



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
MAESTRIA EN CIENCIAS (NEUROBIOLOGÍA)

**IDENTIFICACIÓN DE GENES Y REDES GÉNICAS QUE SE ASOCIEN
CON LA ADIPOGÉNESIS EN EL TEJIDO ADIPOSO VISCERAL Y
SUBCUTÁNEO**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS (NEUROBIOLOGÍA)

PRESENTA:
ROGELIO IVÁN SERVÍN URIBE

Directores de Tesis

DRA. YAZMÍN MACOTELA GUZMÁN INB-UNAM
DR. JORGE TONATIUH AYALA SAMUANO INB-UNAM

Miembros del comité tutor

DRA. AUREA OROZCO RIVAS INB-UNAM
DRA. CARMEN YOLANDA ACEVES VELASCO INB-UNAM

Juriquilla, Querétaro

ENERO 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Resumen

IDENTIFICACIÓN DE GENES Y REDES GÉNICAS QUE SE ASOCIEN CON LA ADIPOGÉNESIS EN EL TEJIDO ADIPOSO VISCERAL Y SUBCUTÁNEO.

La expansión del tejido adiposo (TA) es el resultado tanto de la hiperplasia o incremento en el número de células precursoras de adipocitos y su diferenciación en adipocitos (adipogénesis), como de la hipertrofia o agrandamiento de adipocitos maduros por acumulación de triglicéridos. La mayoría de los estudios sobre los eventos moleculares de la adipogénesis se han llevado a cabo en modelos *in vitro*, siendo poco estudiadas las redes moleculares que gobiernan la adipogénesis *in vivo*. En este trabajo nos preguntamos si la programación transcripcional de la adipogénesis difiere entre el TA visceral (TAV) vs TA subcutáneo (TAS) de ratones delgados de la cepa C57Bl/6, por ser depósitos grasos con implicaciones metabólicas distintas. Usando un análisis *in silico*, se combinó la información disponible de dos estudios de análisis de expresión génica por microarreglos: 1) en pre-adipocitos, y 2) en adipocitos, tanto de TAV como TAS; para identificar genes y redes génicas comunes o depósito-específicas involucradas en la diferenciación de pre-adipocitos en adipocitos (modelo de adipogénesis *in vivo*). El procesamiento de los datos constó de: análisis estadístico, aprendizaje automático y minería de datos. Se encontró que existen diferencias sutiles entre depósitos en cuanto al número de genes relacionados con la adipogénesis, que bien podrían ser las responsables de procesos adipogénicos diferentes entre depósitos grasos. Asimismo, se observó que las diferencias entre los modelos de adipogénesis en TAV y TAS, radican tanto en las diferencias en la expresión génica como en las interacciones específicas entre genes. El análisis nos permitió identificar a los genes núcleo *Mbd4*, *Tgif2*, *Hic1*, *Irx3*, *Rora*, *Zic3*, *Sox15*, *Nr1i3* en TAV, y *Tcf3*, *Rxb*, *Samd3*, *Nr6a1*, *Irf8*, *Neurog1*, *Gata4*, *Mef2d*, *Nr5a1*, *Rorc* en TAS como reguladores potenciales de las diferencias en el proceso adipogénico y en el metabolismo del TAV y el TAS. En conclusión, existen diferencias intrínsecas en la programación transcripcional de la adipogénesis entre depósitos; siendo de igual importancia tanto las diferencias en

cómo interactúan los mismos genes en un depósito y otro, como las diferencias en la expresión génica entre depósitos.

Abstract

IDENTIFICATION OF GENES AND GENE NETWORKS ASSOCIATED WITH ADIPOGENESIS IN VISCERAL AND SUBCUTANEOUS ADIPOSE TISSUE

Adipose tissue expansion is the result of both hyperplasia or increased adipocyte precursor cell number and their differentiation into mature adipocytes (adipogenesis), and hypertrophy or increased mature adipocyte size due to triglyceride accumulation. Most studies investigating the molecular events implicated in adipogenesis have been undertaken using in vitro models, whereas the molecular networks that govern adipogenesis in vivo have been poorly studied. In this work, we asked whether the adipogenic transcriptional program differs between visceral (VAT) and subcutaneous (SAT) adipose tissues. Using an in silico analysis, we combined the available information from two microarray studies: 1) in preadipocytes and 2) in adipocytes, both from VAT and SAT; to identify differential genes and gene networks between VAT and SAT involved in the transition from an adipocyte precursor to a mature fat cell, in an in vivo adipogenesis model. The data processing consisted of three steps: statistical analysis, automatized learning and data mining. We found subtle differences between fat depots regarding adipogenic related genes, that may be responsible for different adipogenic processes between depots. Moreover, the differences in the adipogenic models between VAT and SAT, lie not only in different gene expression patterns, but also in the specific interactions that the same genes establish in different depots. Our analysis allowed us to propose the hub genes: *Mbd4*, *Tgif2*, *Hic1*, *Irx3*, *Rora*, *Zic3*, *Sox15*, *Nr1i3* in VAT and *Tcf3*, *Rxb*, *Samd3*, *Nr6a1*, *Irf8*, *Neurog1*, *Gata4*, *Mef2d*, *Nr5a1*, *Rorc* in SAT as depot-specific important regulators of the adipogenesis process. In conclusion, there are intrinsic differences in transcriptional programming of adipogenesis between deposits; being equally important the differences in gene expression patterns, as well as in the specific interactions that the same genes establish in different depots.

