



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

INSTITUTO NACIONAL DE MEDICINA GENÓMICA

LABORATORIO DE EPIGENÉTICA

T E S I S

“Regulación de la adipogénesis en los preadipocitos
3T3-L1 por el Inhibidor tisular de metaloproteasas 4
(Timp-4)”

Que para obtener el título de

BIÓLOGA

Presenta:

Reus Chavarría Erika

Directora:

Dra. Floria Josefina Lizárraga Sánchez

Asesor Interno:

Dr. Edelmiro Santiago Osorio



CDMX 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

El presente trabajo fue elaborado en el Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN) en el laboratorio de Epigenética, bajo la tutoría de la Dra. Floria J. Lizarraga Sánchez, y el asesoramiento del Dr. Edelmiro Santiago Osorio, jefe de la División de Estudios de Posgrado e Investigación de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México, que a lo largo de mi vida ha sido un segundo hogar.

A Dios, que en silencio me has acompañado a lo largo de mi vida.

Principalmente y como más importante agradezco a mi asesora de Tesis, la **Dra. Floria J. Lizarraga Sánchez**, por su sabiduría, conocimientos y sus orientaciones, su manera de trabajar y su paciencia, han sido fundamentales para mi formación porque sin su apoyo incondicional no sería posible la realización de esta Tesis.

Al **Dr. Edelmiro Santiago Osorio** por aceptar ser mi asesor interno, gracias por su paciencia y su motivación; sobre todo por su confianza y apoyo moral.

Al **Dr. Jorge Melendez Zajgla**, a la **Dra. Vilma Maldonado Lagunas** por abrirme las puertas de sus laboratorios y hacerme sentir parte de su equipo de investigación, a la **Dra. Magali Espinosa Castilla** y a la **Dra. Gisela Ceballos Cancino** por su orientación y consejos durante mi estancia en INMEGEN.

A la **Biol. Yolanda Cortes Altamirano** por haber sembrado en mí la vocación de Bióloga, por animarme a salir adelante en los momentos de desesperación y ser cada día mejor en todos los aspectos.

A mis sinodales la **Dra. Martha Legorreta Herrera, M. en C. José Misael Vicente Hernández Vázquez** y la **M. en C. Yolanda Córdova Galaviz**, por sus consejos y observaciones que complementaron mi trabajo.

A mis padres **Zenaida Chavarría** y **Julio Reus**, a mis hermanas **Alejandra Reus** y **Julieta Reus**, por ser los pilares de mi vida, darme las fuerzas y guiarme con sus principios y valores, sabiendo que jamás existirá una forma de agradecerles una vida de lucha, sacrificio y esfuerzo constante, solo deseo que comprendan que el logro no es mío, es suyo, que mi esfuerzo es inspirado en ustedes y que son mi único ideal con respeto y admiración.

A mis amigos y compañeros de la FES, L4 e INMEGEN que me acompañaron en todos los momentos buenos y malos, han dejado una huella en mi vida al compartir instantes únicos y especiales.

A mi mejor amigo **Leonardo** eres el hermano que no tuve, no tengo idea de cómo habría salido adelante cada vez que la vida me daba sorpresas desagradables, porque madurar, habría sido más doloroso sin tu ayuda. No importaba cuan complicado fuera el problema, jamás te apartaste de mi lado. Hoy no sé cómo podría agradecerte. Admiro cada rasgo de tu personalidad, la manera en que me motivas a mirar siempre adelante y la forma que tienes, para hacer que deje atrás cualquiera de mis temores. Nunca quisiera perder tu amistad, ni aunque pasen cien años. Gracias por estar ahí sin fallar ni una sola vez.

“La ciencia y la vida ni pueden ni deben estar separadas. Para mí la ciencia da una explicación parcial de la vida. Tal como es, se basa en los hechos, la experiencia y los experimentos...

Estoy de acuerdo en que la fe es fundamental para tener éxito en la vida, pero no acepto tu definición de fe, la creencia de que hay vida tras la muerte.

En mi opinión, lo único que necesita la fe es el convencimiento de que esforzándonos en hacer lo mejor que podemos nos acercaremos al éxito, y que el éxito de nuestros propósitos, la mejora de la humanidad de hoy y del futuro, merece la pena conseguirse”

-Rosalind Elsie Franklin 1940



**Regulación de la adipogénesis en los preadipocitos
3T3-L1 por el Inhibidor tisular de metaloproteasas 4
(Timp-4)**

ÍNDICE

1. ABREVIATURAS	1
2. RESUMEN	4
3. MARCO TEORICO	5
3.1 Obesidad	5
3.2 Tejidos adiposo blanco y Tejido adiposo marrón	6
3.3 Adipogénesis	8
3.4 PPAR γ	9
3.5 CEBPs	10
3.6 PREF-1	11
3.7 MMPs	13
3.8 TIMP	14
3.9 ARN de interferencia (ARNi)	17
4. JUSTIFICACIÓN	19
5. HIPÓTESIS	19
6. OBJETIVOS	19
6.1 Objetivo General	19
6.2 Objetivos Particulares	20
7. MATERIAL Y MÉTODOS	20
7.1 Material biológico y condiciones de cultivo celular	20
7.2 Diferenciación celular	20

7.3 Transfección de siRNA	21
7.4 Tratamiento con rhTIMP-4	22
7.5 Extracción de ARNm	22
7.6 Síntesis del ADN complementario (ADNc)	23
7.8 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	24
7.9 Análisis de proteínas por medio de Western Blot	24
8. RESULTADOS	26
8.1 Expresión del RNAm de Timp-4 durante la adipogénesis	26
8.2 Inhibición del RNAm de Timp-4, evaluación de genes adipocíticos	32
8.3 Evaluación de los niveles de expresión de genes tempranos en adipogenesis: C/ebp β y C/ebp δ	38
8.4 Inhibición de Timp-4 con exposición de TIMP-4 recombinante humano en medio de inducción a diferenciación	40
9. DISCUSIÓN	43
10. CONCLUSIÓN	45
11. PERSPECTIVAS	45
12. REFERENCIAS	46

1. ABREVIATURAS

ATCC	American Type Culture Collection
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
BAT	Tejido adiposo marrón (Brown Adipose Tissue)
<i>bZIP</i>	Basic Leucine Zipper Domain (Leucina cremallera de dominio básico)
C/EBP α	CAAT/Proteína potenciadora de unión alfa (CAAT/enhancer-binding Proteins alfa)
C/EBP β	CAAT/Proteína potenciadora de unión beta (CAAT/enhancer-binding Proteins beta)
C/EBP δ	CAAT/Proteína potenciadora de unión delta (CAAT/enhancer-binding Proteins delta)
dNTP	Nucleósido Trifosfato
dsRNA	Ácido ribonucleico de doble cadena (Double-stranded RNA)
ECM	Expansión Clonal Mitótica
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EGF	Factor de crecimiento epidérmico (Epidermal Growth Factor)
FAK	Cinasa de adhesión focal (Focal Adhesion Kinase)
GMPc	Guanosín monofosfato cíclico (Glycogen synthase kinase 3)
GS3K	Glucógeno sintasa cinasa 3
HPRT	Hipoxantina guanina fosforribosiltransferasa
MAPK	Proteína cinasa activadas por mitógenos (Mitogen-activated protein kinases)

MMP	Metaloproteasas de Matriz Extracelular (Matrix metalloproteinases)
NF-κB	Factor Nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B (Nuclear Factor κB)
ng	Nanogramo
IBMX	3-metil-isobutil-xantina
IMC	Índice de masa corporal
PBS	Solución Amortiguadora de Fosfato
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PFA	Paraformaldehído
<i>PI3K</i>	Phosphatidylinositol kinase 3 (Fosfatidilinositol cinasa 3)
PPARγ	Receptor activador de proliferación de peroxisomas gamma (Peroxisome Proliferator Activated Receptor gamma)
PREF-1	Factor Preadipocito 1 (Preadipocyte Factor 1)
OCDE	Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos
OMS	Organización Mundial de la Salud
RNAsas	Ribonucleasa del ARN
shRNA	<i>small hairpin</i> RNA (horquilla pequeña de ARN)
siRNA	small interfering RNA (interferente pequeño de ARN)
siRISC	RNA-induced silencing complex (complejo de silenciamiento inducido de ARN)
SFB	Suero Fetal Bovino
TIMP	Tissue inhibitors of metalloproteinases (Familia de Inhibidores Tisulares de Metaloproteasas)
TIMP-1	Inhibidor Tisular de Metaloproteasas 1 (<i>Homo sapiens</i>)
Timp-1	Inhibidor Tisular de Metaloproteasas 1 (<i>Mus musculus</i>)

TIMP-2	Inhibidor Tisular de Metaloproteasas 2 (<i>Homo sapiens</i>)
Timp-2	Inhibidor Tisular de Metaloproteasas 2 (<i>Mus musculus</i>)
TIMP-3	Inhibidor Tisular de Metaloproteasas 2 (<i>Homo sapiens</i>)
Timp-3	Inhibidor Tisular de Metaloproteasas 3 (<i>Mus musculus</i>)
TIMP-4	Inhibidor Tisular de Metaloproteasas 4 (<i>Homo sapiens</i>)
Timp-4	Inhibidor Tisular de Metaloproteasas 4 (<i>Mus musculus</i>)
Taq	Polimerasa Termoestable (<i>Thermus aquaticus</i>)
WAT	Tejido adiposo blanco (White Adipose Tissue)
μL	microlitros

2. RESUMEN

Los adipocitos desempeñan un papel crítico en la regulación del metabolismo de lípidos y el equilibrio de energía. La diferenciación de los adipocitos es un proceso complejo, regulado por varios factores de transcripción y genes relacionados con la adipogénesis.

Los inhibidores de las metaloproteasas (TIMP), son una familia de proteínas de cuatro miembros (TIMP-1 a TIMP-4) que regulan selectivamente a las metaloproteasas de matriz extracelular (MMP). Hasta el día de hoy, se conocen diferentes procesos biológicos que son regulados por los miembros de la familia de los TIMP.

TIMP-4 es el miembro de la familia más recientemente descrito, se expresa principalmente en el tejido adiposo, con niveles detectables también en el cerebro y el corazón. Además de su alta expresión en tejido graso, su papel en este tejido es desconocido. Con el fin de estudiar el papel de TIMP-4 durante la adipogénesis se emplearon las células 3T3-L1 (fibroblastos/preadipocitos). En este trabajo se encontró que durante el proceso de diferenciación terminal de los adipocitos se presenta un aumento en la expresión de Timp-4, en conjunto con la expresión de factores de transcripción claves como C/EBP β (CAAT/enhancer-binding Proteins) y PPAR γ (Peroxisome proliferator-activated receptor gamma).

La modulación de la expresión de TIMP4 por medio de siRNAs específicos mostró que actúa como un regulador negativo de la diferenciación terminal. Inesperadamente, las células 3T3-L1 se diferenciaron más rápido en adipocitos maduros en presencia de TIMP-4 recombinante humano.

3. MARCO TEÓRICO

3.1 Obesidad

La obesidad es una enfermedad sistémica, crónica y multicausal que se manifiesta por la acumulación excesiva de grasa corporal. El exceso de peso corporal es un proceso gradual que suele iniciarse en la infancia y la adolescencia, a partir de un desequilibrio entre la ingesta y el gasto energético. En su origen, se involucran factores genéticos y ambientales que determinan un trastorno metabólico que conduce a la acumulación de grasa corporal más allá del valor esperado según el género, la talla y la edad [1].

La manifestación de obesidad en un individuo se asocia con una serie de enfermedades como; hipertensión arterial, enfermedad coronaria, apnea del sueño, enfermedad vascular cerebral, la osteoartritis y algunos cánceres (como los de mama, esófago, colon, endometrio y riñón) [2].

El índice de masa corporal (IMC) es un indicador simple de la relación entre el peso y la talla, se utiliza frecuentemente para identificar el sobrepeso y la obesidad en los adultos. Se calcula dividiendo el peso de una persona en kilos por el cuadrado de su talla en metros (kg/m^2). La Organización Mundial de la Salud define al IMC de la siguiente manera: Un IMC igual o superior a 25 determina sobrepeso, mientras que un IMC igual o superior a 30 determina obesidad.

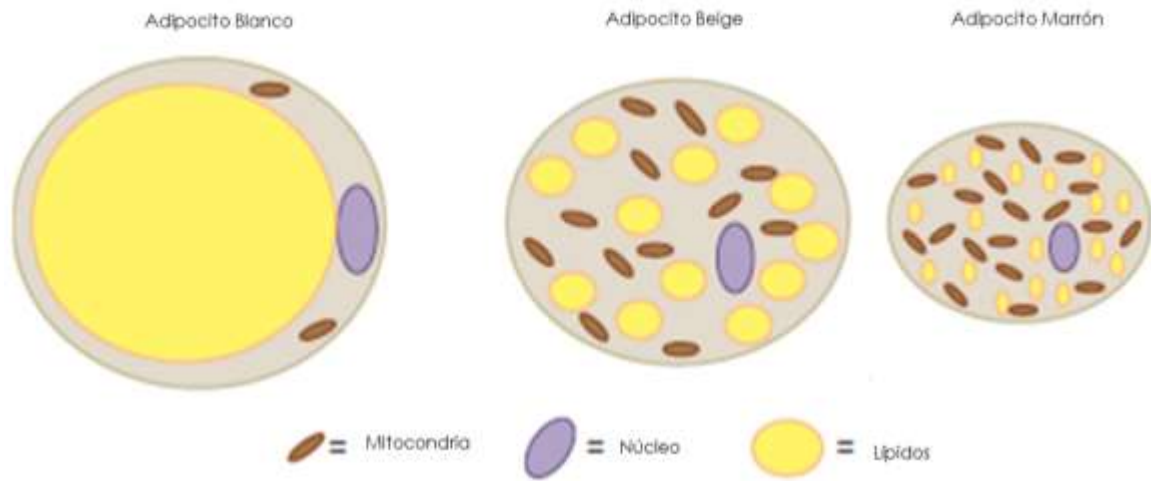
Desde 1980, el diagnóstico de la obesidad se ha incrementado en todo el mundo. En 2014, más de 1900 millones de adultos de 18 o más años tenían sobrepeso, de los cuales, más de 600 millones eran obesos. En 2014, el 39% de las personas adultas de 18 o más años tenían sobrepeso, y el 13% eran obesas [34]. Respecto a su magnitud, la OMS calcula que para este año 2015 habrá aproximadamente 2 millones 300 mil adultos con sobrepeso, más de 700 millones con obesidad y más de 42 millones de menores de cinco años con sobrepeso. La OMS denomina a la obesidad como “la epidemia del siglo XXI” [3].

