad de que aquellas células, cuya DDR se mantuvo activa hasta por 24 horas, se encuentren en un proceso de senescencia. Dicha hipótesis puede ser confirmada por medio de la cuantificación de la actividad de la enzima lisosomal β -galactosidasa, una prueba ampliamente utilizado por la comunidad científica para evaluar la senescencia. Mientras que, para el caso de la disfunción celular, la DDR funciona como un potente regulador metabólico a través del factor de transcripción p53. Si bien, es cierto que la función más conocida de p53 es el arresto del ciclo celular, aunque no es la única (Puzio-Kuter A., 2011). Dicho factor de transcripción controla el metabolismo energético a través de la regulación transcripcional de diferentes sets de genes. Estos genes estarán encargados de la regulación del metabolismo de lípidos, glucosa, aminoácidos, la fosforilación oxidativa, el ciclo de Krebs y la producción de ERO. De esta manera, p53 influye en los niveles de productos y destinos metabólicos que, de ser persistentes, repercuten directamente en el correcto funcionamiento celular (Puzio-Kuter A., 2011). Así, el presente trabajo es uno de los primeros reportes en evidenciar, de manera directa, la activación sostenida de la DDR mediada por TNF- α en adipocitos humanos, y su implicación.

El hecho de haber confirmado la activación sostenida de la DDR (por 24 horas), llevo a cuestionarnos si era necesaria la presencia continua del TNF- α para mantener esta vía activa. Esta citocina posee un tiempo de vida media de aproximadamente 50 minutos *in vivo*. Sin embargo, se sabe que puede permanecer en altas concentraciones en el torrente sanguíneo o en el medio de cultivo a través de su autorregulación (Aggarwal B.B. et al., 2012). Se sabe que la expresión de esta citocina es estimulada por medio de activadores de la PKC como lo son los lipopolisacáridos (LPS) y el TNF- α mismo. Al cuantificar la concentración de TNF- α presente en el medio de cultivo de los adipocitos a las 24 horas, se encontró un nivel significativamente superior en la condición tratada, con respecto al control. Esto supone que, en nuestro modelo, se llevan a cabo mecanismos encargados de la autorregulación del TNF- α , **Figura 19**. Es importante mencionar que, de manera basal, un adipocito sano secreta bajas concentraciones de TNF- α . No obstante, estas concentraciones en ningún momento se incrementan de la manera observada en el grupo tratado. Además, es lógico pensar que la persistencia del TNF- α en el medio de cultivo, no solo sea causa sino también consecuencia de la activación sostenida de la DDR. Dicha respuesta estimula la activación del factor transcripcional NF κ B y, con ello, la expresión de moléculas señalizadoras solubles como citocinas proinflamatorias (TNF- α , IL-6, IL-1b), metaloproteinasas y factores de crecimiento (EGF) que en conjunto reciben el nombre de Fenotipo Secretorio Asociado a la Senescencia (SASP) (Coppe,J.P. et al., 2008). En vista de esto, resulta lógico pensar que en el medio de cultivo de los adipocitos tratados se encuentran altamente expresadas otras moléculas solubles que no fueron cuantificadas en este trabajo por cuestiones de tiempo.

In vivo, la adquisición del SASP permite a la célula senescente, promover procesos de restauración tisular, diferenciación celular, proliferación e incluso activación de la DDR en células adyacentes (Malaquin N. et al., 2015). Sin embargo, la presencia continua de moléculas proinflamatorias como el TNF- α se correlacionan con la aparición y desarrollo de diversas patologías metabólicas como la obesidad y la caquexia. Esta última se caracteriza por una perdida excesiva de función y masa del tejido adiposo. Sin embargo, aún no se encuentra del todo claro cómo es que

ocurre esto (Tamai M. et al.,2010). Trabajos realizados por Minori Tamai en 2010, han evidenciado que la presencia constante de TNF- α inhibe el proceso adipogénico en células troncales/estromales derivadas de tejido adiposo humano (Tamai M. et al., 2010). Al respecto, reportes previos han demostrado que este potente efecto inhibitorio es a través de la activación del receptor TNFR1 (Xu H. et al 1999). La activación de este receptor inhibe a PPAR γ por medio de la activación de NF κ B. En contraste, la información recabada acerca de si afecta el proceso de diferenciación en células ya comprometidas, como los preadipocitos, es muy limitada (Tamai M. et al., 2010). Con base en esto, se evaluó si las altas concentraciones de TNF- α , mantenidas por la activación sostenida de la DDR, afectaban el proceso de la diferenciación y la DDR en preadipocitos, provenientes de la línea celular hAD-MS. En la **Figura 20**, se observó que el medio proveniente de adipocitos tratados con TNF- α (MCT) disminuye de manera significativa la incorporación de rojo oleoso para el día 14 de la diferenciación. Esta disminución fue con respecto a preadipocitos tratados con medio proveniente de adipocitos sanos no tratados (MCC) y a su control positivo de diferenciación. No obstante, lo más probable es que el TNF- α no esté inhibiendo del todo la diferenciación en los preadipocitos, sino tan solo retrasándola. Esta especulación es con base a lo observado en las microfotografías mostradas en la **Figura 20**, donde el MCC, aparentemente, incremento el número de células por campo. Ya que los procesos de diferenciación y proliferación celular pueden ser considerados mutuamente excluyentes; es decir, cuando una célula está en proceso de diferenciación se inhibe la proliferación, y viceversa. Obedeciendo a esto, parece probable que debido a que el MCT se encuentra enriquecido con mitógenos, como factores de crecimiento o el mismo TNF- α , el proceso de diferenciación haya sido pospuesto. El uso de algún marcador molecular de proliferación, como el ki67 puede ayudar a despejar esta duda.