Índice General	iv
Índice de Figuras	vii
Índice de Tablas	viii
Resumen en español	ii
Resumen en Inglés	iv
Agradecimientos	v
1. Introducción	9
2. Antecedentes	11
2.1 Definición de la adipogénesis	11
2. 2 Células precursoras de adipocitos	11
2. 3 Factores y vías de señalización involucradas en la diferenciación de adipocitos	13
<i>Proteínas de la familia del Factor de Crecimiento Transformante b (TGF-β)</i>	13
<i>Familia Wnt</i>	16
2. 4 Programación transcripcional de la adipogénesis	17
<i>Receptores activados por proliferador de peroxisomas</i>	17
<i>Proteínas activadoras de la unión CCAAT</i>	19
2. 5 Otros factores que influyen sobre la adipogénesis	20
2. 6 Modelos de adipogénesis	21
3. Antecedentes específicos	23
3. 1 Diferencias entre depósitos grasos	23
3. 2 Microarreglos y análisis bioinformático	27
4. Justificación	29
5. Hipótesis	30
6. Objetivo general	30
7. Objetivos particulares	30
8. Materiales y métodos	31

8. 1 Bases de datos	31
8. 2 Exploración y análisis de bases de datos de microarreglos	31
8. 2. 1 Análisis estadístico inferencial	31
8. 2. 2 Análisis estadístico descriptivo	32
8. 3 Identificación de genes depósito dependiente e independiente	32
8. 4 Análisis de ontología de genes	32
8. 4. 1 Identificación de factores de transcripción regulados a la baja y al alza depósito dependiente e independiente, a partir del análisis ontológico funcional	32
8. 5 Construcción de redes de co-expresión génica	32
8. 6 Redes de asociación de proteínas funcionales	33
9. Resultados	34
9. 1 Perfil de la expresión de genes en pre-adipocitos y adipocitos maduros de tejido adiposo visceral y subcutáneo	34
9. 2 Análisis de la expresión diferencial depósito dependiente e independiente	40
9. 3 Factores de transcripción depósito dependiente e independiente involucrados en redes génicas relacionadas con diferenciación celular y desarrollo	44
9. 4 Redes de co-expresión génica	44
9. 5 Redes de asociación de proteínas funcionales	45
10. Discusión	50
11. Conclusión	59
Suplementos	60
Referencias	90
Índice de Figuras	
Figura 1. Células involucradas en la diferenciación del tejido adiposo	12
Figura 2. Compromiso del linaje de los adipocitos y diferenciación	14

termina	
Figura 3. Protocolo de análisis del modelo de adipogénesis <i>in vivo</i>	33
Figura 4. Perfil de expresión génica en la adipogénesis de tejido adiposo visceral y subcutáneo	36
Figura 5. Desarrollo del modelo teórico basado en datos biológicos de adipogénesis <i>in vivo</i> .	38
Figura 6. Heatmap de la matriz de expresión génica	39
Figura 7. Genes significativamente alterados durante la adipogénesis en tejido adiposo visceral y subcutáneo	41
Figura 8. Redes de asociación de proteínas funcionales de los genes regulados a la baja en TAV	46
Figura 9. Redes de asociación de proteínas funcionales de los genes regulados a la baja en TAS	47
Figura 10. Redes de asociación de proteínas funcionales de los genes regulados al alza en TAV	48
Figura 11. Redes de asociación de proteínas funcionales de los genes regulados al alza en TAS	49
Índice de Tablas	
Tabla 1. Principales funciones, ligandos y sitios de expresión de los PPARs	18
Tabla 2: Expresión génica de marcadores de pre-adipocitos y adipocitos en TAV y TAS.	37
Tabla 3. Análisis aglomerativo jerárquico-correlación de Pearson de los genes alterados durante la adipogénesis de tejido adiposo	38
Tabla 4. Genes adipogénicos regulados a la baja TA visceral y subcutáneo	42
Tabla 5. Genes adipogénicos regulados al alza de TA visceral y subcutáneo	43
Tabla 6. Factores de transcripción-genes núcleo en las redes de co-expresión génica en TA visceral y subcutáneo	45

1. INTRODUCCIÓN

La obesidad y el sobrepeso constituyen un grave problema de salud pública que afecta tanto a la población infantil como a la adulta. De acuerdo con la OMS a nivel mundial en el 2014 más del 38% de la población adulta mayor de 18 años presentaba obesidad. En México la prevalencia de sobrepeso y obesidad se ha mantenido en cifras alarmantes; de acuerdo con la encuesta ENSANUT 2016: 3 de cada 10 niños y adolescentes (de 5 a 19 años de edad) presentaron sobrepeso u obesidad, mientras que en adultos se presentó en 7 de cada 10 individuos (ENSANUT, 2016). La gravedad de este padecimiento es que es el principal factor de riesgo para el desarrollo de diversas enfermedades crónicas tales como diabetes tipo 2 (DMT2) y enfermedades cardiovasculares, entre otras.

La obesidad se define como una acumulación anormal o excesiva de grasa corporal, principalmente en el tejido adiposo que puede ser perjudicial para la salud (OMS, 2015); en términos generales es causada por un desequilibrio energético (ingesta-gasto energético) (Després and Lemieux, 2006) y está influenciada por factores genético-ambientales (González-Sandoval *et al.*, 2014; Bouchard, 2008; Vögele, 2005; Hacker and Deitel, 1991).