3.2 Tejidos adiposo blanco y Tejido adiposo marrón

La obesidad es también descrita como la acumulación de tejido adiposo blanco, lo que resulta en el aumento del tamaño celular de los adipocitos (hipertrofia) y la adición sustancial de células indiferenciadas a partir de precursores (hiperplasia) [4]. En el ser humano existen dos tipos esenciales de tejido adiposo; el tejido marrón o BAT (*brown adipose tissue*) el cual es el depósito de grasa en neonatos y en la región supraclavicular y es el principal responsable de la termogénesis [5]. El tejido adiposo blanco o WAT (*white adipose tissue*) es el tipo de grasa predominante en un adulto. Este tejido es prácticamente un órgano endocrino especial que no sólo juega un papel activo y central en la regulación de la energía del organismo, sino que también es parte importante en procedimientos fisiológicos y patológicos [6] (Figura 1).

En un estado de obesidad, el tejido adiposo se expande debido a un aumento del número y tamaño de los adipocitos, lo que induce la desregulación de la concentración de glucosa y el metabolismo lipídico. Como resultado, el aumento de tejido adiposo altera el balance de energía de todo el cuerpo y aumenta el riesgo de resistencia a la insulina. Por lo tanto, la comprensión de la adipogénesis y diferenciación de preadipocitos podría proporcionar información valiosa para el diseño de estrategias terapéuticas integrales y eficaces contra la obesidad [7].

La diferenciación de los preadipocitos marrones y blancos en las células adiposas maduras emplea una vía transcripcional similar de factores nucleares que regulan la producción de las proteínas y procesos que son comunes a ambos tipos de células, incluyendo la lipogénesis y el transporte de glucosa dependiente de insulina [5]. La cascada de factores adipogénicos que regulan la adipogénesis tanto en las células blancas y marrones se describe a continuación.



1. Figura 1. Los adipocitos blancos y marrones derivan de diferentes precursores y tienen distintas características morfológicas. Un adipocito marrón contiene múltiples gotas lipídicas y son ricos en mitocondrias, en comparación con el adipocito blanco. (Esquema modificado de Sarjeant K. y Stephens J. (2014) [8].)

3.3 Adipogénesis

La adipogénesis puede describirse en dos estados: el primer estado implica la generación de precursores de adipocitos derivados de células madre mesenquimales. El segundo estado, compromete y lleva a los preadipocitos a una diferenciación en adipocitos maduros funcionales [9].

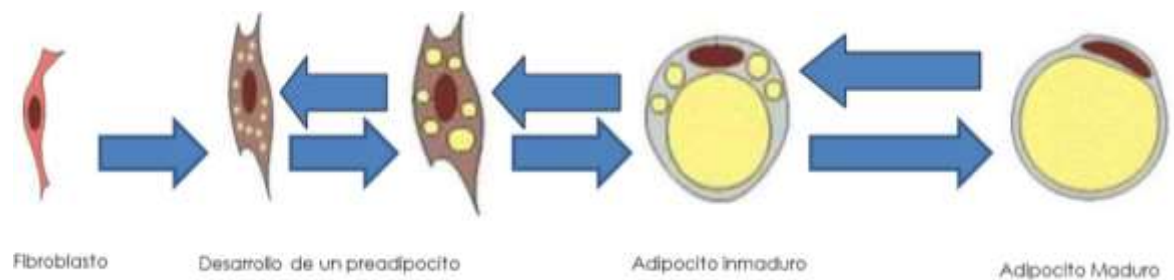


Figura 2. Diferenciación de un Adipocito. Las flechas indican la capacidad de contraerse; es decir, desdiferenciación, cuando el suministro de energía disminuye (Representación tomada y modificada de Tariq A., *et al.* (2011)[9].

Para que se inicie la adipogénesis se necesita de una etapa proliferativa, seguida la detención del ciclo celular y una diferenciación de los preadipocitos cultivados en confluencia [47]. De esta manera se induce detención del ciclo por el contacto célula a célula y cuando se expone a un coctel hormonal, las células vuelven a tomar el ciclo celular ejecutando la expansión clonal mitótica (ECM) [10].

La diferenciación de adipocitos es un proceso complejo en el cual los preadipocitos deben dejar de proliferar antes de la conversión terminal. Esta diferenciación implica cambios cronológicos en la expresión de numerosos genes. Los principales genes identificados como reguladores del proceso adipogénico pertenecen a dos familias de factores de transcripción: C/EBP, PPAR γ [11].

3.4 PPAR γ

El receptor activado por el proliferador de peroxisomas gamma PPAR γ (por sus siglas en inglés), Peroxisome proliferator-activated receptor gamma, ha sido foco de intensa investigación por sus ligandos. Este receptor ha surgido como un potente sensibilizador de insulina utilizado en el tratamiento de la diabetes tipo 2. Se han descrito tres isotipos llamados PPAR α , δ y γ que controlan la expresión de genes que juegan papeles clave en el almacenamiento y la movilización de los lípidos, en el metabolismo de la glucosa, en la morfogénesis y la respuesta inflamatoria. Los avances recientes incluyen el descubrimiento de nuevos genes que son regulados por PPAR que ayuda a explicar cómo la activación de este factor de transcripción predominante de los adipocitos regula la homeostasis de la glucosa y de los lípidos [8].

PPAR γ es un factor transcripcional altamente enriquecido en el tejido adiposo y se ha demostrado que juega un papel central en la activación del proceso de adipogénesis. La expresión de PPAR γ es elevada en la diferenciación temprana de los preadipocitos a adipocitos. Además la activación de la expresión de PPAR γ en fibroblastos promueve su conversión en adipocitos llenos de lípidos e induce un programa de expresión adipogénico [12].

3.5 CEBPs

La familia de C/EBPs comprende a seis factores de transcripción que poseen un dominio bZIP altamente conservado que sirve como un punto de interacción para la homodimerización o heterodimerización con otros miembros de la familia [13]. La nomenclatura más común para los miembros es C/EBP α , β , δ , γ , ϵ , y ζ . Los experimentos *in vivo* e *in vitro* han demostrado que C/EBP α , β , δ promueven la diferenciación de los adipocitos. McKnight y sus colaboradores presentaron el primer conjunto de datos que muestra la inducción de expresión de estos miembros de la familia durante la adipogénesis. C/EBP β se induce principalmente por metil-isobutil-xantina, y C/EBP δ por su parte es altamente inducida por dexametasona en las primeras etapas de la adipogénesis. C/EBP β y C/EBP δ trabajan en conjunto para la inducción de la expresión de C/EBP α [14, 48].

La inducción rápida adipogénica induce a la expresión de C/EBP β y C/EBP δ . Estos son reguladores tempranos clave de la adipogénesis junto con el factor antiadipogénico PREF-1 (preadipocyte factor 1) [15].

3.6 PREF-1

PREF-1 es una proteína transmembranal de 385 aminoácidos que contiene un dominio extracelular con 6 repeticiones del factor de crecimiento epidérmico (EGF), una región yuxtamembrana, con un único dominio transmembranal y una cola corta citoplasmática [16]. Se ha estudiado el papel de la regulación de la expresión de PREF-1 en la diferenciación de adipocitos y se ha confirmado que a medida que la adipogénesis progresa, la expresión de este marcador disminuye [17].

La primera fase de la adipogénesis consiste en la inducción transitoria de C/EBP β y C/EBP δ , [18], los cuales comienzan a acumularse dentro de las primeras 24 horas de inducción de la adipogénesis [10].

Como se mencionó en la conversión de G1 a la fase S, C/EBP β se hiperfosforila y activada por las cinasas GS3K (Glycogen synthase kinase 3) y MAPK (*Mitogen-activated protein kinases*) quienes activan a CREB (cAMP response element-binding), que a su vez induce la transcripción del gen C/EBP β . Entonces, tanto C/EBP β y C/EBP δ inducen directamente la expresión de los miembros de las familias de C/EBP y PPAR γ [7].

La detención de la proliferación continúa con la expresión de genes adipogénicos finales. PPAR γ y C/EBP α posteriormente no sólo inician retroalimentación positiva para inducir su propia expresión, también activan un gran número de genes cuya expresión determina al adipocito [19].

La morfología de un preadipocito 3T3-L1 es alargada y extendida y cuando se induce la diferenciación hacia un adipocito maduro, cambia su morfología a circular [40]. Estos cambios morfológicos son el resultado de alteraciones de expresión y de organización de la matriz extracelular (MEC) y componentes del citoesqueleto. Durante la adipogénesis, la MEC cambia de una estructura fibrilar a una estructura laminar. De esta forma, los adipocitos pasan a la fase del compromiso y posteriormente a la fase del crecimiento que

se caracteriza por el almacenamiento de grandes cantidades de triglicéridos. Los adipocitos maduros invierten mucha energía en el mantenimiento de la MEC. En la fase temprana de diferenciación, la MEC tiene diferentes cambios en cuanto a composición; por ejemplo, se ha observado que se presenta variación de los niveles las colágenas del tipo I y tipo III [20].

La modificación de los componentes de la MEC y la degradación proteolítica de la membrana basal preexistente son sucesos críticos en la diferenciación adipocítica. Estos cambios están coordinados por las metaloproteasas de matriz extracelular, las MMP [36].

3.7 MMPs

Las MMP, también llamadas colectivamente *matrixinas*, son una familia de proteasas que hidrolizan los componentes de la matriz extracelular. Estas proteasas desempeñan un papel central en muchos procesos biológicos tales como la embriogénesis, la remodelación del tejido normal, la cicatrización de heridas y la angiogénesis. Constituyen una familia de proteasas dependiente del zinc y en el hombre se conocen hasta el momento 26 MMP, con una homología entre ellas del 30 al 50%. Se han clasificado en cinco grupos de acuerdo a sus diferencias estructurales (Colagenasas, Gelatinasas, Estromalisinas, Matrilisinas, Metaloproteasas). La estructura de las MMP comprende varios dominios comunes a la mayoría de ellas tales como el dominio catalítico, el dominio propéptido y el péptido señal (Figura 3) [16].

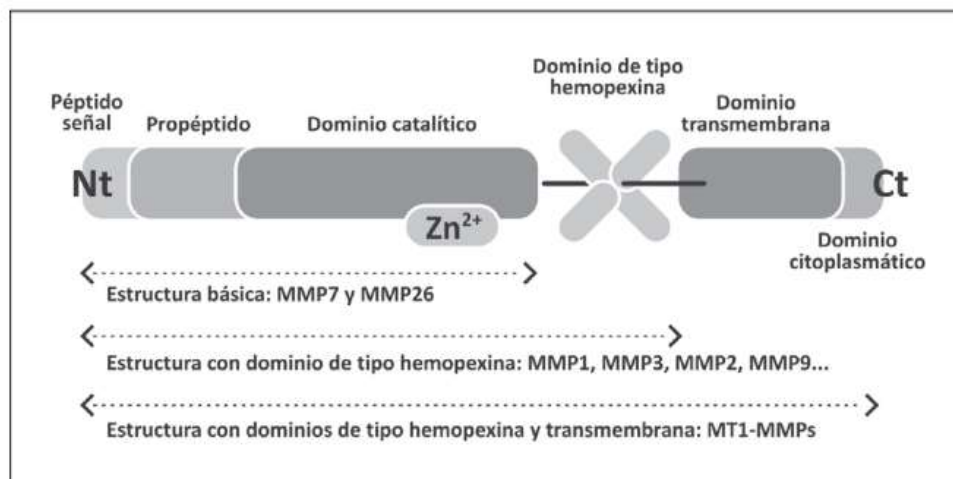


Figura 3. Estructura básica de las MMP (Cynthia M. *et al.* 1997) [16].

Las actividades de las MMP se regulan con precisión a nivel de la transcripción de: la activación de precursores de zimógenos, la interacción con componentes específicos de MEC y por su asociación con inhibidores endógenos como es la macroglobulina, los inhibidores tisulares de las metaloproteinasas, los TIMP, por sus siglas en inglés [21].

3.8 TIMP

Los TIMP son inhibidores específicos de las matrixinas y participan en el control de sus actividades locales de MMP en los tejidos. Existen cuatro miembros de la familia de los TIMP (TIMP-1, -2, -3 y -4). Las MMP se regulan durante la adipogénesis por los miembros de esta familia [37].

Los TIMP son factores pleiotrópicos que funcionan como reguladores clave de la remodelación de matriz extracelular [22]. Los TIMP no actúan con la misma efectividad frente a todas las MMP. TIMP-1 inhibe preferentemente a MMP-9; TIMP-2 sobre MMP-2, mientras que TIMP-3 inhibe miembros de la familia ADAM (desintegrin and metalloproteinase) que son otra familia de metaloproteinasas que presentan la particularidad de unirse a una molécula de desintegrina, que es un ligando potencial para las integrinas y otros receptores, son proteínas de membrana multifuncionales con una organización compleja de dominios; TIMP-4 se ha estudiado poco en comparación con los otros tres miembros del grupo pero, según Bourbulia y colaboradores; actúa inhibiendo a MMP-1 y 2 a través de la interacción con la MT1-MMP regula la activación de la pro-MMP-2 [16].