Asimismo, al evaluar si el MCT inducía SSB en los preadipocitos tratados de manera constante se observó que el MCT indujo un incremento significativo del IDG, para el día 14 de la diferenciación, cuando se comparó con preadipocitos tratados con el MCC, **Figura 21**. Sin embargo, no hubo cambios estadísticamente significativos con los adipocitos maduros no tratados (control) y tratados con TNF- α . Esto sugiere

que, debido a las aún altas concentraciones de TNF- α presente en el medio, el ADN del preadipocito pudo resultar dañado. Sin embargo, al ser una célula proliferante, sus mecanismos de reparación seguían en un estado funcional adecuado, permitiendo la reparación de los SSB para que al momento en que se realizó el ensayo cometa alcalino ya se encontraran parcialmente resueltos. Esta hipótesis es soportada por lo mostrado en la **Figura 20**, donde se observa que el proceso de diferenciación celular sufrió un retraso considerable en las células tratadas con MCT.

Al analizar por medio de citometría de flujo la activación de la DDR no existe un incremento estadísticamente significativo en el porcentaje de células con la DDR activa, cuando se compara contra el MCC, pero si lo hay cuando se compara con el grupo de adipocitos no tratados (Control). No obstante, es evidente que existe una clara tendencia al alta en la condición MCT. Quizás, de aumentar el tamaño de la muestra, habría una disminución en la variabilidad de los datos (MCC) que nos permitiera vislumbrar mejor el efecto. De manera sorprendente, al analizar de manera individual la fosforilación de cada uno de los elementos estudiados de la DDR, se observó que el porcentaje de células pATM⁺ y DSB=pATM⁺/ γ H2AX⁺ (doble marcaje) se incrementó de manera significativa cuando se trataron con MCT, **Figura 22**. Esto sugiere que posiblemente el inductor de daño, en este caso, no fue el TNF- α sino alguna otra molécula presente en el MCT que induce lesiones tipo DSB. De igual forma, es probable que los mecanismos de censado de lesiones en los preadipocitos varíen con respecto al de los adipocitos. Al respecto, ha sido reportado que células proliferantes como los fibroblastos al ser expuestos a células dañadas por radiación ionizante, por medio de cocultivos o medio condicionado, presentan pATM y 53BP1. La presencia de pATM, en determinados tipos celulares, funciona como un inhibidor de la diferenciación (Sokolov M. et al. 2005; Sedelnikova O. et al., 2007). Esto podría ser un mecanismo mediante el cual se previene que la inestabilidad genética en los preadipocito dañados genere células terminalmente diferenciadas con alteraciones genéticas deletéreas. Para prevenir esto, la DDR podría regular el proceso de la diferenciación mediante la activación de ATM. La activación de ATM resulta en el exporte nuclear del complejo ATM/NEMO hacia el

citoplasma, donde se une y activa a IKK α/β , llevando a la iniciación de la vía de señalización de NF- κ B. Así, dicha vía de señalización podría actuar para inhibir a PPAR γ e inhibir la diferenciación, hasta que el daño o estímulo estresor haya desaparecido (Sokolov M. et al. 2005).

De manera complementaria, ya ha sido demostrado que las células expuestas al medio de cultivo de células dañadas (células bystander) adquieren *foci* de daño en el ADN, lo que sugiere la acumulación de DSB (Sokolov M. et al. 2005). A pesar de que el ensayo cometa alcalino principalmente evidencia rompimientos de una sola cadena del ADN, también detecta DSB, aunque no se pueden diferenciar entre ellos, lo cual no excluye la posibilidad de que el daño observado este influenciado por DSB. Sin embargo, por medio del ensayo cometa neutro, si es posible evaluar de manera exclusiva rompimientos de doble cadena. Con base en esto, se puede pensar que el incremento en el IDG de células tratadas con MCT se debe a que existe alguna influencia de DSB ya que se lograron evidenciar por medio de citometría de flujo, como células con doble marcaje. De ser así, parece factible que en preadipocitos, el TNF- α también induce DSB o, en su defecto, que los DSB son producto de alguna otra molécula presente en el medio condicionado. No obstante, esta hipótesis debe ser confirmada por un método de detección de alta sensibilidad como el cometa neutro y la determinación de un panel de diversas adipocinas.