El tejido adiposo está íntegramente involucrado en la coordinación de una variedad de procesos biológicos que incluyen la regulación del equilibrio energético, la acción de la insulina, el metabolismo de glucosa y la función endócrina. El tejido adiposo está constituido por preadipocitos y adipocitos maduros, además de células endoteliales, fibroblastos y macrófagos (Kershaw and Flier., 2004; Sánchez-Muñoz *et al.*, 2005); por lo tanto, un desequilibrio en el tejido adiposo causado por sobrepeso/obesidad conlleva al desarrollo de alteraciones como: procesos inflamatorios, disfunción endotelial, aumento de los ácidos grasos libres o lipotoxicidad, estrés oxidativo, hiperinsulinemia y resistencia a la insulina. Esta última con el tiempo desencadena hiperglucemia y dislipidemias, lo que en conjunto da como resultado el desarrollo de DMT2, enfermedades cardiovasculares y otras patologías (Dixon, 2010; Czech, 2017).

Cabe mencionar que los riesgos que conlleva la obesidad dependen del depósito de grasa en donde ocurra la acumulación excesiva de grasa. La acumulación excesiva de grasa en el tejido adiposo visceral que como su nombre lo indica se localiza en el área abdominal, alrededor de las vísceras, se asocia con la acumulación de grasa ectópica y alteraciones metabólicas. Por el contrario, la acumulación excesiva de grasa en el tejido adiposo subcutáneo no se asocia con el desarrollo de alteraciones metabólicas (Després and Lemieux, 2006; Tran and Kahn, 2010).

La expansión del tejido adiposo ocurre a través de dos mecanismos importantes: la hiperplasia: que es el aumento en el número de células adiposas maduras a partir de células precursoras; y la hipertrofia: que es el agrandamiento de las células adiposas maduras por la acumulación excesiva de triglicéridos, sin división celular. La hipertrofia, particularmente en el tejido adiposo visceral se asocia con el desarrollo de alteraciones metabólicas; por el contrario, la hiperplasia se considera un mecanismo de expansión adiposa saludable (Jo *et al.*, 2009).

De acuerdo a lo anterior, para poder entender el por qué la expansión excesiva del tejido adiposo visceral y subcutáneo se asocian con riesgos metabólicos distintos, es importante estudiar, en primer lugar, las características intrínsecas de cada tipo de tejido adiposo. Por lo cual, en el presente proyecto nos preguntamos si existen diferencias en los mecanismos transcripcionales involucrados en la formación de adipocitos entre el tejido adiposo visceral y el subcutáneo.

2. ANTECEDENTES

2. 1 Definición de la adipogénesis

La adipogénesis es el proceso mediante el cual una célula precursora (multipotencial) se diferencia en un adipocito maduro para cumplir un importante papel metabólico; lo cual involucra una programación compleja y altamente orquestada de expresión de genes (Clavijo *et al.*, 2007; Lowe *et al.*, 2011).

2. 2 Células precursoras de adipocitos

El tejido adiposo blanco (TAB) es capaz de expandirse y reducir de tamaño masivamente en respuesta a alteraciones crónicas en el balance energético. Este grado de plasticidad es único entre los órganos de un adulto. Incluso en el TAB, sin expandirse, los adipocitos maduros son renovados con una frecuencia del 10% anual (Spalding *et al.*, 2008).

A principios de 1900 se utilizó el término “célula madre” para describir un progenitor común para el sistema hematopoyético (sistema de tejidos y órganos, como la médula ósea, especializados en la formación de los componentes sanguíneos). Lo cual derivó en estudios que evidenciaron la existencia de una “célula madre hematopoyética común” (CMH). Dos características importantes de este tipo de células es que son capaces de auto-renovarse y diferenciarse a multilinaje *in vivo*. Aunado a esto, además de la presencia de CMHs en la médula ósea, se encontró en el estroma de la misma, células progenitoras no-hematopoyéticas capaces de auto-renovarse y diferenciarse en diferentes tipos de células mesenquimales, tales como osteoblastos, condrocitos, adipocitos y mioblastos, tanto *in vitro* como *in vivo*. Esto dio lugar a las denominadas “células madre mesenquimales (CMMs)” (Cawthorn *et al.*, 2012b).

Por otra parte, se sabe que además de tejidos como la médula ósea, la pulpa dental, la membrana fetal, la placenta y el tejido adiposo contienen CMMs. En el tejido adiposo al menos 1 de cada 100 células del tejido adiposo es una CMM, en comparación con la médula ósea en donde 1 de cada 100,000 células es una CMM.

Evidencias *in vivo* e *in vitro* sugieren que estas células multipotentes, derivadas del tejido adiposo, pueden diferenciarse en adipocitos, así como en, condrocitos, osteoblastos, miocitos, hepatocitos, células endoteliales y otros linajes (Macotella *et al.*, 2012; Tremolada *et al.*, 2016). Estas células madre de tejido adiposo, con diferenciación a multilínea, han sido aisladas de la fracción estroma vascular la cual contiene una mezcla de varios tipos celulares (células endoteliales, preadipocitos, fibroblastos, macrófagos y numerosas CMMs). Recientemente, se ha identificado, a partir de marcadores de superficie celular, una sub-población de células estromales (pre-adipocitos) que está comprometida a diferenciarse en adipocitos maduros (Figura 1). Esto indica que el proceso de diferenciación de adipocitos (adipogénesis) tiene dos estadios importantes: el compromiso celular y la diferenciación terminal (Huang *et al.*, 2009).