Estos inhibidores están regulados a nivel transcripcional por diversas citocinas y factores de crecimiento, lo que resulta en una expresión específica de tejido [23]. TIMP-1 se expresa en los órganos reproductivos; mientras que TIMP-2 se expresa constitutivamente en todo el cuerpo; TIMP-3 en el corazón, el riñón y el timo [24], mientras que TIMP-4 se expresa predominantemente y selectivamente en el tejido adiposo con niveles más bajos en el cerebro y el corazón. Alexander C. y colaboradores en el 2001 [39], mostraron que la sobreexpresión de Timp-1 está implicada en el proceso de adipogénesis.

D. Bauters en el 2014 mediante análisis de expresión *in silico* en varios tejidos demostró la presencia de niveles de expresión altos de TIMP-4. Previamente se ha demostrado que los niveles de Timp-4 disminuyen cuando se induce obesidad en ratones [25].

Sin embargo, no se conoce con detalle el papel de Timp-4 durante el proceso de diferenciación. Además de la notable capacidad de los TIMP para inhibir la actividad de las metaloproteasas, estos inhibidores tienen actividades biológicas independientes a su actividad inhibitoria. Por ejemplo, existen pruebas de que los miembros de la familia de TIMP pueden interactuar con moléculas de adhesión celular o receptores de factores de crecimiento y activar o regular las vías de señalización como PI-3K, FAK, ERK y NFκB, que están involucrados en los procesos celulares como la apoptosis, el crecimiento celular y la migración [26, 43].

Los modelos de adipogénesis *in vivo* e *in vitro* muestran un aumento en los niveles de ARNm de MMP y TIMP, así como una mayor actividad enzimática de MMP [26].

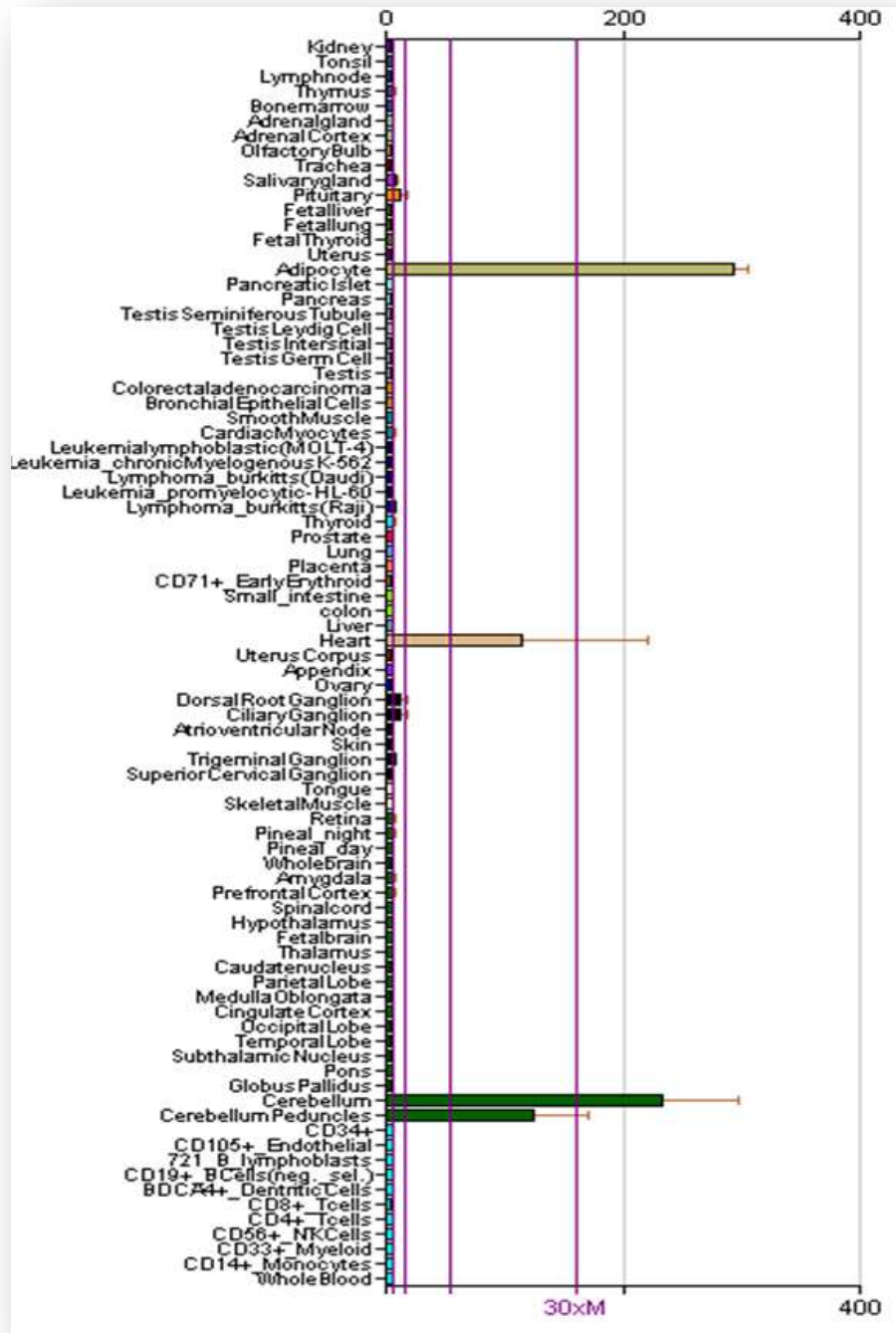


Figura 4. Expresión de TIMP-4 en diferentes tejidos; se puede observar que en tejido adiposo hay una mayor expresión de esta proteína secretada en forma soluble (Reportado en base de datos GeneAtlas <http://biogps.gnf.org>) [41].

3.9 ARN de interferencia (ARNi)

Uno de los avances más importantes en la biología de las últimas décadas ha sido el descubrimiento de moléculas de ARN que regulan la expresión de genes. La principal función que se le ha reconocido al ARN es como parte de la maquinaria de producción de proteínas. Los ARN mensajeros (ARNm) son los intermediarios en la expresión de genes, transmiten información entre el ADN y la maquinaria de síntesis de proteínas [45]. El silenciamiento por ARN es un mecanismo altamente conservado en la naturaleza en el que moléculas de ARN de doble cadena (dsRNA) regulan la expresión de genes [27].

Se han descrito varias clases de moléculas pequeñas de ARN que desencadenan el proceso de silenciamiento por interferencia. Los ARN interferentes estudiados más ampliamente son los pequeños (siRNA) y los microRNA (miRNA). Estas moléculas tienen un tamaño de 21 a 25 nucleótidos y se producen a partir de precursores de ARN de doble cadena que pueden variar de tamaño y origen (Figura 5). Estos precursores se procesan por miembros de la familia de enzimas que degradan ARN, conocidas como la familia de la RNAsa tipo III. En particular, la enzima que degrada los precursores de dsRNA hasta siRNA se conoce como Dicer. Los siRNA resultantes son incorporados a un complejo denominado siRISC (RNA-induced silencing complex). Este complejo está compuesto por numerosas proteínas. La incorporación del siRNA al siRISC está acoplada a la separación de las dos cadenas en cadenas sencillas. Sólo una de ellas es la cadena guía y se mantiene asociada al complejo ya que sirve para identificar el ARN blanco con la secuencia complementaria. Cuando las moléculas de mRNA complementarias se encuentran, la interacción entre el siARN y este ARNm induce el corte del ARNm y su posterior degradación [28].

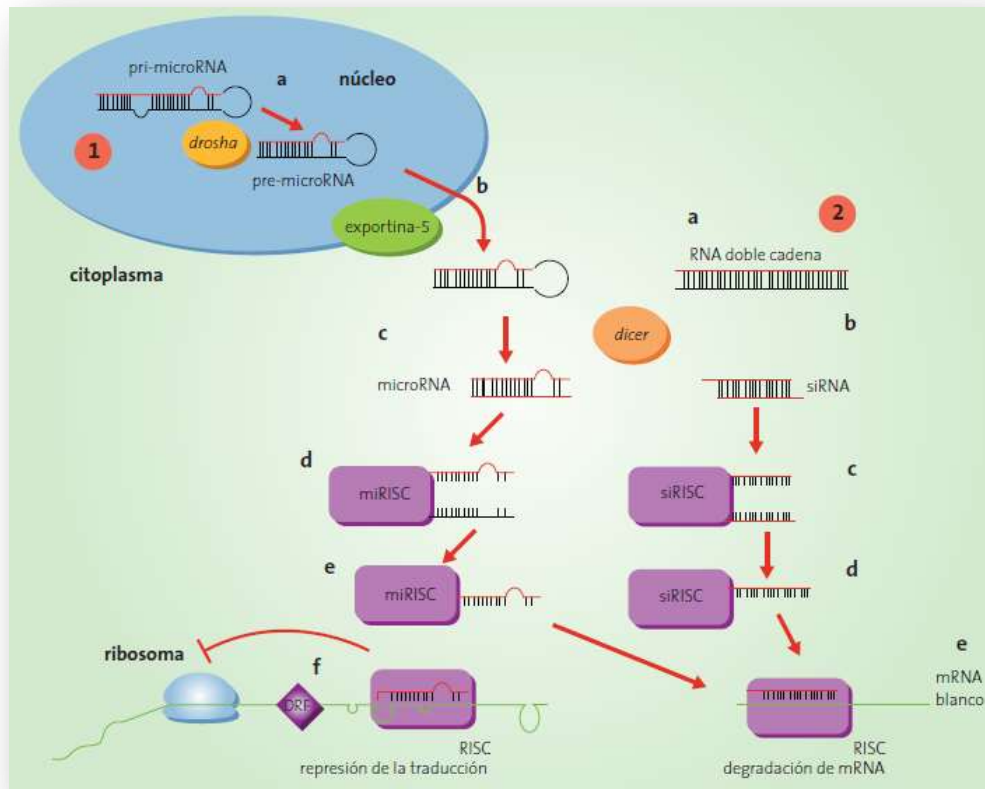


Figura 5. Vía del ARN de interferencia. Las dos vías de procesamiento se indican con los números 1 y 2. Los pasos de cada vía se señalan con letras. 1. Biogénesis de microRNA: a) procesamiento por *drosha* en el núcleo, b) exportación de la molécula pre-microRNA del núcleo al citoplasma por exportina-5, c) segundo procesamiento por *dicer*, d) identificación y desnaturalización del microRNA por miRISC, e) selección asimétrica de una de las cadenas del microRNA, f) apareamiento con el ARNm blanco y represión de la traducción. 2. Biogénesis de los siRNA: a) presencia de un ARN de doble cadena en el citoplasma, b) procesamiento por *dicer*, c) identificación del dúplex de 19 a 12 pares de bases por siRISC, d) selección asimétrica de una de las cadenas del dúplex, e) apareamiento con el ARNm blanco y subsiguiente degradación. (López M., *et al* 2007) [28].

4. JUSTIFICACIÓN

En los últimos años, la obesidad se ha convertido en un problema de salud mundial. Avances recientes sugieren que la adipogénesis es el resultado de una red de moléculas correguladoras y factores de transcripción.

Se ha demostrado la retroalimentación positiva de PPAR γ y C/EBP α que no sólo se inician para inducir su propia expresión, pero también activan un gran número de genes cuya expresión determina la diferenciación del adipocito.

Como se mencionó, algunos de los miembros de la familia de los TIMP regulan la adipogénesis, particularmente se ha demostrado que Timp-1 la induce. Sin embargo aunque se sabe que Timp-4 se expresa en dicho proceso se desconoce si Timp-4 induce o inhibe la adipogénesis, por lo tanto en este trabajo se analizó el posible papel promotor/inhibidor de Timp-4 durante la adipogénesis *in vitro*.

5. HIPÓTESIS

Timp-4 participa en la regulación de la adipogénesis, por lo que se espera que su inhibición demuestre cual es el papel en este proceso.

6. OBJETIVOS

6.1 Objetivo General

- Determinar si la modulación de la expresión de Timp-4 regula el proceso de diferenciación de los adipocitos.

6.2 Objetivos Particulares

- Establecer un protocolo de diferenciación de preadipocitos.
- Establecer un sistema para inhibir la expresión del Timp-4, empleando un sistema de siRNAs específicos para preadipocitos de ratón.
- Investigar la expresión de diferentes genes que se conocen participan en la diferenciación de adipocitos en el sistema anterior de inhibición.
- Evaluar el efecto de TIMP-4 recombinante en el proceso de diferenciación de adipocitos.

7. MATERIAL Y MÉTODOS

7.1 Material biológico y condiciones de cultivo celular

El material biológico consistió en la línea celular preadipocítica de ratón 3T3-L1 (fibroblast from Swiss Mouse embryo), obtenida de ATCC (*American Type Culture Collection*). Las células se cultivaron en medio DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) suplementado al 10 % con SFB (Suero Fetal Bovino, GIBCO), en incubadora (Revco Ultima II) a una temperatura de 37 °C con pH 7.2; en una atmósfera húmeda saturante al 5 % de CO₂

7.2 Diferenciación celular

A las células 3T3-L1 se les indujo a diferenciación usando el kit comercial (Mesenchymal Stem cell Adipogenesis kit, Chemicon International). Las células se llevaron a confluencia en placas de 6 pozos (Corning Inc.) y después de dos días, se cambió el medio (día 0) por el

medio de inducción. El esquema de inducción se describe en la tabla 1 y se llevó a cabo hasta el día 15 o durante el tiempo indicado.