El presente trabajo es uno de los primeros en evidenciar, que el TNF- α induce la disfunción del adipocito a través de la activación sostenida de la DDR en adipocitos, provenientes de la línea celular, hAD-*MSC*. Asimismo, es claro que estos adipocitos dañados pueden interactuar con células adyacentes, a través del SASP. Esta interacción puede alterar procesos como la diferenciación y la DDR misma, sin embargo, la alteración puede variar dependiendo del estadio de diferenciación en el que se encuentren. De esta manera, en un estado fisiopatológico, este mecanismo podría estar comprometiendo el funcionamiento tisular *in vivo* y con ello, el correcto funcionamiento del organismo. Sin embargo, aún queda bastante por profundizar. Saber, de manera específica, como es que se lleva a cabo la activación de la DDR

en adipocitos y elucidar si responde de la misma forma ante distintos estímulos endógenos generadores de daño.

CONCLUSIONES

1. Una concentración de 125 ng/ml de TNF- α , por 24 horas, no afecta la viabilidad celular de adipocitos sanos provenientes de la línea celular hAD-MSC.
2. EL TNF- α incrementa la producción de ERO en adipocitos sanos provenientes de la línea celular, hAD-MSC.
3. EL TNF- α induce rompimientos de cadena sencilla (SSB) en el ADN de adipocitos sanos.
4. Los niveles de ERO se correlacionan de manera positiva con la cantidad de SSB presentes en el ADN de adipocitos expuestos al TNF- α .
5. El daño en el ADN, inducido por TNF- α , activa de manera sostenida la respuesta al daño en el ADN (DDR).
6. El TNF- α , a una concentración de 125 ng/ml, estimula fuertemente su propia expresión hasta por 24 horas, en adipocitos.
7. El secretoma de los adipocitos expuestos al TNF- α (MCT) inhibe parcialmente el proceso adipogénico, en células hAD-MSC tratadas a partir del día 7 de la diferenciación.
8. El secretoma de adipocitos pretratados con TNF- α (MCT) induce un incremento de SSB comparado con el secretoma de adipocitos no tratados (MCC); en células hAD-MSC tratadas a partir del día 7 de la diferenciación
9. El MCT favorece la activación de la DDR en células hAD-MSC tratadas a partir del día 7 de la diferenciación.