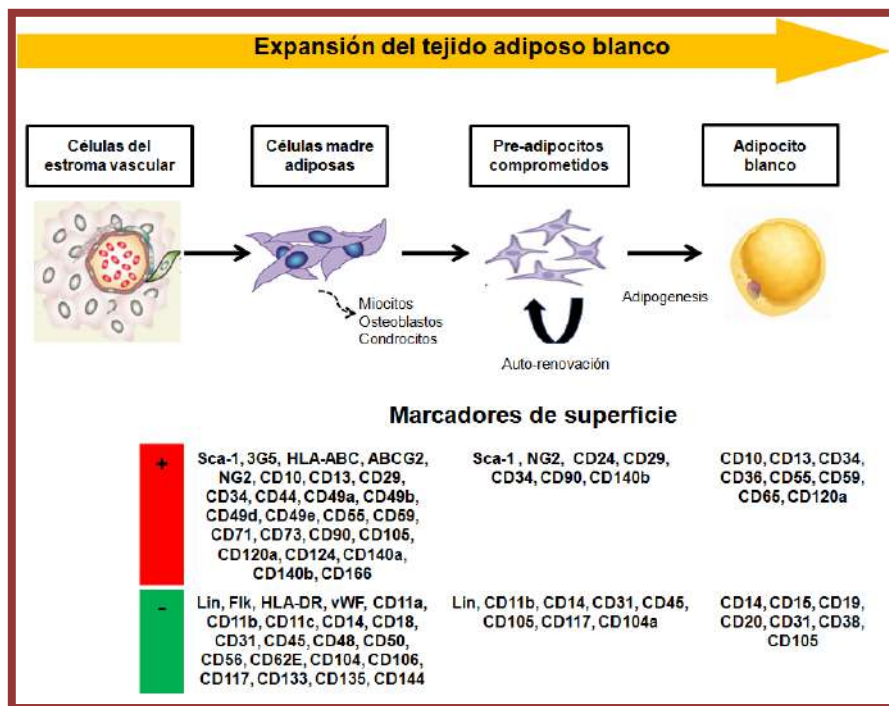


Figura 1. Células involucradas en la diferenciación del tejido adiposo blanco. Marcadores de superficie celular presentes en células madre de tejido adiposo (CMA), pre-adipocitos y adipocitos maduros (figura modificada de Cawthorn *et al.*, 2012).

2. 3 Factores y vías de señalización involucradas en la diferenciación de adipocitos.

Existen múltiples factores extracelulares que pueden influir sobre el proceso de adipogénesis y que han sido ampliamente estudiados, incluyendo factores como las proteínas morfogénicas óseas (BMPs, por sus siglas en inglés), factor transformante de crecimiento β (TGF- β), factor de crecimiento tipo insulina 1 (IGF1), interleucina 17 (IL-17), factor de crecimiento de fibroblastos 1 y 2 (FGF1, FGF2), así como la señalización de las proteínas Wnts (contracción del inglés *Wingless* e *Int*) (Lowe *et al.*, 2011).

Proteínas de la familia del Factor de Crecimiento Transformante β (TGF- β)

Las BMPs pertenecen a la superfamilia de los factores de crecimiento transformante beta (TGF- β). Estas proteínas son reguladores de procesos de desarrollo. Por ejemplo, se sabe que BMP4 compromete a las CMMs a diferenciarse en adipocitos. Por otro lado, los efectos de BMP2 son más complejos y dependen de la presencia de otras moléculas de señalización. Aunque BMP2 tiene poco efecto sobre la adipogénesis, su interacción con otros factores, tales como, TGF- β e insulina estimulan la adipogénesis de células madre embrionarias (CMEs). Cuando BMP2 se administra en bajas concentraciones a células de la línea C3H10T1/2 (ver apartado 2. 6) se estimula la adipogénesis; por el contrario, a altas concentraciones se favorece el desarrollo a condrocitos y osteoblastos. Asimismo, en pre-adipocitos de la línea celular 3T3-F442A (ver apartado 2. 6) BMP2 tiene poco efecto sobre la adipogénesis; sin embargo, cuando se suministra con ácido retinoico para estimular la proliferación celular, BMP2 inhibe la adipogénesis y aumenta la expresión de marcadores tempranos de osteoblastos (Rosen and MacDougald, 2006).

Como se mencionó anteriormente, el proceso de diferenciación de los adipocitos involucra dos fases: el compromiso de células madre a pre-adipocitos y la diferenciación a adipocitos maduros. Huang *et al.*, (2009) estudiaron en células madre de la línea C3H10T1/2 las dos vías de señalización activadas por BMPs (la vía de Smad y p38-MAPK) para inducir la adipogénesis. Ellos observaron que al exponer a estas células a diferentes concentraciones de BMP2/4 se induce la expresión del

mARN de los receptores membranales BMP2r y BMP1A, así como un aumento en la fosforilación de Smad1/5/8, Smad1 y p-38; estos cambios son acompañados de un aumento gradual en los niveles de aP2 (proteína 2 de adipocitos), lo cual indica la inducción del compromiso celular. Por lo cual, concluyeron que BMP2/4 actúa a través del complejo de receptores membranales BMP2r:BMP1A para activar, mediante fosforilación, la vía de señalización BMP/Smad y BMP/p38 MAPK lo cual induce que la célula se comprometa al linaje de adipocitos (Figura 2).