Tabla 1 Programa de diferenciación

Día	Tratamiento	Composición
1 3 5	Inducción	<ul style="list-style-type: none"> • Dexametasona [1 mM]; • IBMX [0.5 mM]; • Insulina [10 mg/mL]; • Indometacina [100 mM]
7	Mantenimiento	<ul style="list-style-type: none"> • Insulina [10 mg/mL]
9 11 13	Inducción	<ul style="list-style-type: none"> • Dexametasona [1 mM]; • IBMX [0.5 mM]; • Insulina [10 mg/mL]; • Indometacina[100 mM]

7.3 Transfección de siRNA

Las células 3T3-L1 se transfectaron transitoriamente con los plásmidos comerciales TriFECTa RNAi (The Integrated DNA Technologies), de acuerdo a lo descrito en el protocolo usando el liposoma Lipofectamine reagent (Invitrogen, CA, USA). Las secuencias de los siRNAs utilizados para la inhibición de Timp-4 en la línea celular 3T3-L1 se muestran en la tabla 1. Brevemente, las células se sembraron en una placa de 6 pozos con DMEM al 10 % SFB un día antes de la transfección. Posteriormente, se removió el medio y se reemplazó con 500 μ L de la mezcla de transfección correspondiente a cada pozo y se incubó por 4 a 6 horas a 37 °C.

Tabla 2. Secuencias de los siRNAs

Nombre de Dúplex	Secuencia del Dúplex	Blanco
NC1 Control Dúplex	5'- CGUUAUACGCGUAUAAUACGCGUAT -3' 3'- AUACGCGUAUUUACGCGAUUAACGAC -5'	Control negativo
NM_080639 Dúplex 1	5'- GGUAUGAAAUCAAAACAGAUAAAGAT -3' 3'-GGCCAUACUUUAGUUUGUCUAAUUUCUA -5'	<i>Timp4, mRNA</i> <i>Mus musculus</i>
NM_080639 Dúplex 2	5'- CUGUCAUAAAGUUGUACAACCUUGC -3' 3'-CUGACAGUAUUUCAACAUGUUGGAACS -5'	<i>Timp4, mRNA</i> <i>Mus musculus</i>
NM_080639 Dúplex 3	5'- AGAAACCAACAGUCACAAGCAGUAT -3' 3'-GAUCUUUGGUUGUCAGUGUUCGUCAUA -5'	<i>Timp4, mRNA</i> <i>Mus musculus</i>

7.4 Tratamiento con rhTIMP-4

Las células 3T3-L1 transfectadas transitoriamente con los siRNA-Control y siRNA-Timp-4 se estimularon o no con TIMP-4 recombinante humana (rhTIMP-4) (10 nM, R&D, No. Cat. 974-TSF-010) durante el curso temporal de la diferenciación.

7.5 Extracción de ARNm

Transcurridos los tiempos de cultivo, se extrajo el ARN total usando el reactivo TRIzol reagent (Invitrogen CA, USA). Las células se recuperaron por raspado con un gendarme y posteriormente se colectaron en un tubo de 1.5 mL (Sorenson, BioScience) centrifugando en nanofuga por 1 minuto. El botón celular se resuspendió en un volumen de 500 µL de TRIzol y se incubó por 10 minutos a temperatura ambiente. Se añadieron 100 µL de cloroformo (Sigma), se mezcló hasta obtener una mezcla homogénea y lechosa y se incubó en hielo durante 10 min. Posteriormente, se centrifugó a 8,000 rpm durante 10 minutos a 4 °C. La fase acuosa se precipitó con un volumen de isopropanol incubando por 10 minutos en hielo. Se centrifugó a 10,000 rpm durante 15 minutos a 4 °C. Posteriormente se lavó el botón obtenido con 500 µL de etanol al 70 % centrifugándolo a

10,000 rpm, 5 minutos a 4 °C. Se descartó el sobrenadante y se dejó secar el botón. Finalmente el botón se resuspendió en 20 µL de agua libre de ARNsas y se almacenó a una temperatura de -70 °C para su posterior uso en la síntesis de ADN complementario (ADNc). La cantidad y calidad del ARN extraído se determinó con un espectrofotómetro (NanoDrop ND+1000 Spectrophotometer) se midió la absorbancia a 260 y 280 nm.

7.6 Síntesis del ADN complementario (ADNc)

Se realizó la síntesis del ADN complementario (ADNc) por medio de una reacción con la enzima transcriptasa reversa (RT por sus siglas en inglés). Esta técnica permite la generación de la cadena complementaria a partir de la extracción del ácido ribonucleico (ARN) de cadena simple. La síntesis se efectuó a partir de 1µg de ARN total empleando el kit SuperScript(R) (VILO^(TM)), de acuerdo a sus instrucciones. Las reacciones se colocaron en un termociclador (Gene Amp PCR System 9700) el cual se programó como se muestra en la siguiente tabla.

Tabla 3. Condiciones del Termociclador GeneAmp PCR System 9700 para la síntesis de ADNc

Temperatura	Tiempo
25°C	10 min
42°C	30 min
85°C	5 min

7.7 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Para amplificar el DNAc se utilizaron los siguientes reactivos: nucleósido trifosfato (dNTPs por sus siglas en inglés), amortiguador de reacción, iniciadores (oligonucleótidos) específicos para el gen de interés, enzima polimerasa del ADN termoestable ("*Taq*") y la cantidad de ADNc correspondiente a la normalización de cada muestra en un volumen final de 25 μ L por reacción. Las condiciones generales para la reacción fueron específicas para cada gen y estas consistieron en las siguientes fases: fase de activación de la polimerasa, fase de desnaturalización, fase de alineación de los iniciadores, la fase de amplificación y la fase de extensión final.

Los productos de PCR se visualizaron en geles de agarosa al 2% con 1.5 μ L de Syber Green, en el programa Quantity One del equipo foto-documentador VersaDoc (Bio Rad). La cuantificación se realizó con el gen control endógeno Hipoxantinaguanina Fosforribosil Transferasa (HPRT por sus siglas en inglés), posteriormente se realizó el análisis densitométrico.

7.8 Análisis de proteínas por medio de Western Blot

Preparación de la muestra con buffer de Laemmli:

Para lisar las muestras de tejido o células y obtener extractos proteicos totales se recuperaron las células (1×10^6) con un gendarme en un volumen de aproximadamente 1 mL de medio con un pulso de máximo 1 min en la nanofuga. Se aspiró el medio y se lavó el botón de células con 1 mL de amortiguador PBS 1X frío posteriormente se aspiró el PBS y se lisó con 0.5 a 1 mL de amortiguador de Laemmli. Posteriormente se calentó la muestra de 80-100°C por 5 min y se incubó en hielo, se procedió a microcentrifugar en frío por 5 min. El sobrenadante fue el extracto protéico.

Las proteínas se hirvieron con amortiguador de carga por 2-10min y se colocaron en hielo. Unos minutos después se centrifugaron para recuperar el volumen condensado en las

paredes y tapas de los tubos. Posteriormente se separaron las proteínas por electroforesis en un gel de poliacrilamida a 20mA y con amortiguador dodecilsulfato (SDS), la electroforesis se detuvo cuando las proteínas migraron hacia al borde del gel.

Previo a la transferencia, el gel se marcó para orientar el orden de las muestras (con un pequeño corte en una esquina) y se incubó dos veces por 15 min en amortiguador de transferencia en agitación. La membrana que se utilizó se humedeció en metanol y se incubó por al menos 5min en amortiguador de transferencia en agitación.

Para la transferencia en cámara semi-seca se colocó un papel filtro humedecido en amortiguador de transferencia en la base de la cámara semi-seca, después la membrana y sobre esta se colocó el gel, se eliminaron las burbujas cuidadosamente y se colocó otro papel filtro húmedo, finalmente se secaron los bordes de la cámara. Se realizó la electroforesis a 15V/90mA por 15 min.

Al finalizar los 15 minutos se retiró la membrana y se dejó secar. El gel se tiñó para verificar transferencia y carga, una vez que la membrana se secó, se humedeció en metanol y se lavó con TBS o PBS 1X.

Para bloquear, se utilizó PBS o TBS 1X (0.1% Tween opcional) con leche descremada al 5% durante 1-2h a temperatura ambiente, en agitación. Después del bloqueo, la membrana se incubó la membrana con el Anticuerpo (AB) primario a una concentración de 1ug/mL en PBS o TBS con 5% leche descremada, a 4°C, toda la noche. Después, se realizaron de 4 a 6 lavados de 10 a 15min en agitación con PBS o TBS 1X con 0.1% Tween 20. Posteriormente se incubó con el anticuerpo secundario (acoplado a peroxidasa de rábano) durante 45 a 60 min a temperatura ambiente en agitación, de acuerdo al protocolo sugerido para su uso se realizaron de 4 a 6 lavados de 10 a 15min en agitación con PBS o TBS 1X con 0.1% Tween 20. Se incubó con 1mL de la mezcla de la solución de quimioluminiscencia durante 5min en oscuridad, para finalmente exponer y tomar la fotografía.

8. RESULTADOS

8.1 Expresión del RNAm de Timp-4 durante la adipogénesis

En biología molecular una de las técnicas más utilizadas para evaluar la regulación génica es la PCR. Esta técnica nos permite amplificar secuencias de ADN complementarias (ADNc) obtenidas por retrotranscripción se utiliza como molde ARNm. En este estudio se empleó dicha técnica para analizar el efecto de la modulación de Timp-4 sobre adipocitos.

En estudios anteriores se han analizado los niveles de expresión de ciertos marcadores claves en el proceso de diferenciación de adipocitos; en donde se ha observado el incremento necesario de la expresión de genes adipogénicos claves para la adipogenesis como Ppar γ y C/ebp α ; y la disminución de Pref-1 conforme se lleva a cabo la diferenciación adipocítica [15]. Basando en estos reportes previos, se cultivó la línea celular 3T3-L1 en presencia y ausencia de medio de diferenciación durante 11 días para comprobar lo anterior. Al término de este periodo de tiempo se analizó por medio de PCR la expresión de dichos marcadores los cuales se muestran en la figura 6, en donde se observa un incremento en la expresión del RNAm de Timp-4 en las células que se indujeron con medio de diferenciación. Para asegurarnos de que este cambio en el nivel de expresión del RNAm de Timp-4 no se debiera a las condiciones de cultivo de los preadipocitos, las células 3T3-L1 se sembraron en medio de cultivo sin inducción y posteriormente se sometieron a evaluación.

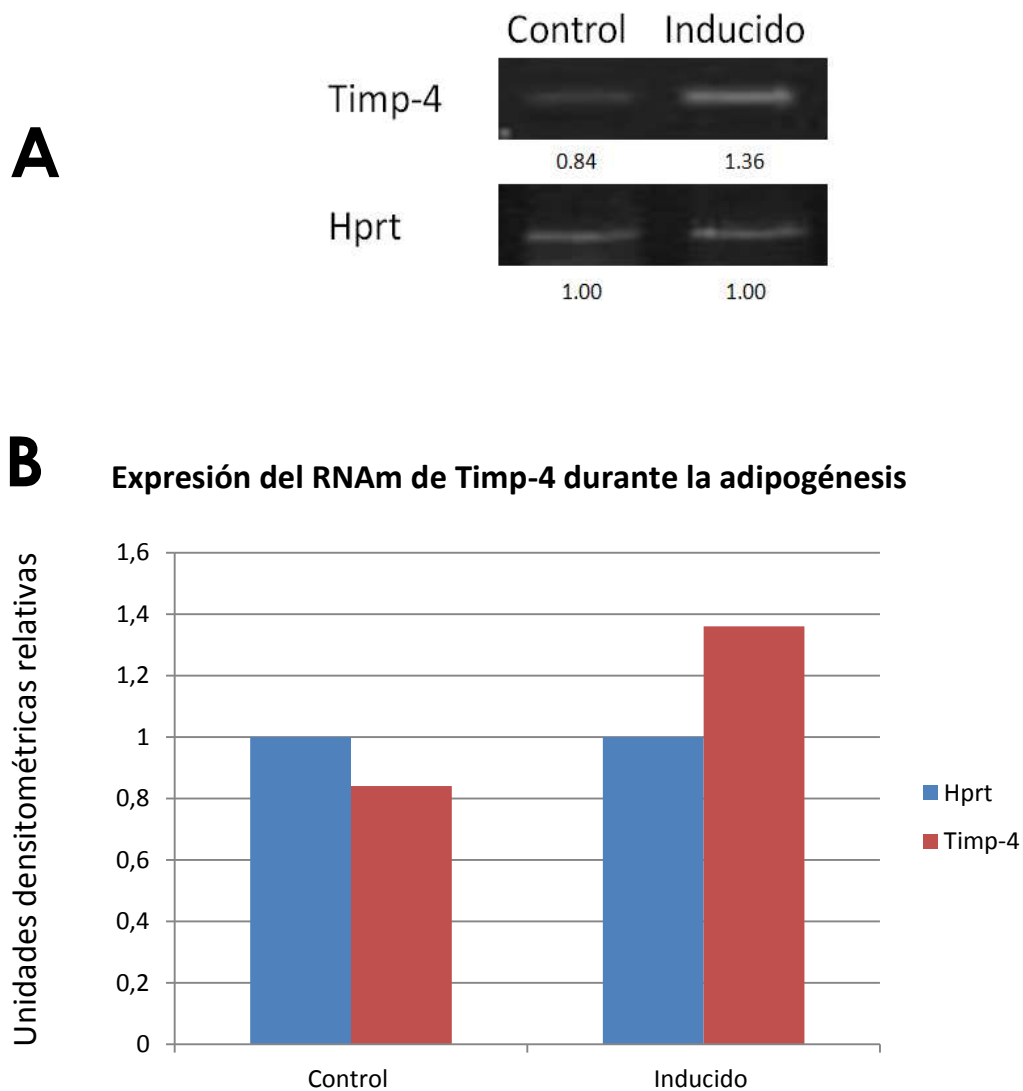
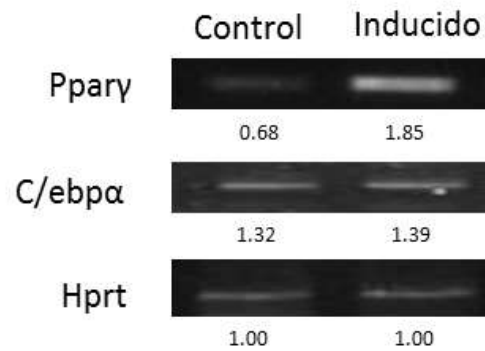


Figura 6 (A) Expresión del ARNm de Timp-4 en la línea celular 3T3-L1 Control (sin medio de inducción a diferenciación) e inducidas (expuesta a un medio de inducción a diferenciación) por 11 días; la evaluación se realizó por PCR. Los números representan el valor relativo de expresión de Timp-4 considerando el valor de expresión del gen constitutivo Hprt. Las densitometrías de las bandas se realizaron con el paquete *Image J*. (B) Representación del valor relativo de expresión del RNAm de Timp-4 durante la adipogénesis, considerando el valor de expresión del gen constitutivo Hprt.