MODELO PROPUESTO

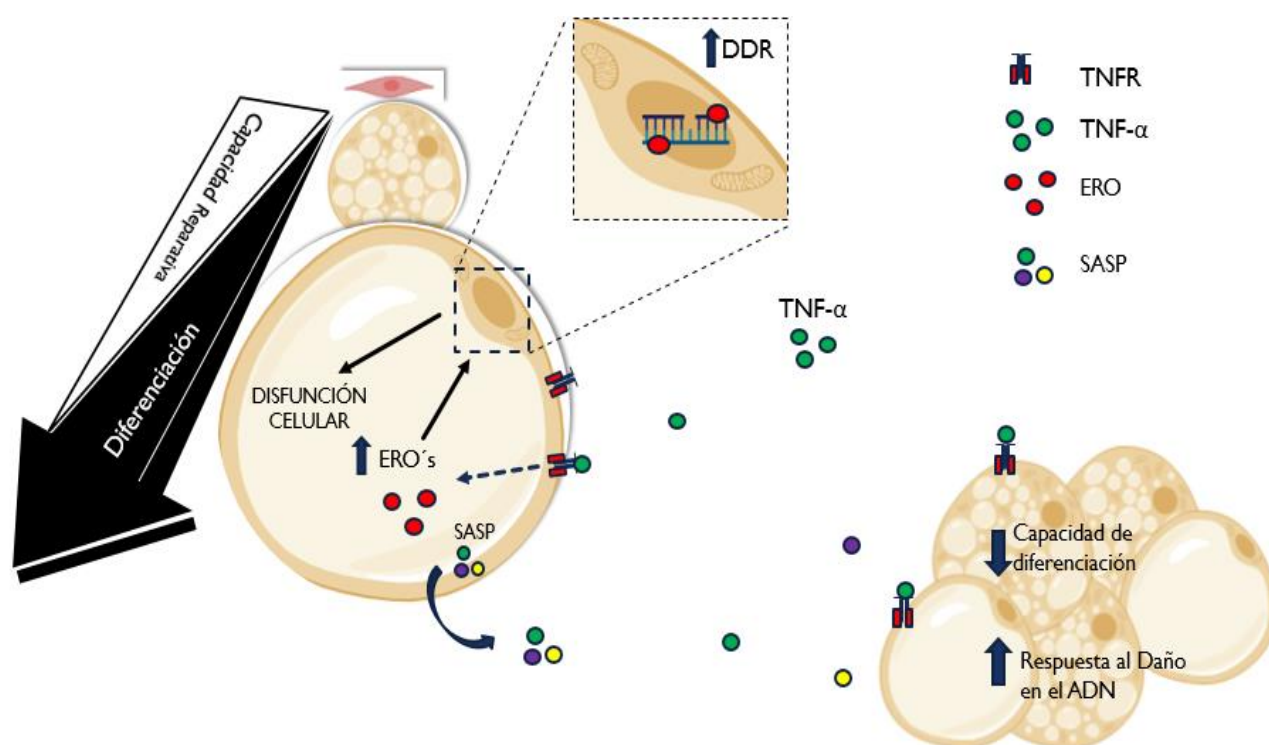


Figura 23. Modelo propuesto de disfunción del adipocito inducido por TNF- α . De acuerdo con lo reportado por nuestro grupo de trabajo en 2018, el proceso de adipogénesis *per se*, involucra una pérdida gradual de la capacidad reparativa de lesiones de una sola cadena en el ADN (SSB). De esta manera, una célula terminalmente diferenciada como lo es el adipocito; ante un estímulo proinflamatorio como el TNF- α (125 ng/ml por 24 horas) sufre un incremento en la producción de Especies Reactivas de Oxígeno (ERO), las cuales incrementan aún más la genotoxicidad de los adipocitos. Debido a la persistencia del daño, por no ser reparado, se activará una respuesta sostenida del mecanismo de respuesta al daño en el ADN (DDR). Por una parte, esta respuesta sostenida de la DDR favorecerá procesos característicos de la disfunción celular como la disfunción mitocondrial y, por otro lado, la adquisición del SASP (fenotipo secretorio asociado a la senescencia). El SASP mantendrá sostenidamente la DDR y disminuirá la capacidad de diferenciación de células vecinas.

REFERENCIAS

- 1) Aggarwal BB, Gupta SC, Kim JH. (2012): Historical perspectives on tumor necrosis factor and its superfamily: 25 years later, a golden journey. *Blood*. 2012; 119:651-65.
- 2) Ali A.T., Hochfeld W.E., Myburgh R, Pepper M.S. (2013): Adipocyte and adipogenesis. *European Journal of Cell Biology* 92. 229– 236. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejcb.2013.06.001>
- 3) Arner E, Westermark PO, Spalding KL Britton T, Rydén M, Frisén J, Bernard S, Peter Arner, (2010) Adipocyte turnover: relevance to human adipose tissue morphology. *Diabetes* 2010 Jan;59(1):105-9. doi: 10.2337/db09-0942. *Diabetes*. 2010;59: 105–9.
- 4) Bavik, C., Coleman, I., Dean, J. P., Knudsen, B., Plymate, S., and Nelson, P. S. (2006). The gene expression program of prostate fibroblast senescence modulates neoplastic epithelial cell proliferation through paracrine mechanisms. *CancerRes*.66,794–802.doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-1716
- 5) Balkwill F (2009) Tumour necrosis factor and cancer. *Nat Rev Cancer* 9: 361–371. doi: 10.1038/nrc2628
- 6) Bhogal N, Jalali F, Bristow R.G (2009): Microscopic imaging of DNA repair foci in irradiated normal tissues, *Int. J. Radiat. Biol.* 85 732–746.
- 7) Brey, C.W., Nelder, M.P., Hailemariam, T., Gaugler, R., Hashmi, S., (2009): Kruppel-like family of transcription factors: an emerging new frontier in fat biology. *Int. J.Biol. Sci.* 5 (6), 622–636. doi: 10.7150/ijbs.5.622.
- 8) Campbell PJ, Carlson MG, Nurjhan N. (1994) Fat metabolism in human obesity. *Am J Physiol*. 1994; 266: E600-E605.
- 9) Castanon N, Lasselin J, Capuron L. (2014): Neuropsychiatric Comorbidity in Obesity: Role of Inflammatory Processes. *Frontiers in Endocrinology*. Vol 5: 1664-2392. Doi 10.3389/fendo.2014.00074
- 10) Cawthorn WP, Sethi JK. (2007): TNF- α and adipocyte biology. *FEBS Lett*. 2008 January 9; 582(1): 117–131. doi: 10.1016/j.febslet.2007.11.051.
- 11) Chang E., Choon Young K. (2019): Natural Products and Obesity: A Focus on the Regulation of Mitotic Clonal Expansion during Adipogenesis. *Molecules* 2019, 24, 1157; doi:10.3390/molecules24061157
- 12) Chatterjee N., Walker G. (2017): Mechanisms of DNA Damage, Repair, and Mutagenesis. *Environ Mol Mutagen*; 58(5):235-263. doi: 10.1002/em.22087. Epub 2017 May 9.
- 13) Coppé J.P, Patil C.K, Rodier F, Sun Y, Munoz P.D, Goldstein J, Nelson P.S, Desprez P.Y, Campisi J. (2008): Senescence-associated secretory phenotypes reveal cell-nonautonomous functions of oncogenic RAS and the p53 tumor suppressor. *PLoS Biol*. 2008;6(12):2853-2868. doi: 10.1371/journal.pbio.0060301
- 14) Cotillard A, Poitou C, Torcivia A, et al. Adipocyte size threshold matters: link with risk of type 2 diabetes and improved insulin resistance after gastric bypass. *J Clin Endocrinol Metab*. 2014;99: E1466–70. 21.
- 15) Cowen S., McLaughlin S., Hobbs G, Coad J, Martin K.H, Olfert I.M, Vona Davis L. (2015) High-fat, high-calorie diet enhances mammary carcinogenesis and local