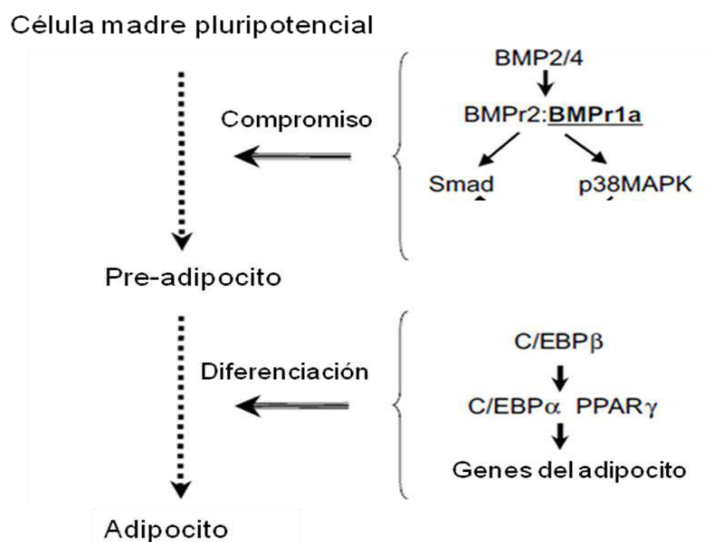


Figura 2. Compromiso del linaje de adipocitos y diferenciación terminal. Figura modificada de Huang *et al.*, (2009).

Aunado a lo anterior, en otras investigaciones en donde se estudió la influencia que tenía BMP4 sobre la expresión de genes adipogénicos, como *Pparg* y *Cebpa* (ver apartado 2. 4), durante la diferenciación *in vitro* de pre-adipocitos derivados de tejido adiposo visceral y subcutáneo de ratones macho de la cepa C57BL/6; se encontró que el incremento en la expresión de *Cebpa* en la diferenciación de pre-adipocitos viscerales y subcutáneos es independiente del tratamiento con BMP4. Por el contrario, se encontró que *Pparg* aumenta su expresión durante la diferenciación de pre-

adipocitos solo en presencia de BMP4 en los preadipocitos viscerales, mientras que su expresión no depende de BMP4 en células subcutáneas (Macotela *et al.*, 2012).

Elsen *et al.*, (2013) comprobaron los efectos de BMP4 y BMP7 sobre la adipogénesis de células madre de tejido adiposo subcutáneo humano. Ellos encontraron que al exponer estas células a BMP4/7 se expresaban patrones génicos que correspondían a adipocitos tipo beige.

Por lo tanto, la respuesta que presentan las células madre a BMPs puede ser dependiente de la concentración, el tipo de BMP a la cual se expone la célula y el tipo celular.

Por otra parte, TGF- β (Factor de crecimiento transformante β , por sus siglas en inglés) es un inhibidor de la diferenciación de pre-adipocitos *in vitro*. Cuando TGF- β se une a su receptor de membrana esto permite que se dé la interacción con proteínas conocidas como mediadoras de la vía de señalización de TGF- β , como Smad2/3, las cuales son fosforiladas. Una vez fosforiladas Smad2/3 pueden formar un complejo estable con Smad4. La proteína Smad4 funciona como un punto de convergencia para las vías de señalización inducidas por los diferentes miembros de la superfamilia de TGF- β . Una vez formado el complejo proteico activo Smad2/3/4 se traslada al núcleo donde funciona como co-activador y regulador de la transcripción de diversos genes que responden a TGF- β (Sosa y Macías 2004).

Se ha observado que la sobreexpresión transgénica de TGF- β en ratones perjudica el desarrollo del tejido adiposo (se presenta un síndrome parecido a la lipodistrofia: tanto la grasa blanca como marrón presentan una reducción severa en el tamaño y se exhiben fibropasia prominente). Por el contrario, el bloqueo de la expresión endógena de TGF- β , ya sea por la expresión de un dominante negativo del receptor a TGF- β o por la inhibición de Smad3, estimula la adipogénesis. Se sabe que Smad3 se une a C/EBPs e inhibe su actividad transcripcional, incluyendo su capacidad para trans-activar el promotor de *Ppar- γ 2* (Rosen and MacDougald, 2006).

Tsurutani *et al.*, (2011) estudiaron el papel fisiopatológico de la señalización de TGF- β /Smad3 en la diferenciación de adipocitos. Analizaron la señalización de TGF- β en tejido adiposo de ratones obesos^{ob/ob} y el papel de TGF- β en la adipogénesis tanto *in vitro* como *in vivo* usando ratones knockout para Smad3. Encontraron que en cultivos

de fibroblastos de embriones de ratón TGF- β inhibía parcialmente la adipogénesis a través de la vía dependiente de Smad3 y que este proceso era independiente de la vía Wnt/ β -catenina; asimismo, encontraron que TGF- β inhibe la expresión *Pparg* y *Cebpa* (factores involucrados en el proceso de adipogénesis). Aunado a esto, observaron que el mRNA de *Tgfb* se encuentra elevado en ratones obesos^{ob/ob}, al igual que p-Smad3 (Smad3 activa); lo cual indica que TGF- β /Smad3 juega un importante papel en la patogénesis de la obesidad, probablemente esté involucrado con el desarrollo de resistencia a la insulina.

Familia Wnt

Otra de las vías que ha sido considerada importante en el proceso de adipogénesis, es la señalización de Wnt. Se ha demostrado que la supresión de esta vía, tanto *in vivo* como *in vitro*, es esencial para que se dé el proceso de adipogénesis (Lowe *et al.*, 2011).

La transducción de las señales de Wnt se lleva a cabo a través de la vía dependiente de β -catenina o independiente de β -catenina. Las Wnt son glicoproteínas que se unen a receptores de membrana los cuales pueden estar acoplados a proteínas G. En la señalización de Wnt dependiente de β -catenina, ésta actúa como el principal co-activador transcripcional potenciando la transducción de señales extracelulares para la activación de genes diana.