En la figura 7, se muestra el incremento en el nivel de expresión del ARNm de Ppar γ mientras que la expresión del ARNm de C/ebp α no varió al final de los 11 días, en las células inducidas con medio de diferenciación con respecto a las células control. Posteriormente se analizó el nivel de expresión de la proteína de Timp-4 mediante la técnica de Western blot, durante la inducción a diferenciación y se observó que a partir del día 6 la concentración proteína se incrementó (Figura 8).

A



B

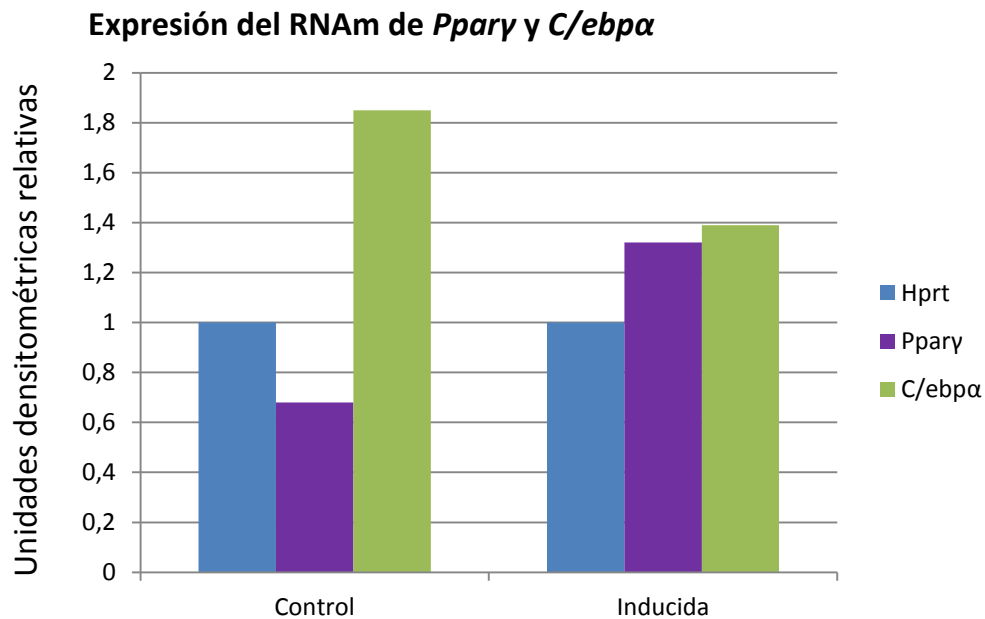


Figura 7 (A) Expresión del RNAm de *Pparγ* y *C/ebpα* en la línea celular 3T3-L1 Control (sin medio de inducción a diferenciación) e inducidas (expuesta a un medio de inducción a diferenciación) por 11 días; la evaluación se realizó por PCR. Se muestra el valor relativo de expresión de RNAm de *Pparγ* y *C/ebpα* que consideró el valor del gen constitutivo *Hprt*. (B) Representación del valor relativo de expresión del RNAm de *Pparγ* y *C/ebpα* durante la adipogénesis, considerando el valor de expresión del gen constitutivo *Hprt*

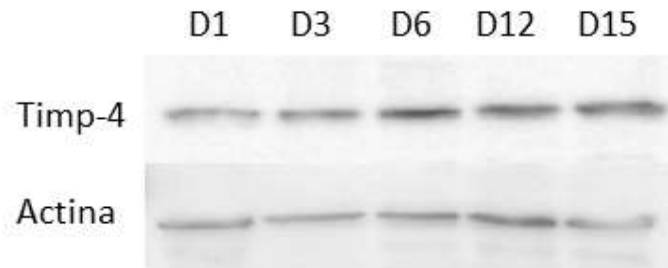
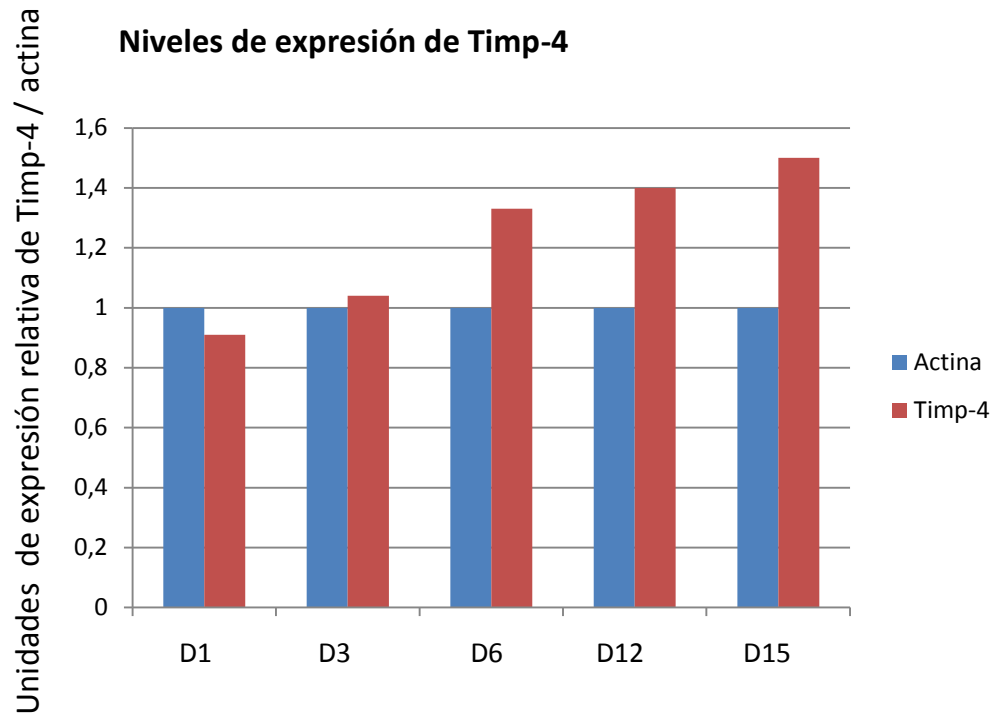
A**B**

Figura 8 (A) Expresión de la proteína Timp-4 en la línea celular 3T3-L1 expuesta a medio de inducción a diferenciación por 15 días. "D" hace referencia al día de inducción a diferenciación. (B) Análisis de transferencia de Western Blot la actina se utilizó como control de carga (M. Mejia-Cristobal, *et al* 2015).

Se observó la morfología que adoptan las células al llevar a cabo el proceso de diferenciación y para ello se tomaron fotografías de las células vivas en el microscopio invertido (Axiovert 40 CFL Carl Zeiss). La Figura 9 muestra la morfología redondeada clásica y lípidos intracelulares acumulados en vesículas en las células que se cultivaron con un medio de inducción; en comparación a las células control.

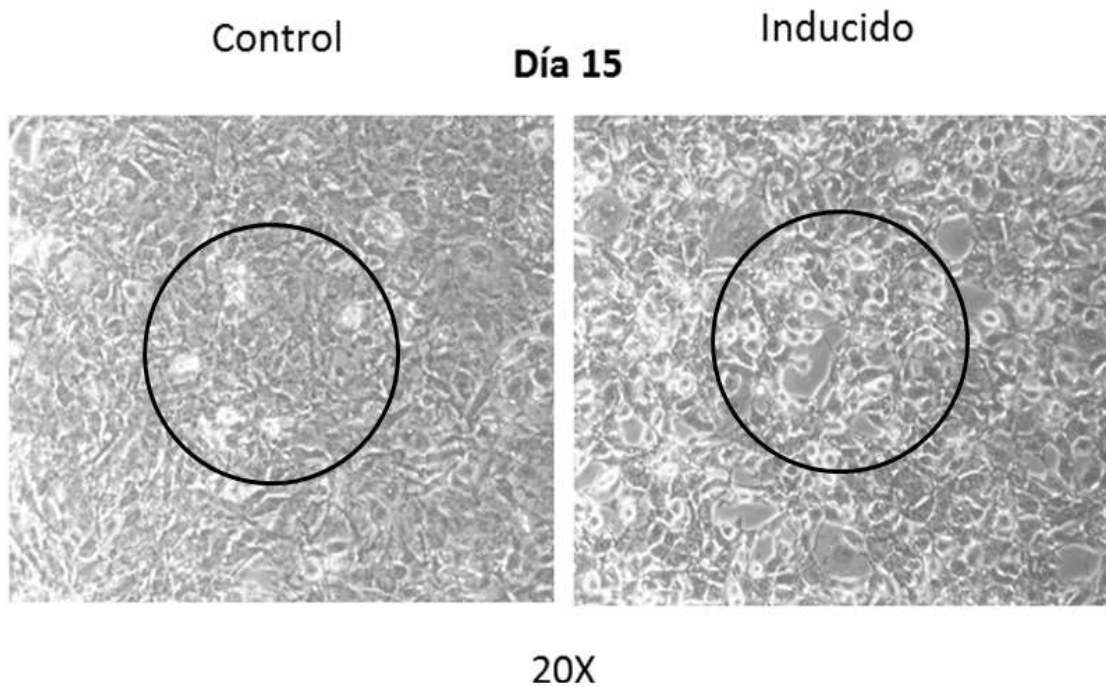


Figura 10. Fotografías de cultivos de la línea celular 3T3-L1 *in vivo* en condiciones sin inducción a diferenciación (Control) y en condiciones de diferenciación (Inducido) al día 11. Las áreas dentro de los círculos indican vacuolas lipídicas. Las fotografías fueron tomadas con el objetivo de 20X del microscopio Axiovert 40 CFL Carl Zeiss.

8.2 Inhibición del RNAm de Timp-4, evaluación de genes adipocíticos

Ya que se observó un incremento en la expresión de Timp-4 durante la adipogénesis, se decidió inhibir su expresión e investigar su papel durante este proceso.

Para inhibir la expresión de Timp-4 se probaron grupos de dos o tres siRNAs (siRNA1 + siRNA2; siRNA1 + siRNA3; siRNA1 + siRNA2 + siRNA3) específicos para Timp-4. Al evaluar la inhibición de Timp-4 empleando los grupos de siRNAs se observó una buena eficiencia de inhibición con todos los grupos y se eligió trabajar con el grupo que contiene el siRNA1 más shRNA3 (Figura 10).