- inflammation in MMTV-PyMT mouse model of breast cancer. *Cancers* 7:1125–42. doi: 10.3390/cancers7030828 8.
- 16) Scherer G. y Scherer P. (2019): Adipogenesis and metabolic health. *NATuRe RevIeWS | MOleculaR Cell BIOLOGY*. volume 20 | APRIL 2019 | 243 <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0093-z>
 - 17) Esteve Ràfols M. (2013): Tejido adiposo: heterogeneidad celular y diversidad funcional. *Endocrinol Nutr.* ;61(2):100---112. <http://dx.doi.org/10.1016/j.endonu.2013.03.011>
 - 18) Ferranti S, Mozaffarian D. (2009): La tormenta perfecta: obesidad, disfunción del adipocito y consecuencias metabólicas. Publicado en *Clinical Chemistry*. Volumen 34 No. 2 Abril-Junio 2009. p. 95-108
 - 19) Fehsel K, Kolb-Bachofen V, and Kolb H. (1991): Analysis of TNFot-induced DNA Strand Breaks at the Single Cell Level. *AmericanJournal ofPathology*, Vol. 139, No. 2, August 1991 Copyright © American Association of Pathologists
 - 20) Forcales SV, Puri PL. (2005): Signaling to the chromatin during skeletal myogenesis: Novel targets for pharmacological modulation of gene expression. *Semin Cell Dev Biol* 16:596–611.
 - 21) Fortini P, Ferretti C, Dogliotti E. (2013): The response to DNA damage during differentiation: Pathways and consequences. *Mutat Res.* 2013 Mar-Apr;743-744:160-8. doi: 10.1016/j.mrfmmm.2013.03.004. Epub 2013 Apr 4.
 - 22) Fragoso JM, Vargas Alarcón G, Jiménez Morales S, Reyes Hernández O. y Ramírez Bello J. (2014): El factor de necrosis tumoral α (TNF- α) en las enfermedades autoinmunes (EA): biología molecular y genética. *Gaceta Médica de México*. Vol. 150:334-44
 - 23) Friedberg, E.C. (2008). A brief history of the DNA repair field. *Cell Res.* 2008 Jan;18(1):3-7. doi: 10.1038/cr.2007.113.
 - 24) Fridlyand LE, Philipson LH. (2006): Reactive species and early manifestation of insulin resistance in type 2 diabetes. *Diabetes Obes Metab.* 2006; 8: 136-45
 - 25) Furuhashi M., Saitoh S., Shimamoto K., & Miura, T. (2015). Fatty Acid-Binding Protein 4 (FABP4): Pathophysiological Insights and Potent Clinical Biomarker of Metabolic and Cardiovascular Diseases. *Clinical Medicine Insights. Cardiology*, 8(Suppl 3), 23–33. <https://doi.org/10.4137/CMC.S17067>
 - 26) Furukawa S, Fujita T, Shimabukuro M, Iwaki M, Yamada Y, Nakajima Y, Nakayama O, Makishima M, (2004): Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J Clin Invest* 2004; 114:1752– 1761
 - 27) Gooz M. ADAM-17: the enzyme that does it all. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 2010 Apr;45(2):146-69. doi: 10.3109/10409231003628015
 - 28) Gregoire, F.M., Smas, C.M., Sul, H.S., (1998). Understanding of adipocyte differentia-tion. *Physiol Rev.* 1998 Jul;78(3):783-809. doi: 10.1152/physrev.1998.78.3.783.
 - 29) Grigoras A., Amalinei C., Anca Balana R, Eliza Gius S., Roxana Avadanei E., Lozneanua L., Draga Caruntu I. (2018): Adipocytes spectrum — From homeostasia