La señalización de Wnt inhibe la diferenciación del adipocito *in vitro* mediante el bloqueo de la expresión de *Pparg* y *Cebpa*. Se ha observado que en células de la línea C3H10T1/2 las proteínas Wnt, mediante β -catenina, inducen la expresión de la fosfatasa alcalina que es un marcador de la diferenciación de osteoblastos, mientras que la expresión de Wnt3a inhibe la expresión de *ap2* y *Pparg* (marcadores de adipocitos maduros) en las mismas células. Aunado a esto, en células 3T3-L1 la inducción de la señalización de Wnt inhibe la adipogénesis, en parte a través de desregular el ciclo celular.

Aunado a lo anterior, también existen otros procesos que regulan la adipogénesis; como es la señalización de la vía Hedgehog (Hh), la cual inhibe la

adipogénesis. Asimismo se ha observado que la insulina tiene efectos marcados sobre la adipogénesis: se sabe que en etapas tempranas de la adipogénesis la insulina actúa a través del receptor IGF-1 (Factor de crecimiento tipo insulina 1, por sus siglas en inglés) y que esta relación cambia al avanzar el proceso de adipogénesis y se vuelve dependiente del receptor de insulina (Rosen and MacDougald, 2006; Moseti *et al.*, 2016).

2. 4 Programación transcripcional de la adipogénesis

La programación transcripcional que regula la adipogénesis tiene como actores centrales al receptor nuclear PPAR- γ (receptor activado por proliferador de peroxisomas isoforma gamma) y a miembros de la familia CCAAT/proteína reforzadora de unión (C/EBP). Se sabe que la mayoría de los factores pro-adipogénicos parecen funcionar al menos en parte por la activación de la expresión de PPAR- γ o por su actividad. De hecho C/EBPs y otros factores como los de transcripción tipo Krüppel (KLFs) han demostrado inducir al menos uno de los dos promotores de PPAR- γ (Rosen and MacDougald 2006).

Receptores activados por proliferadores de peroxisomas

Los PPARs pertenecen a la superfamilia de receptores nucleares los cuales funcionan como factores de transcripción activados por ligando. Existen tres subtipos de PPARs: PPAR- α (NR1C1), PPAR- β/δ (NR1C2) y PPAR- γ (NR1C3). PPAR- γ existe bajo dos isoformas: PPAR- γ 1 y PPAR- γ 2 las cuales son el resultado de la edición alternativa de un mismo gen (Carvajal *et al.*, 2007).

La actividad de estos receptores inicia cuando PPAR se une a una secuencia específica de nucleótidos en el DNA conocida como PPRE (PPAR response element: elemento de respuesta a PPAR), la cual se localiza en la región promotora de sus genes blanco. El PPRE está constituido por dos sitios repetidos y separados por un solo nucleótido; en uno de los sitios se une PPAR y en el otro el receptor nuclear de ácido *-cis-retinoico* (RXR) -PPAR:RXR-. En ausencia de ligandos, el heterodímero

interactúa con proteínas correpressoras que reprimen la transcripción de genes blanco; sin embargo, la unión de sus ligandos respectivos (Tabla 1) promueve el reclutamiento de proteínas coactivadoras que promueven el inicio de la transcripción del gen.

Se ha considerado a PPAR- γ como un factor necesario y suficiente para el proceso de adipogénesis, ya que se ha visto que la expresión forzada de PPAR- γ es suficiente para inducir la adipogénesis y, por otra parte, no se ha descubierto ningún otro factor que promueva la adipogénesis en ausencia de PPAR- γ . Esto se debe en parte a que las vías cruciales de la adipogénesis, convergen en la regulación de la expresión o actividad de PPAR- γ .

Ren *et al.*, (2002) estudiaron las diferencias entre las dos isoformas de PPAR- γ (*Ppar-y1* y *Ppar-y2*) en el proceso de adipogénesis, usando represores selectivos de *Ppar-y1* y *Ppar-y2* en células 3T3-L1. Ellos encontraron que al reprimir la expresión endógena de estos dos factores se suprime la adipogénesis y que al inducir de manera exógena a *Ppar-y2* la adipogénesis se restaura; mientras que la expresión exógena de *Ppar-y1* no lo hace. Otras investigaciones muestran que tanto $\gamma 1$ y $\gamma 2$ promueven la diferenciación en fibroblastos nulos para *Ppar-y*; sin embargo, $\gamma 2$ es más eficiente para promover la adipogénesis (Rosen and MacDougald, 2006).

Tabla 1. Principales funciones, ligandos y sitios de expresión de PPAR γ .

Receptor	Sitio de expresión	Funciones biológicas	Ligandos endógenos	Agonistas sintéticos	Antagonistas sintéticos
PPAR- γ	Tejido adiposo, colon, macrófagos	-Adipogénesis. -Almacenamiento de lípidos. -Inflamación	15d-PGJ2 15-HETE 9-HODE 13-HODE	Rosiglistazona Pioglistazona Troglitazona Ciglitazona	GW-9662

(Carvajal *et al.*, 2007; Choi and Bothwell, 2012)

Por otro lado, Wang *et al.*, (2013) en un modelo de ratón nulo para *Ppar-y*- aP2-Cre (animal que presenta delección de PPAR- γ específicamente en tejido adiposo), observaron que estos animales presentaban lipodistrofia, acompañado de hepatoesteatosis (comúnmente conocido como hígado graso), niveles elevados en suero de triglicéridos, insulina y la presencia de hiperglucemia; lo cual sugiere

resistencia a la insulina. Esto muestra la importancia del desarrollo adecuado del tejido adiposo para la homeostasis metabólica y la necesidad de PPAR- γ en este proceso de desarrollo.