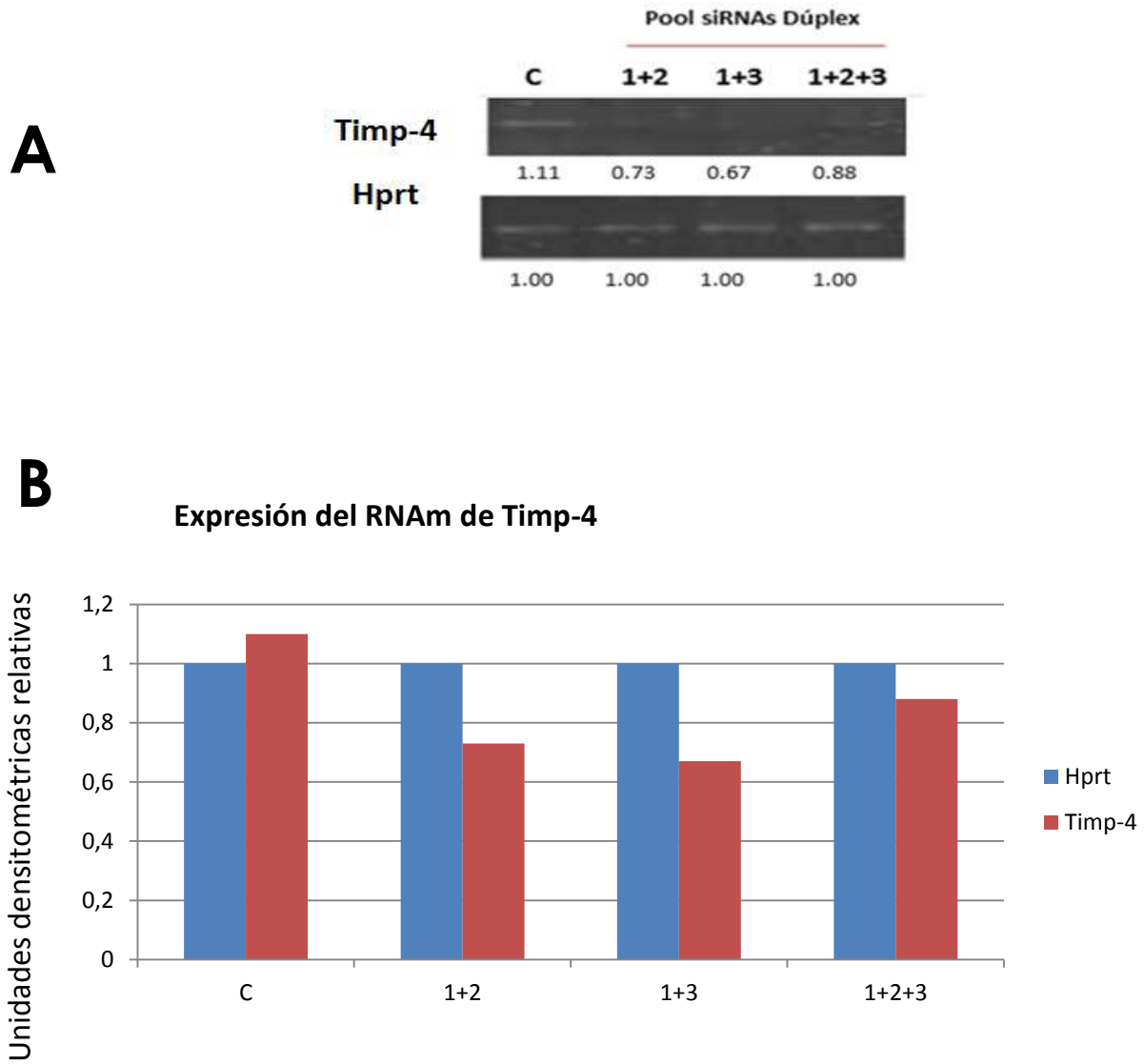
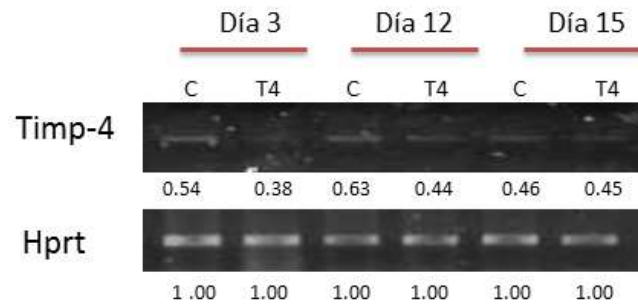


Figura 10 (A) Experimento de inhibición con grupos de siRNAs. Se evaluó la expresión del ARNm de Timp-4 después de 72 horas de transfección. C se refiere al siControl y 1+2 (siRNA1 + siRNA2) 1+3 (siRNA1 + siRNA3) 1+2+3 (siRNA1 + siRNA2 + siRNA3), respectivamente (B) Representación del valor relativo de expresión del RNAm de Timp-4 después de 72 horas de transfección, considerando el valor de expresión del gen constitutivo Hprt.

Una vez establecido un sistema de inhibición eficiente con siRNAs específicos para Timp-4, se llevó a cabo el curso de diferenciación temporal por 15 días y finalmente se evaluó la expresión del ARNm de algunos genes adipogénicos.

En la figura 11 se puede observar la inhibición transitoria del ARNm de Timp-4 en las células expuestas a medio de inducción de diferenciación; en los días 3, 12 y 15 de diferenciación. En la figura 12 se muestran los niveles de expresión de genes inductores adipogénicos como Pref-1, Ppar γ y C/ebp α . Se observó un incremento de los niveles de expresión de Pref-1 en ambos grupos de células transfectadas con el siRNA-Control y con el siRNA-Timp-4 mientras pasan los días de diferenciación. Por su parte, los niveles de Ppar γ y C/ebp α se aumentaron en las células transfectadas con el siRNA-Timp-4 con respecto a las células transfectadas con el siRNA-Control en el día 3 de diferenciación y posteriormente se observó la disminución de la expresión del ARNm de ambos genes en los días 12 y 15.

A



Expresión del RNAm de Timp-4

Unidades densitométricas relativas

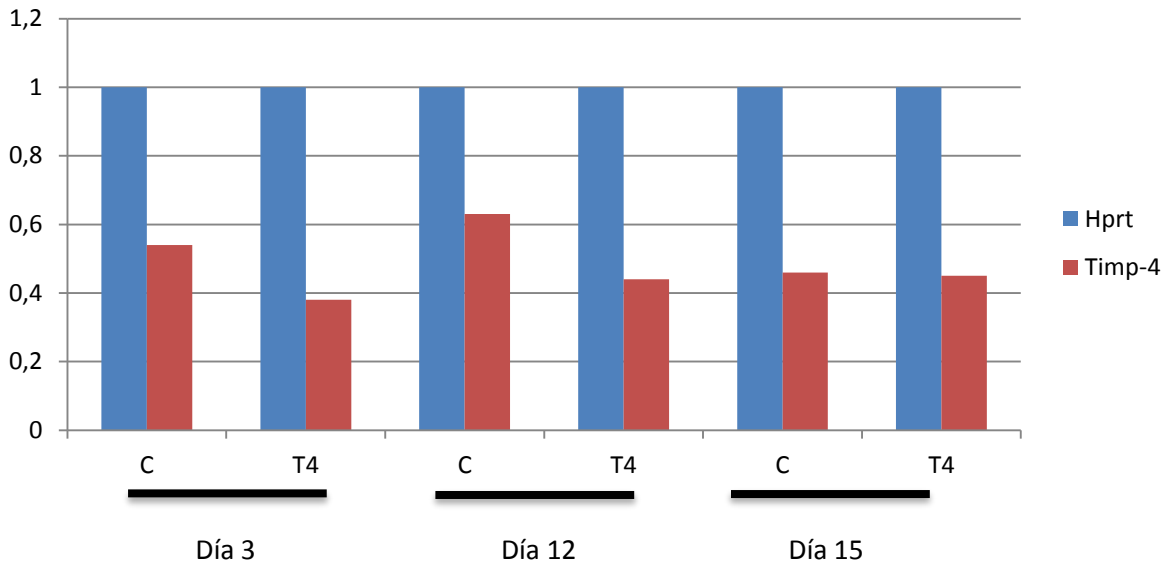
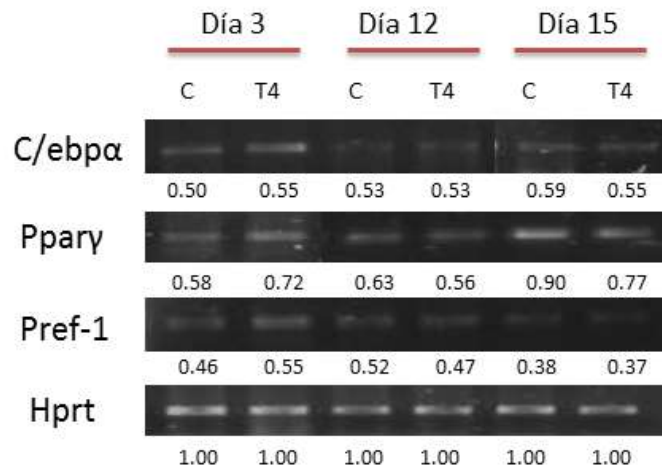


Figura 11 (A) Inhibición de la expresión de Timp-4 utilizando siRNAs específicos. C corresponde a siRNA-Control y T4 corresponde a siRNA-Timp-4, las barras rojas indican los días de este periodo de diferenciación. Se muestra el valor relativo de expresión de Timp-4 considerando el valor del gen constitutivo Hprt (B) Representación del valor relativo de expresión del RNAm de Timp-4 durante la adipogénesis, considerando el valor de expresión del gen constitutivo Hprt.

A



B

Expresión del RNAm de C/ebpα, Ppary y Pref-1

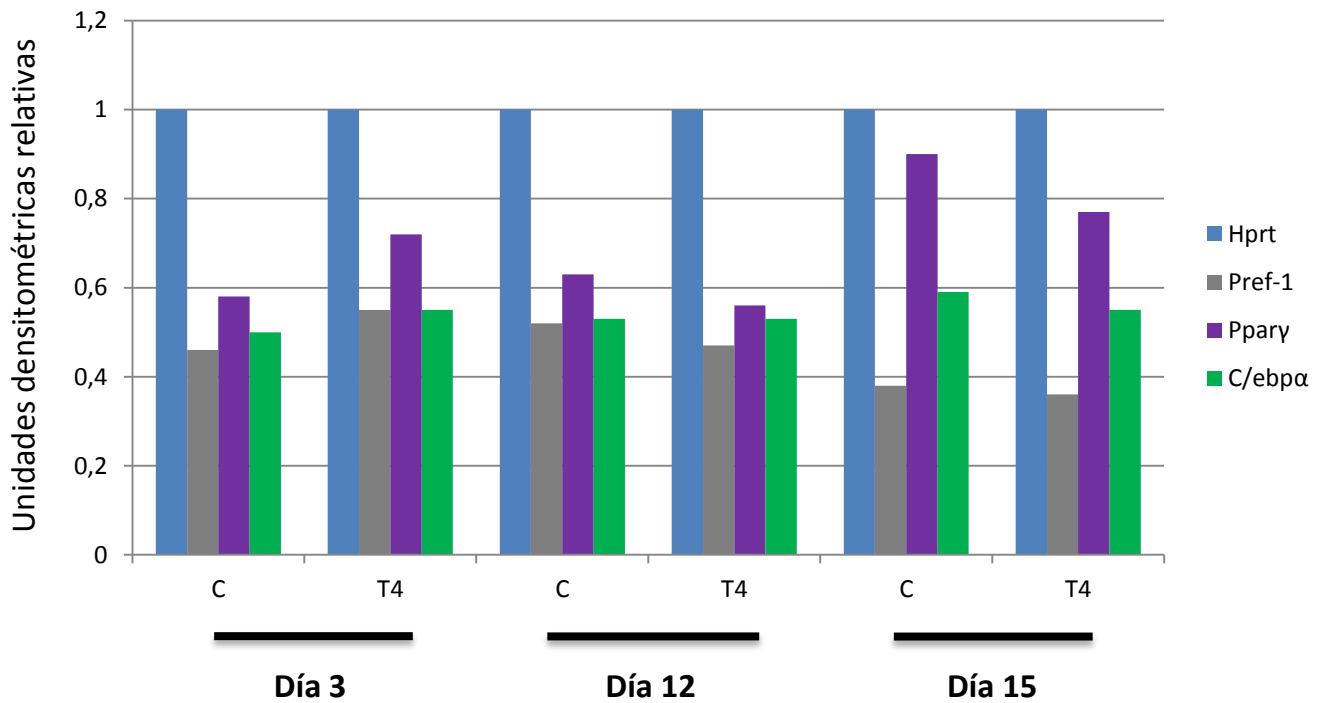


Figura 12 (A) Expresión de C/ebpα, Ppary y Pref-1 en la línea celular 3T3-L1. C corresponde a siRNA-Control y T4 corresponde a siRNA-Timp-4; la evaluación se realizó por PCR. Se muestra el valor relativo de expresión de C/ebpα, Ppary y Pref-1 Timp-4 considerando el valor del gen constitutivo Hprt (B) Representación del valor relativo de expresión del RNAm de C/ebpα, Ppary y Pref-1, considerando el valor de expresión del gen constitutivo Hprt.

Se observó la morfología celular durante la inhibición de ARNm del Timp-4 y el curso de diferenciación temporal (Figura 3). Para ello se tomaron fotografías de las células vivas en el microscopio invertido (Axiovert 40 CFL Carl Zeiss). Se observó que al inhibir la expresión del ARNm de Timp-4 el proceso de adipogénesis se acelera; ya que se puede observar un incremento en formación de vesículas lipídicas; es decir, una morfología redondeada clásica de lípidos intracelulares días antes en las células siRNA-Timp-4 que en células siRNA-Control (L.M. Mejia-Cristobal, *et al* 2015)

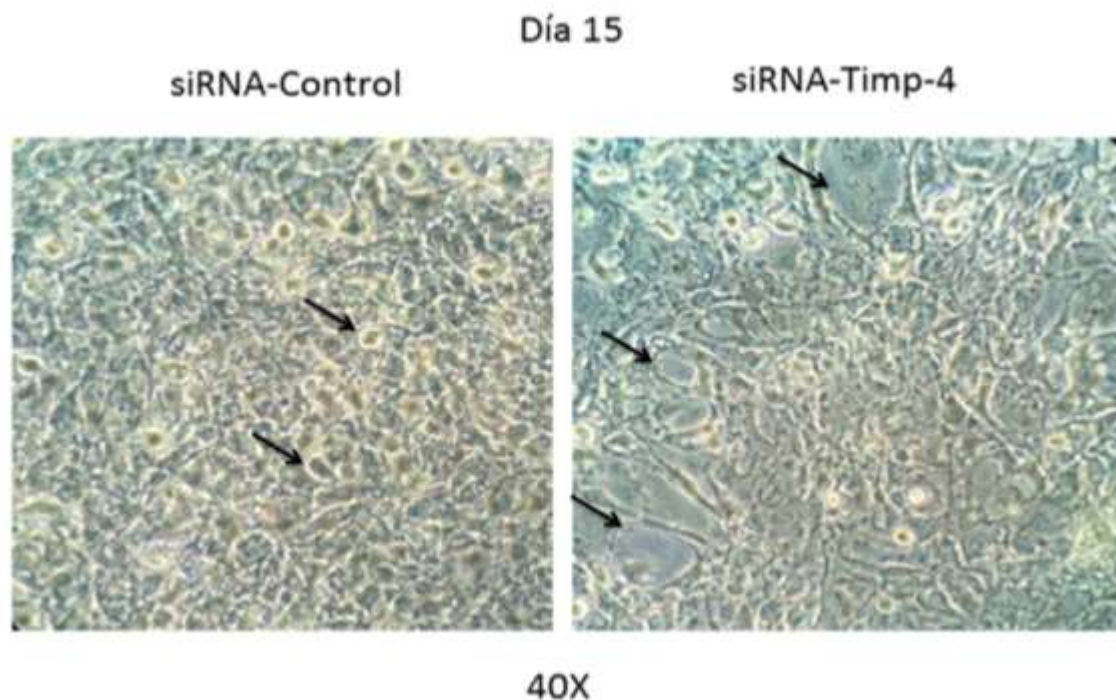


Figura 13. Fotografías de cultivos de la línea celular 3T3-L1 *in vivo* transfectadas con siRNA-Timp-4 y siRNA-Control e inducidas a diferenciación por 15 días. Las fotografías se tomaron con el objetivo de 40X (Axiovert 40 CFL Carl Zeiss)

8.3 Evaluación de los niveles de expresión de genes tempranos en adipogenesis: C/ebp β y C/ebp δ

In vivo e *in vitro* se ha demostrado que C/ebp β y C/ebp δ promueven la diferenciación de los adipocitos. C/ebp β se expresa en la etapa temprana de diferenciación de los adipocitos y activa la transcripción de C/ebp α y Ppar γ , (Rosen ED, Walkey CJ, Spiegelman 2000). En la figura 14 se inhibió la expresión de Timp-4 (72 horas) y aumentaron los niveles de expresión de ARNm de C/ebp δ y C/ebp β tres horas después de inducir la diferenciación de los adipocitos.