- to obesity and its associated pathology. *Annals of Anatomy* 219 (2018) 102–120. <https://doi.org/10.1016/j.aanat.2018.06.004>
- 30) Haber, J.E. (2015). Deciphering the DNA Damage Response. *Cell* 2015 Sep 10;162(6):1183-5. doi: 10.1016/j.cell.2015.08.034.
 - 31) Hegele RA, Cao H, Frankowski C, Mathews ST & Leff T (2002): PPAR γ F388L, a transactivation-deficient mutant, in familial partial lipodystrophy. *Diabetes* 51 3586–3590. doi:10.2337/diabetes.51.12.3586
 - 32) Hernandez-Segura A, Nehme J, and Demaria M (2018): Hallmarks of Cellular Senescence. *Trends in Cell Biology*, June 2018, Vol. 28, No. 6 <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2018.02.001> © 2018 Elsevier Ltd. All rights reserved
 - 33) Hotamisligil GS. Inflammation and metabolic disorders. (2006): *Nature* ;444: 860–867 4.
 - 34) Huertas P. (2010): DNA resection in eukaryotes: deciding how to fix the break. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 17: 11–16 (2010). *Nat Struct Mol Biol.* doi: 10.1038/nsmb.1710.
 - 35) J. Alonso. (1989): La compleja Fisiología del Factor de Necrosis Tumoral. *Inmunología*. Vol 8. número 3.
 - 36) Jeanson Y, Carriere A & Casteilla L (2015): A new role for browning as a redox and stress adaptive mechanism? *Frontiers in Endocrinology* 6 158. doi:10.3389/fendo.2015.00158
 - 37) Kersten S, Desvergne B, Wahli W. (2000): Roles of PPARs in health and disease. *Nature*. 2000; 405:421–424. doi: 10.1038/35013000.
 - 38) Khalid S, Hwang D, Babichev Y, Kolli R, Altamentova S, Koren S, Goodwin P, Marguerite Ennis, Pollak M, Sonenberg N, Fantus G (2010) : Evidence for a tumor promoting effect of high-fat diet independent of insulin resistance in HER2/Neu mammary carcinogenesis. *Breast Cancer Res Treat.* 122:647–59. doi: 10.1007/s10549-009-0586-8
 - 39) Klingenspor, M., Fromme, T., Hughes, D. A., Jr, Manzke, L., Polymeropoulos, E., Riemann, T., Trzcionka, M., Hirschberg, V. and Jastroch, M. (2008): An ancient look at UCP1. *Biochim. Biophys. Acta* 1777, 637-641. doi: 10.1016/j.bbabi.2008.03.006
 - 40) Lago F, Gomez R, Gomez-Reino JJ, Dieguez C & Gualillo O (2009): Adipokines as novel modulators of lipid metabolism. *Trends in Biochemical Sciences* 34 500–510. doi: 10.1016/j.tibs.2009.06.008
 - 41) Large V., Peroni O., Letexier D., Ray H., and Beylot M. (2004): Metabolism of lipids in human white adipocyte. *Diabetes Metab*; 30(4):294-309. doi: 10.1016/s1262-3636(07)70121-0.
 - 42) Larrea A.A, Lujan S A, Kunkel T. A., (2010): SnapShot: DNA mismatch repair, *Cell* 141 Cell. 2010 May 14;141(4): 730.e1. doi: 10.1016/j.cell.2010.05.002.
 - 43) Lefterova, M.I., Lazar, M.A., (2009): New developments in adipogenesis. *Trends Endocrinol. Metab.* 20 (3), 107–114. doi: 10.1016/j.tem.2008.11.005.
 - 44) Lindahl T. (1974): An N-glycosidase from *Escherichia coli* that releases free uracil from DNA containing deaminated cytosine residues. *Proc Natl Acad Sci.* 71: 3649–3653. doi: 10.1073/pnas.71.9.3649

- 45) Liping L. and Meilian L. (2016): Adipose tissue in control of metabolism. <http://joe.endocrinology-journals.org> © 2016 Society for Endocrinology. doi: 10.1530/JOE-16-0211
- 46) Iyama T, Wilson DM 3rd. (2013): DNA repair mechanisms in dividing and non-dividing cells. *DNA Repair (Amst)*. 2013 Aug;12(8):620-36. doi: 10.1016/j.dnarep.2013.04.015.
- 47) Malaquin N, Carrier-Leclerc A, Dessureault M and Rodier F (2015) DDR-mediated crosstalk between DNA-damaged cells and their microenvironment. *Front. Genet*. 6:94. doi: 10.3389/fgene.2015.00094
- 48) Meulle A, Salles B, Daviaud D, Valet P, C. Muller. (2008): Positive regulation of DNA double strand break repair activity during differentiation of long-life span cells: the example of adipogenesis, *PLoS ONE* 3 e3345
- 49) Minamino T, Orimo M, Shimizu I, Yokoyama M, Ito T, Nojima A, Nabetani A, Oike Y, Matsubara H, Ishikawa F, Komuro I. (2009): A crucial role for adipose tissue p53 in the regulation of insulin resistance. *Nat Med* 200915:1082–1087 doi: 10.1038/nm.2014.
- 50) Minori Tamai, Tsuyoshi Shimada, Nobuhiko Hiramatsu, Kunihiro Hayakawa, Maro Okamura, Yasuhiro Tagawa, Shuhei Takahashi, Shotaro Nakajima, Jian Yao and Masanori Kitamura. (2010): Selective deletion of adipocytes, but not preadipocytes, by TNF- α through C/EBP- and PPAR γ -mediated suppression of NF- κ B. Volume 90 September 2010. *Laboratory Investigation* 90, 1385–1395 & 2010 USCAP, Inc All rights reserved 0023-6837/10
- 51) Morandel S, B. Yaffe M. (2012): Chapter 11 - Exploiting Synthetic Lethal Interactions Between DNA Damage Signaling, Checkpoint Control, and p53 for Targeted Cancer Therapy. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*. Volume 110, Pages 289-314 <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-387665-2.00011-0>
- 52) Nagasawa, H., and Little, J. B. (1992). Induction of sister chromatid exchanges by extremely low doses of alpha-particles. *Cancer Res.* 52, 6394–6396.
- 53) Nakamura A J, Rao V A, Pommier Y, Bonner W M. (2010): The complexity of phosphorylated H2AX foci formation and DNA repair assembly at DNA double-strand breaks, *Cell Cycle* 9 389–397.
- 54) Nanami M, Ookawara T, Otaki Y, Ito K, Moriguchi R, Miyagawa K, Hasuike Y, Izumi M, Eguchi H, Suzuki K, Nakanishi T (2005): Tumor necrosis factor- α -induced iron sequestration and oxidative stress in human endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; 25:2495-2501.
- 55) Narciso, L., Fortini, P., Pajalunga, D., Franchitto, A., Liu, P., Degan, P., Frechet, M., Demple, B., Crescenzi, M., & Dogliotti, E. (2007): Terminally differentiated muscle cells are defective in base excision DNA repair and hypersensitive to oxygen injury. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(43), 17010–17015. <https://doi.org/10.1073/pnas.0701743104>
- 56) Mariappan N, Carrie M. E. Fink B, and Joseph F. (2008): TNF-induced mitochondrial damage: a link between mitochondrial complex I activity and left