Proteínas activadoras de la unión al elemento CCAAT

C/EBPs son proteínas que desempeñan un papel importante en la diferenciación de adipocitos. Pertenecen a una familia de factores de transcripción de proteínas con cremallera de leucina básica altamente conservada, entre los cuales se encuentran las isoformas C/EBP- α , C/EBP- β y C/EBP- δ . C/EBP- α se encuentra expresado principalmente en tejido adiposo, hígado, pulmones, glándula adrenal y placenta. En experimentos *in vitro* se ha observado que C/EBP- α es importante para la diferenciación terminal de los adipocitos, la ausencia de este factor conduce a la resistencia a la insulina y dificulta la formación de tejido adiposo blanco *in vivo*.

De acuerdo a la expresión temporal de los factores C/EBPs durante la adipogénesis se ha postulado que tanto C/EBP- β y C/EBP- δ son los primeros factores inducidos durante la adipogénesis y que posteriormente conducen a la inducción de C/EBP- α , PPAR- γ y el regulador de genes lipogénicos SREBP1 (Proteína 1 de unión a los elementos de respuesta a esteroides, por sus siglas en inglés); por lo cual, estos dos factores juegan un papel importante en la dirección del proceso de diferenciación de adipocitos. La importancia de C/EBP- β y C/EBP- δ se ha demostrado en experimentos de ganancia y pérdida de función, en donde fibroblastos embrionarios de ratones carentes de estos factores eran incapaces de diferenciarse en respuesta a la inducción hormonal. En consecuencia, estas células no expresaron importantes marcadores adipogénicos como C/EBP- α , PPAR- γ aP2/FABP4 (proteína 4 de unión a ácidos grasos, por sus siglas en inglés) (Rosen and MacDougald *et al.*, 2006; Moseti *et al.*, 2016). En contra parte, Tanaka *et al.*, (1997) observaron que en ratones KO para *Cebpb* y *Cebpd* y doble KO para estos factores, había expresión de *Cebpa* y *Pparg*, pero había una reducción en la adipogénesis de fibroblastos embrionarios de estos ratones. Lo cual indica que la inducción de C/EBP- α , PPAR- γ no siempre requiere de

C/EBP- β y C/EBP- δ , pero la co-expresión de C/EBP- α , PPAR- γ no es suficiente para completar la diferenciación de los adipocitos en ausencia de C/EBP- β y C/EBP- δ .

Se sabe que PPAR- γ activa al promotor del gen que codifica para C/EBP- α y viceversa, creando un asa de retroalimentación positiva. Asimismo, estos dos factores inducen la expresión de genes que están involucrados en la sensibilidad a la insulina, lipogénesis y lipólisis; dentro de los cuales están los genes que codifican para: transportador de glucosa GLUT4, aP2/FABP4, lipoproteína lipasa (LPL), perilipina, adiponectina y leptina, así como otros genes involucrados en el desarrollo y maduración de adipocitos (Lowe *et al.*, 2011). Wang *et al.*, (2015) observaron que en ratones KO para *Cebpa* la adipogénesis embrionaria es independiente de este factor, pero dependiente de PPAR- γ ; Asimismo, observaron que C/EBP- α no es vital para la supervivencia del adipocito en tejido adiposo blanco adulto de ratón, sin embargo la adipogénesis de este tejido depende de C/EBP- α .

Dado lo anterior, posiblemente el asa de retro-alimentación positiva de estos dos factores en modelos *in vivo* suceda en tejido adiposo de ratones en etapa adulta; lo cual también indicaría que en etapas tempranas del crecimiento existen otros reguladores importantes de la adipogénesis, además de PPAR- γ .

2. 5 Otros factores que influyen sobre la adipogénesis.

Estudios recientes han observado que el reclutamiento selectivo de diferentes acetiltransferasas de histonas (HAT) y deacetilasas de histonas deacetilasas (HDAC) por PPAR- γ permiten que este factor de transcripción tenga efectos divergentes sobre diferentes promotores. Factores como PAXIP1 regulan la expresión de PPAR- γ y la expresión de C/EBP- α estimulada por PPAR- γ en células embrionarias de ratón y en la adipogénesis de preadipocitos 3T3-L1; controlando el reclutamiento de la metiltransferasa de histona H3K4, así como de la ADN polimerasa II a sus promotores (Lowe *et al.*, 2011).

Por otra parte, el estrés oxidativo y la generación de especies reactivas de oxígeno (ERO) influyen sobre la función de varias proteínas involucradas en la adipogénesis: ERO regulan al factor 1 inducible por hipoxia (HIF1, por sus siglas en

inglés) el cual puede inhibir a PPAR- γ . Por otra parte, la proteína TXNIP (proteína tiorredoxina de interacción) ha mostrado tener una influencia sobre el desarrollo de los adipocitos *in vivo*. La pérdida de TXNIP, la cual inhibe la tiorredoxina (proteína antioxidante), incrementa la adipogénesis en cultivos de pre-adipocitos 3T3-L1 (Lowe *et al.*, 2011).