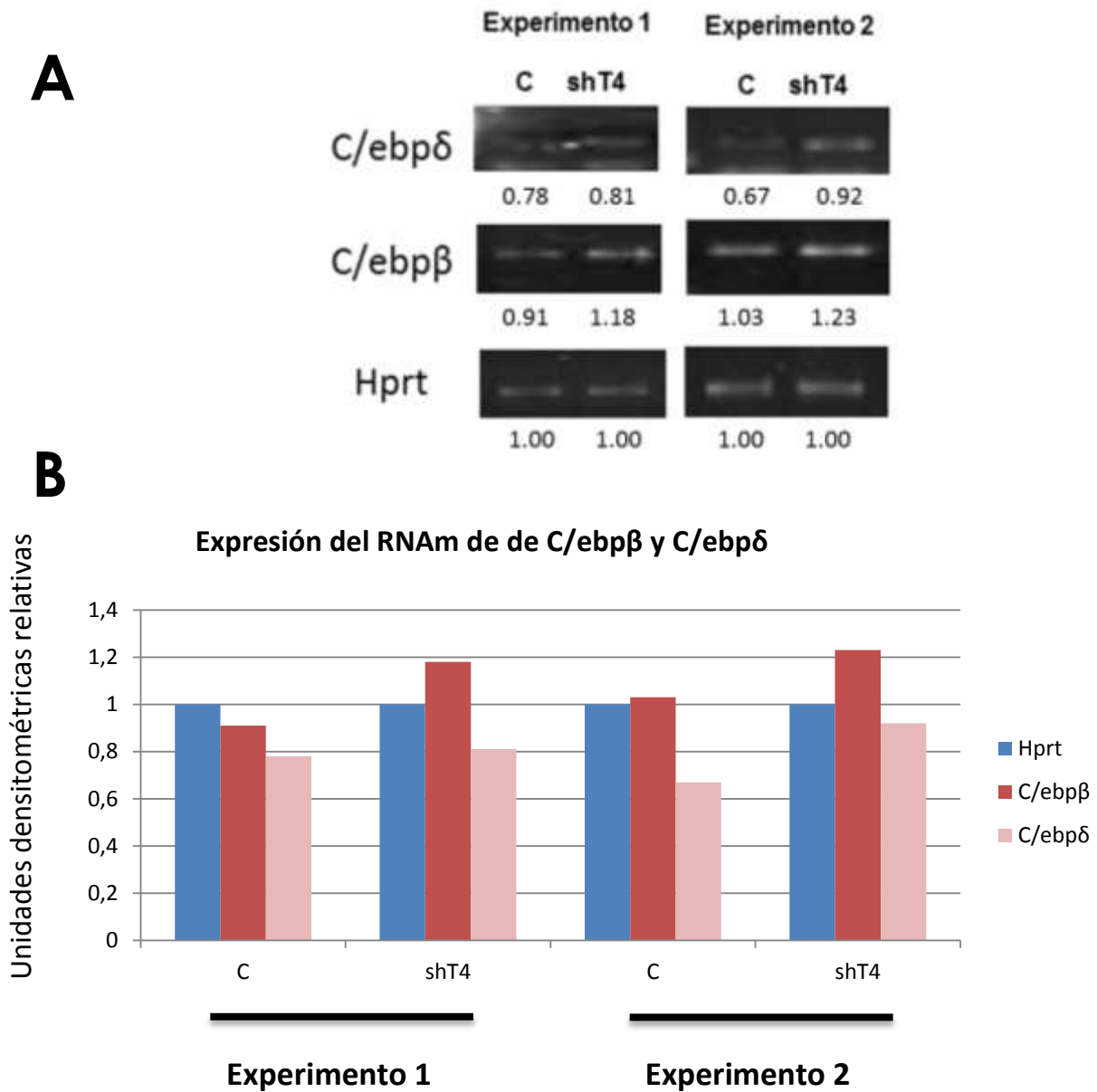


Figura 14 (A) Expresión del ARNm de C/ebpβ y C/ebpδ en la línea celular 3T3-L1. C corresponde a siRNA-Control y T4 corresponde a siRNA-Timp-4, durante un periodo de diferenciación por 3 horas, el valor relativo de expresión de C/ebpβ y C/ebpδ consideró el valor del gen constitutivo Hprt (B) Representación del valor relativo de expresión del RNAm de C/ebpβ y C/ebpδ considerando el valor de expresión del gen constitutivo Hprt.

8.4 Inhibición de Timp-4 con exposición de TIMP-4 recombinante humano en medio de inducción a diferenciación

Debido que al inhibir Timp-4 el proceso de adipogénesis se acelera, se inhibió Timp-4 y posteriormente se administró TIMP-4 recombinante humano (10 nm), para determinar si era posible revertir este efecto. Se observó que la expresión de Ppar γ y Pref-1 incrementó al inhibir Timp-4; sin embargo, sí estas células recibían también rhTIMP-4, este incremento no ocurriría (Figura 15). La expresión de la proteína Ppar γ se evaluó en tres experimentos por Western Blot y se observó este mismo efecto modulador de la inhibición de Timp-4 así como de la reversión con rhTIMP-4 (Figura 16).

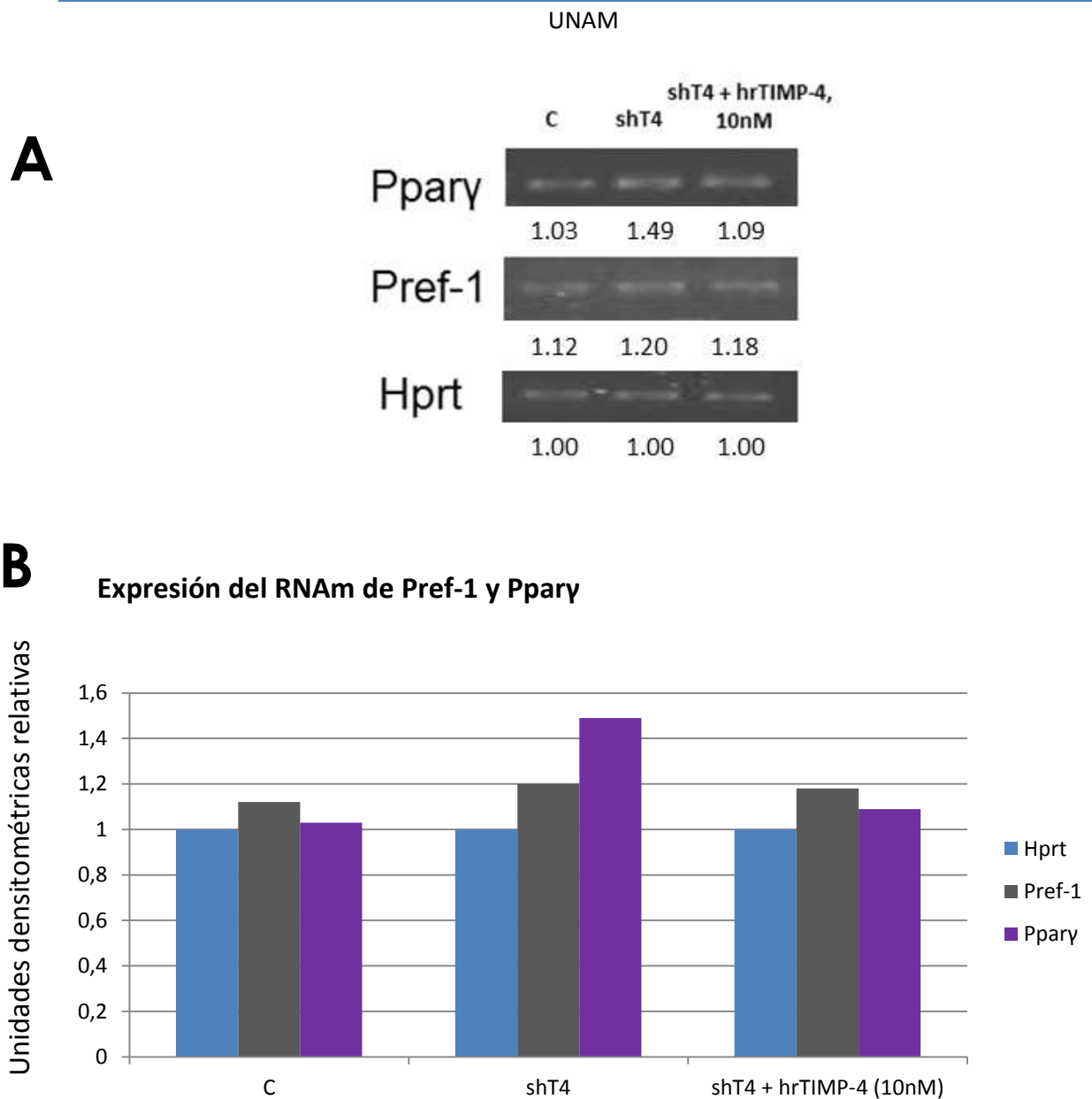


Figura 15 (A) Expresión del RNAm de Pref-1 y Ppar γ en la línea celular 3T3-L1. C corresponde a células sin exposición a rhTIMP-4; *shT4* corresponde a células con inhibición de Timp-4 y *shT4 + hrTIMP-4* corresponde a células con exposición a rhTIMP-4 durante un periodo de diferenciación por 3 días. El valor relativo de expresión de, Ppar γ y Pref-1 Timp-4 consideró el valor del gen constitutivo Hprt (B) Representación del valor relativo de expresión del RNAm de Pref-1 y Ppar γ considerando el valor de expresión del gen constitutivo Hprt.

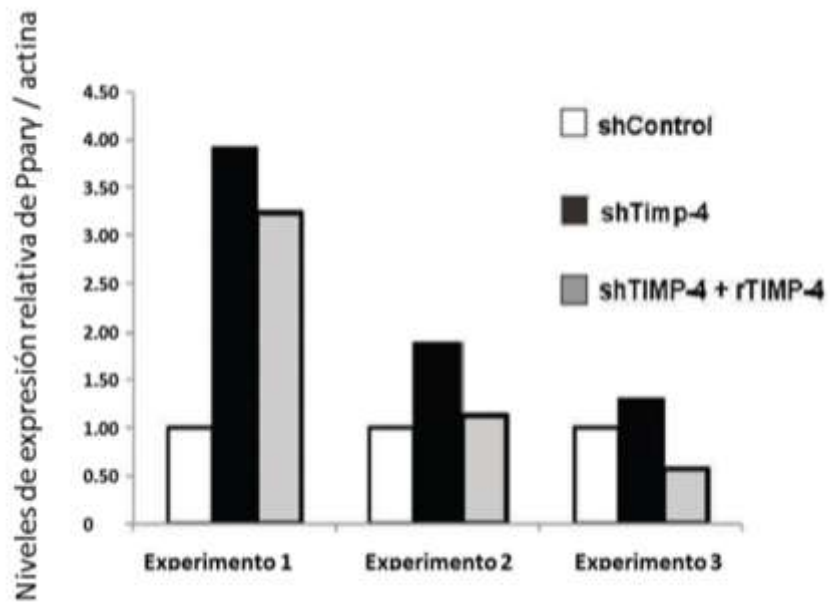


Figura 16. Análisis de los niveles de Pparγ por Western blot en células 3T3-L1, después de tres días de diferenciación de los adipocitos.

9. DISCUSIÓN

En los últimos años, numerosos estudios han investigado el mecanismo de desarrollo de obesidad, proceso que comprende un aumento tanto en el número de células adiposas como en su tamaño ya que cada célula retiene mayores cantidades de lípidos en su interior.

La adipogénesis es un proceso que implica una serie de pasos por los que una célula se especializa [29]. Los cambios morfológicos en la célula así como la acumulación de lípidos que acompañan la adipogénesis son el resultado de la expresión de genes que son inducidos a medida que la célula se diferencia; es decir, los cambios en la expresión y actividad de factores transcripcionales definen el proceso de diferenciación.

La reorganización de la matriz extracelular es un paso crucial de la diferenciación de los adipocitos y se controla por el sistema de MMP/TIMP [30]. Los TIMP son proteínas multifuncionales que tienen un papel en el proceso de adipogénesis.