- ventricular dysfunction. *Free Radic Biol Med.* 2009 Feb 15; 46(4): 462–470. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2008.10.049
- 57) Klötting N. y Blüher M. (2014): Adipocyte dysfunction, inflammation and metabolic síndrome. *Rev Endocr Metab Disord* 15:277–287 DOI 10.1007/s11154-014-9301-0
- 58) Ntambi J. M, Young-Cheul K. (2000): Adipocyte Differentiation and Gene Expression. 0022-3166/00 \$3.00 © 2000 American Society for Nutritional Sciences. doi: 10.1093/jn/130.12.3122S
- 59) Parameswaran N, Patial S. (2010): Tumor necrosis factor- α signaling in macrophages. *Crit Rev Eukaryo Gene Expr.*;20:87-103. doi: 10.1615/critreveukargeneexpr.v20.i2.10
- 60) Park A., Kim W.K., Bae K.H., (2014): Distinction of white, beige and brown adipocytes derived from mesenchymal stem cells. *World. J. Stem. Cells* 6, 33–42. doi: 10.4252/wjsc. v6.i1.33.
- 61) Puzio-Kuter A. (2011): The Role of p53 in Metabolic Regulation. *Genes & Cancer* 2(4) 385 –391. DOI: 10.1177/1947601911409738
- 62) Rigamonti, A., Brennand, K., Lau, F., Cowan, C.A. (2011): Rapid cellular turnover in adipose tissue. *PLoS One* 2011 Mar 2;6(3): e17637. doi: 10.1371/journal.pone.0017637.
- 63) Rosen E.D, Hsu C.H, Wang X, Sakai S, Freeman M.W, Gonzalez FJ, Spiegelman BM (2002). C/EBP alpha induces adipogenesis through PPAR gamma: a unified pathway. *Genes Dev.* 2002; 16: 22-26. doi: 10.1101/gad.948702.
- 64) Sabbir Siddiqui M, François M, Fenech M , Wayne R L (2015): Persistent gH2AX: A promising molecular marker of DNA damage and aging. *Mutat Res Rev Mutat Res* Oct-Dec 2015; 766:1-19 doi: 10.1016/j.mrrev.2015.07.001.
- 65) Salans LB, Knittle JL, Hirsch J. The role of adipose cell size and adipose tissue insulin sensitivity in the carbohydrate intolerance of human obesity. *J Clin Invest.* 1968; 47:153–65. 22. *Stern J Clin Endocrinol Metab* 2014 Aug;99(8): E1466-70. doi: 10.1210/jc.2014-1074. Epub 2014 Apr 29
- 66) Scherer P.E (2006): Adipose tissue: from lipid storage compartment to endocrine organ. *Diabetes* 55 1537–1545. doi:10.2337/db06-0263
- 67) Sedelnikova, O. A., Nakamura, A., Kovalchuk, O., Koturbash, I., Mitchell, S. A., Marino, S.A., et al. (2007). DNA double-strand breaks form in bystander cells after microbeam irradiation of three-dimensional human tissue models. *Cancer Res.* 67, 4295–4302. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-4442
- 68) Simonatto M, Latella L, Puri P.L. (2007): Damage and Cellular Differentiation: More Questions Than Responses. *J Cell Physiol.* 2007 Dec;213(3):642-8. doi: 10.1002/jcp.21275.
- 69) Sokolov, M. V., Smilenov, L. B., Hall, E. J., Panyutin, I. G., Bonner, W. M., and Sedelnikova, O. A. (2005). Ionizing radiation induces DNA double-strand breaks in bystander primary human fibroblasts. *Oncogene* 24, 7257–7265. doi: 10.1038/sj.onc.1208886