Meissburger y su equipo de trabajo analizaron la expresión del ARNm de Timp-1 durante la diferenciación de los preadipocitos 3T3-L1. La expresión del ARNm de Timp-1 se redujo en el momento de la inducción y mantuvo sus niveles muy bajos en células 3T3-L1 post diferenciación, lo que sugiere un papel negativo de Timp-4 en la adipogénesis. Independientemente, Scroyen evaluó el efecto de la sobreexpresión de TIMP-1 en un modelo *in vivo* de la adipogénesis. En este estudio, no se encontró ningún efecto significativo sobre la formación *de novo* de masas de grasa, aunque se ampliaron los vasos sanguíneos, por ello, son necesarios más estudios para comprender la implicación de TIMP-1 en la adipogénesis.

Por otro lado, Bernot y sus colaboradores demostraron que los niveles del ARNm de los TIMP fueron modulados durante el proceso de diferenciación, encontrando que la expresión de TIMP-3 está regulada por el factor de transcripción Sp1 y que bajos niveles de Timp-3 son necesarios para la diferenciación de los adipocitos [31, 39].

Estos inhibidores se regulan a nivel transcripcional por diversas citocinas y factores de crecimiento, lo que resulta en una expresión específica de tejido [23]. El último miembro descrito de la familia de los TIMP, TIMP-4, se expresa principalmente en el tejido adiposo, con niveles detectables también en el cerebro y el corazón [24], sin embargo, el papel de este inhibidor en el tejido adiposo se desconoce. Con el fin de estudiar el papel de Timp-4 durante la adipogénesis, en este trabajo de tesis, las células 3T3-L1 se indujeron a diferenciación, encontrándose que la expresión de Timp-4 aumenta durante la diferenciación de los adipocitos, siguiendo un patrón de expresión similar al de Ppar γ .

Con el fin de dilucidar un papel potencial de Timp-4 en la adipogénesis, hemos inhibimos su expresión con siRNAs específicos. Inesperadamente, nuestros resultados muestran que al inhibir Timp-4, la expresión de los reguladores clave para la adipogénesis aumenta en comparación con las células control; en un curso temporal de diferenciación por 15 días, estos resultados sugieren que Timp-4 podría actuar como un regulador negativo de la adipogénesis [32].

Para confirmar esta hipótesis, las células siRNA-Timp-4 fueron tratadas con rhTIMP-4 y diferenciadas como se había realizado anteriormente. De acuerdo con esta idea, al diferenciar las células siRNA-Timp-4 en presencia de rhTIMP-4, se observó una conversión tardía de los preadipocitos a adipocitos. Estos resultados apoyan la idea de que Timp-4 actúa como un regulador negativo de la adipogénesis [32].

Los TIMPs son proteínas multifuncionales que presentan la localización intra y extracelular [33]. Con el fin de definir el camino por el cual Timp-4 modula la adipogénesis, anteriormente L.M. Mejía-Cristobal, junto con su equipo de trabajo; investigaron la localización subcelular de Timp-4 y encontraron que se localiza en el citoplasma de las células 3T3-L1 que se han diferenciado, lo que sugiere que la función de TIMP-4 durante la adipogénesis no se debe a una función reguladora directa de genes. Por otro lado, TIMP-4 podría modular las vías de señalización a través de un receptor putativo. Son necesarios otros experimentos para resolver estas hipótesis y de esta forma conocer las vías con las

cuales actúa Timp-4 en el proceso de adipogénesis para finalmente implementar un tratamiento contra la obesidad.

10. CONCLUSIONES:

- La expresión de Timp-4 incrementa durante el proceso de adipogénesis.
- Los genes reguladores para adipogénesis incrementan su expresión cuando se inhibe Timp-4.
- Posiblemente Timp-4 actúa como un regulador negativo de la adipogénesis.

11. PERSPECTIVAS

En el presente trabajo se mostró que Timp-4 es un regulador negativo de la adipogénesis, mediante la inhibición y posterior inducción a diferenciación de células 3T3-L1; sin embargo aún falta demostrar la regulación negativa de la adipogénesis en un modelo *in vivo*.

Por otro lado, sería interesante continuar el estudio de regulación simultánea de diferentes miembros de la familia de los TIMPs; que tienen participación en el proceso de adipogénesis.

En un estudio global de expresión por análisis microarrays previo, se determinó la participación de NFκB como un regulador negativo de Timp-4 [32]. Sería interesante continuar el estudio de la regulación de Timp-4 por medio de las vías relacionadas.

12. REFERENCIAS

2. Mitchell N., Catenacci V., Wyatt H., Hill O., (2011). Obesity: Overview of an Epidemic. Elsevier Inc. Psychiatr Clin N. Am 34: 717–732
3. Barrera A., Rodríguez A., Molina A., (2013). Escenario actual de la obesidad en México, Rev. Med Inst Mex Seguro Soc. 3: 292-99.
4. Franco S. Obesity Update (2012). Organization for the Economic Cooperation and Development (OECD publishing). <http://www.oecd.org/health/49716427.pdf>
5. Liu L., Tollefsbol T., (2008). Gene-environment interactions and epigenetic basis of human diseases. Curr. Issues Mol. Biol., 10:25-36.
6. Farmer S., (2015). Molecular determinants of Brown adipocyte formation and function. Genes & Development 22:1269 – 1275
7. Jerome N. Feige, Johan Auwerx, (2007). Transcriptional coregulators in the control of energy homeostasis. TRENDS in Cell Biology Vol.17 No.6
8. Hwa Y., Sojeong K., Young K., Bum K., (2014). Regulation of Adipocyte Differentiation via MicroRNAs. En M Endocrinology and Metabolism; 29: 122-135.
9. Sarjeant K., Stephens J., (2014). Adipogenesis, Cold Spring Harb Perspect Biol. 10.11-01.
10. Tariq A., Warren E., Myburgh M., Pepper M., (2011). Adipocyte and adipogenesis, European Journal of Cell Biology 92: 229– 236

11. Tang Q., Otto T., Lane D., (2003) CCAAT/enhancer-binding protein β is required for mitotic. PNAS 100: 850 – 855
12. Meissburger B., Stachorski L., Roder E., Rudofsky G., Wolfrum C., (2011). Tissue inhibitor of matrix metalloproteinase 1 (TIMP1) controls adipogenesis in obesity in mice and in humans, Diabetologia 54: 1468-1479.
13. Lowe E., O’Rahilly S., Rochford J., (2011). Adipogenesis at a glance, Journal of Cell Science 124: 2681-2686.
14. Vinson C., (1989). B-ZIP Proteins Encoded by the *Drosophila* Genome: Evaluation of Potential Dimerization Partners. Genoma Research Biotechnology Information, National Library of Medicine, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland 20814, USA; Iowa City, 52242.
15. McKnight S., Cao Z., Umek R., (1991). Regulated expression of three C/EBP isoforms during adipose conversion of 3T3-L1 cells. Genes Dev 5:1538–1552.
16. Yuhui W., Kyung K., Hyun K., Sook H., (2006). Pref-1, a Preadipocyte Secreted Factor That Inhibits Adipogenesis, Department of Nutritional Sciences and Toxicology, University of California, Berkeley, CA 94720
17. Cynthia M., Smas C., Sook H., (1997). Cleavage of Membrane-Associated pref-1 Generates a Soluble Inhibitor of Adipocyte Differentiation American Society for Microbiology, Department of Nutritional Sciences, University of California, Berkeley, California, 0270-730
18. Kichoon L., Villena J., Soo Y., Hong K., Sunjoo L., Chulho K., Sook H., (2003). Inhibition of adipogenesis and development of glucose intolerance by soluble preadipocyte factor–1 (Pref-1). J. Clin. Invest. 111: 453–461.

19. Hyoung J., Byung Y., Min K., Song Y., Seung L., Suk N., Young K., (2012). Centipede grass exerts anti-adipogenic activity through inhibition of C/EBP β , C/EBP α , and PPAR γ expression and the AKT signaling pathway in 3T3-L1 adipocytes. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 12:230

20. Wu Z., Rosen E., Brun R., Hauser S., Adelmant G., Troy E., McKeon C., Darlington J., Spiegelman M., (1999). Cross-regulation of C/EBP alpha and PPAR gamma controls the transcriptional pathway of adipogenesis and insulin sensitivity, *Molecular cell* 3: 151-158.

21. Edwin C., Mariman M., Ping W., (2010). Adipocyte extracellular matrix composition, dynamics and role in obesity. *Cellular and Molecular Life Sciences; Cell. Mol. Life Sci.* 67: 1277–1292.

22. Coronato S., Laguens G., Vanda Di G., (2012). Rol de las Metaloproteinasas y sus Inhibidores en Patología Tumoral. Cátedra de Patología de Inmunología, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de La Plata, La Plata, Buenos Aires, *Medicina* 72: 495-502.

23. Lizárraga F., Maldonado V., Meléndez J., (2004). Tissue inhibitor of metalloproteinases-2 growth-stimulatory activity is mediated by nuclear factor-kappa B in A549 lung epithelial cells; *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 36: 1655–1663.

24. lark M., Swingler E., Sampieri C., Edwards R., (2008). The regulation of matrix metalloproteinases and their inhibitors, *The international journal of biochemistry & cell biology* 40: 1362-1378.

25. Baker A., Edwards R., Murphy G., (2002). Metalloproteinase inhibitors: biological actions and therapeutic opportunities, *J Cell Sci* 115: 3719-3727.
26. Bauters D., Van Hul M., Lijnen H., (2014) Gelatinase B (MMP-9) gene silencing does not affect murine preadipocyte differentiation, *Adipocyte* 3: 50-53.
27. Chavey C., Mari B., Monthouel M., Bonnafous S., Anglard P., Van Obberghen E., Tartare-Deckert S., (2003). Matrix metalloproteinases are differentially expressed in adipose tissue during obesity and modulate adipocyte differentiation, *The Journal of biological chemistry* 278: 11888-11896.
28. Sen G., Blau H., (2006). A brief history of RNAi: the silence of the genes. *FASEB J.*; 20: 1293-9.
29. López M., López S., Arias C., (2007). RNA de interferencia: el silencio de los genes *Biotechnología*.
30. Rosen E., Walkey C., Spiegelman (2000). BM: Transcriptional regulation of adipogenesis. *Genes Dev* 14:1293–1307
31. Nakajima T., Yamaguchi K., Ozutsumi H., (1998). Adipose tissue extracellular matrix: newly organized by adipocytes during differentiation, *Differentiation* 63:193–200.
32. Bernot D., Barruet E., Poggi M., Bernadette B., Christine A., Peiretti F., (2010). Down-regulation of Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-3 (TIMP-3) Expression Is Necessary for Adipocyte Differentiation. *The Journal Of Biological Chemistry* 285: 6508–6514.

33. L.M.Mejia-Cristobal,et al. (2015). Tissue inhibitor of metalloproteases-4 (TIMP-4) modulates adipocyte differentiation in vitro, *Exp Cell Res.* <http://dx.doi.org/10.1016/j.yexcr.2015.05.006>
34. Stetler S., (2008). Tissue inhibitors of metalloproteinases in cell signaling: metalloproteinase-independent biological activities, *Science signaling* 1 re6.
35. OMS (2015). Organización Mundial de la Salud. Obesidad y sobrepeso. Nota descriptiva no. 311 [en Línea]. Enero 2015. Disponible en <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/es/>
36. Zhaodan C., Umek M., McKnight S., (2014). Regulated expression of three C/EBP Isoforms during adipose conversión of 3T3-L1 cells. *GENES & DEVELOPMENT* 5: 1538-1552.
37. Laudes M., (2011). Role of WNT signalling in the determination of human mesenchymal stem cells into preadipocytes, *Journal of Molecular Endocrinology* (2011) 46, R65–R72.
38. Greene J., Wang M., Liu E., Raymond L., Rosen C., Shi Y., (1996). Molecular cloning and characterization of human tissue inhibitor of metalloproteinase 4, *The Journal of biological chemistry* 271: 30375-30380.
39. Ali A., Hochfeld W., Myburgh R., Pepper M., (2013). Adipocyte and adipogenesis, *European journal of cell biology* 92: 229-236
40. Alexander C., , Selvarajan S., Mudgett J., Werb Z., (2001). Stromelysin-1 regulates adipogenesis during mammary gland involution, *The Journal of cell biology* 152: 693-703

41. Boney C., Fiedorek F., Paul S., (1996). Regulation of preadipocyte factor-1 gene expression during 3T3-L1 cell differentiation. *Endocrinology*. 137: 2923-8.
42. *GeneAtlas*. (<http://biogps.gnf.org>)
43. Meissburger B., Stachorski L., Roder E., Rudofsky G., Wolfrum C., (2011). Tissue inhibitor of matrix metalloproteinase 1 (TIMP1) controls adipogenesis in obesity in mice and in humans, *Diabetologia* 54: 1468-1479.
44. Visse R., Nagase H., (2003). Matrix Metalloproteinases and Tissue Inhibitors of Metalloproteinases Structure, Function, and Biochemistry *Circ Res*. 92: 827-839.
45. NCBI. National Center of Biotechnology Information. BLAST. [En línea]. Fecha 24 de marzo del 2015. Disponible en: http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome
46. Dorsett Y., Tuschl T., (2004). siRNAs: Applications in functional genomics and potential as therapeutics. Nature PublishingGroup. Laboratory of RNA Molecular Biology, Rockefeller University, York 10021A.
47. Fata J., Leco K., Voura E., Yu Y., Waterhouse P., Murphy G., Moorehead P., Khokha R., (2001). Accelerated apoptosis in the Timp-3-deficient mammary gland, *The Journal of clinical investigation* 108: 831-841.
48. Hong-xing L., Xiao L., Cheng W., Jia-li G., Yong-gong Z., (2010). Epigenetic regulation of adipocyte differentiation and adipogenesis. *J Zhejiang Univ-Sci Biomed & Biotechnol* 11: 784-791