- 70) Srivastava N, Gochhait S, de Boer P, Bamezai RN. (2009): Role of H2AX in DNA damage response and human cancers. *Mutation Research* 681 180–188. doi: 10.1016/j.mrrev.2008.08.003
- 71) Tan CY & Vidal-Puig A. (2008) Adipose tissue expandability: the metabolic problems of obesity may arise from the inability to become more obese. *Biochemical Society Transactions* 36 935–940. doi:10.1042/ BST0360935
- 72) Tubbs A, Nussenzweig A. (2017): Endogenous DNA Damage as a Source of Genomic Instability in Cancer. *Cell* 168 144-156 <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2017.01.002>
- 73) Turner P.A, Garrett M.R, Didion S.P, Janorkar A.V. (2018): Spheroid Culture System Confers Differentiated Transcriptome Profile and Functional Advantage to 3T3-L1 Adipocytes. *Annals of Biomedical Engineering*, Vol. 46, No. 5, May 2018 (2018) pp. 772–787 <https://doi.org/10.1007/s10439-018-1993-y>
- 74) Turner P, Tang Y, J. Weiss S, and Janorkar A, (2015): Three-Dimensional Spheroid Cell Model of In Vitro Adipocyte Inflammation. *TISSUE ENGINEERING: Part A* Volume 21, Numbers 11 and 12, 2015 ^a Mary Ann Liebert, Inc. doi: 10.1089/ten.tea.2014.0531
- 75) Turner J, Crossley M. (1999): Mammalian Krüppel-like transcription factors: more than just a pretty finger. *Trends Biochem. Sci.* 1999; 24:236–240. doi: 10.1016/s0968-0004(99)01406-1.
- 76) Tšuiiko O., Jatsenko T., Parameswaran L K G, Kurg A, Vermeesch J R, Lanner F, Altmäe S, Salumets A (2018): A Speculative Outlook on Embryonic Aneuploidy: Can Molecular Pathways Be Involved?. 2019 Mar 1; 447(1):3-13. doi: 10.1016/j.ydbio.2018.01.014. Epub 2018 Jan 31.
- 77) Valverde M., Lozano-Salgado J, Fortini P., Rodriguez-Sastre MA, Rojas E, y Dogliotti E. (2018): Hydrogen Peroxide-Induced DNA Damage and Repair through the Differentiation of Human Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells International* Volume 2018, Article ID 1615497, 10 pages <https://doi.org/10.1155/2018/1615497>
- 78) Vergoni B, Cornejo PJ, Gilleron J, et al. (2016): DNA Damage and the Activation of the p53 Pathway Mediate Alterations in Metabolic and Secretory Functions of Adipocytes. *Diabetes*. 2016;65(10):3062-3074. doi:10.2337/db16-0014
- 79) Wang H., Wang M, Bocker W, Iliakis G. (2005): Complex H2AX phosphorylation patterns by multiple kinases including ATM y DNA-PK in human cells exposed to ionizing radiation and treated with kinase inhibitors, *H. Cell Physiol.* 202 492-502
- 80) Włodarczyk, M.; Jablonowska-Lietz, B.; Olejarz, W.; Nowicka, G. (2018): Anthropometric and dietary factors as predictors of DNA damage in obese women. *Nutrients*. 2018 May 8;10(5):578. doi: 10.3390/nu10050578
- 81) Xu B., Wang W., Guo H., Sun Z, Wei Z, Zhang X., et al., (2014): Oxidative stress preferentially induces a subtype of micronuclei and mediates the genomic instability caused by p53 dysfunction, *Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen.* 770 (2014) 1–8.
- 82) Xu H, Sethi JK, Hotamisligil GS. Transmembrane tumor necrosis factor (TNF)- α inhibits adipocyte differentiation by selectively activating TNF receptor 1. *J Biol Chem* 1999; 274:26287–26295.

- 83) Y Wu, B. P. Zhou.(2010): TNF- α /NF- κ B/Snail pathway in cancer cell migration and invasion. *British Journal of Cancer* volumen 102, pages 639–644 doi: 10.1038/sj.bjc.6605530.
- 84) Yeh W.C., Cao Z., Classon M., McKnight S.L. (1995): Cascade regulation of terminal adipocyte differentiation by three members of the C/EBP family of leucine zipper proteins. *Genes Dev.* 1995; 9:161–181. doi: 10.1101/gad.9.2.168.
- 85) Zuk, P. A.; Zhu, M.; Ashjian, P.; De Ugarte, D. A.; Huang, J. I.; Mizuno, H.; Alfonso, Z. C.; Fraser, J. K.; Benhaim, P.; Hedrick, M. H. (2002): Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol. Biol. Cell* 13(12):4279–4295.