Otro de los factores que influyen sobre la adipogénesis es la vascularización adecuada. De forma concomitante con la adipogénesis, factores angiogénicos, como FGF-2, factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) y factor de crecimiento humano son producidos, principalmente, por precursores de adipocitos, induciendo una robusta respuesta angiogénica. Por lo cual, el crecimiento del tejido adiposo requiere de una interacción entre células endoteliales y preadipocitos para guiar la migración celular, a través de vías dependientes de FGF y VEGF. Cuando se presenta la sobreexpresión de una forma de PPAR- γ de dominancia negativa o el bloqueo de la señalización del receptor 2 de VEGF por anticuerpos neutralizantes se inhibe la adipogénesis a través del deterioro tanto del crecimiento del tejido adiposo como de la angiogénesis (Pellegrinelli *et al.*, 2016).

2. 6 Modelos de adipogénesis

La mayoría de los estudios sobre adipogénesis se han llevado a cabo en modelos *in vitro*, usando líneas celulares específicas como las 3T3-L1, una línea celular ampliamente aceptada como modelo de adipogénesis, la cual puede diferenciarse de manera eficiente en adipocitos maduros por estimulación hormonal, y tiene la capacidad de acumular triglicéridos hasta adquirir las propiedades de un adipocito maduro. Esta línea celular se deriva de fibroblastos embrionarios de ratón 3T3. Otro de los modelos *in vitro* utilizados en investigaciones referentes al proceso de diferenciación de adipocitos es la línea celular 3T3-F442A, la cual es un clon establecido a partir de fibroblastos de ratón 3T3; estas células pueden diferenciarse en adipocitos maduros después de entrar en estado de quiescencia celular bajo condiciones apropiadas de cultivo (Green and Kehinde 1975; Castro-Muñozledo *et al.*, 2002).

Asimismo, la línea celular C3H10T1/2 que a diferencia de las dos anteriores, fue establecida para estudiar el proceso de compromiso de las CMM; se estableció a partir de embriones de ratón C3H de 14-17 días. Estas células muestran morfología fibroblastoide en cultivos celulares y su función es similar a las CMM (Tang *et al.*, 2004).

Por otra parte, se conoce poco sobre los eventos que regulan la adipogénesis *in vivo*. Uno de los estudios sobre adipogénesis llevados a cabo en un modelo *in vivo* fue el realizado por Soukas *et al.*, (2001): el objetivo de este estudio fue encontrar diferencias y similitudes transcripcionales en el proceso de adipogénesis *in vitro* e *in vivo*. Se caracterizó la regulación de la expresión de genes durante la diferenciación de células de la línea 3T3-L1 (modelo *in vitro*), y se comparó la expresión de genes en la fracción estromo vascular (que incluye pre-adipocitos) con la de adipocitos maduros de tejido adiposo visceral de ratones hembra de la cepa C57Bl/6J (modelo *in vivo*). Este grupo observó que existe una programación más compleja de expresión génica de la que se conocía hasta el momento, tanto en la diferenciación de adipocitos *in vitro* como *in vivo*. Asimismo, encontraron que varios genes que son marcadores de la diferenciación de adipocitos incrementan su expresión en paralelo con la de C/EBPs y PPAR- γ , particularmente en células 3T3-L1 diferenciadas; además de que grandes grupos de genes son expresados en niveles mucho más elevados e incluso exclusivamente *in vivo*. Por el contrario, encontraron un gran grupo de genes expresados *in vitro* que no se expresan o se expresan pobremente *in vivo* en adipocitos o pre-adipocitos.

Estos hallazgos son importantes para el entendimiento de los procesos de adipogénesis, sin embargo tienen un sesgo en su modelo *in vivo*, ya que el análisis fue realizado en la fracción estromo vascular del tejido adiposo. Esta fracción no solo contiene pre-adipocitos sino que además incluye células endoteliales, fibroblastos, macrófagos y otras células; lo cual indica que la expresión de los genes reportados no se debe solo a células grasas (pre-adipocitos/ adipocitos).

3. ANTECEDENTES ESPECIFICOS

3. 1 Diferencias entre depósitos grasos

Existen diferencias en cuanto a la expansión del tejido adiposo entre los depósitos grasos viscerales y subcutáneos. La expansión del TA visceral (lo cual se asocia con obesidad central) está asociada con riesgos de desarrollar resistencia a la insulina, diabetes mellitus tipo 2, síndrome metabólico e incrementa la mortalidad. Por el contrario, la expansión del TA subcutáneo, principalmente en la región glúteo-femoral, parece asociarse con una mejora en la sensibilidad a la insulina y un bajo riesgo a desarrollar diabetes tipo 2 y enfermedades cardiovasculares. Aunado a esto, se ha observado que el trasplante de TA subcutáneo de ratones delgados a la cavidad visceral de ratones normales de la cepa C57BL/6 da como resultado un efecto metabólico benéfico: disminución de peso corporal y de la masa de grasa total, disminución de los niveles de glucosa en suero, así como una mejora en el test de tolerancia a la glucosa e incremento en la sensibilidad a la insulina; por el contrario, el trasplante de grasa visceral a la cavidad subcutánea no muestra efectos metabólicos benéficos; lo cual indica que los efectos benéficos de la grasa subcutánea se pueden deber a las propiedades intrínsecas de sus células adiposas (Stolic *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2005; Tran and Kanh 2010).

Asimismo, la hipertrofia de los adipocitos es un rasgo distintivo de la expansión del tejido adiposo blanco en la obesidad. En seres humanos el tamaño de los adipocitos está positivamente correlacionado con la intolerancia a la glucosa e hiperinsulinemia (Pellegrinelli *et al.*, 2016). Recientes estudios en ratones macho de la cepa C57BL/6 de 5 semanas de edad a los cuales se les proporcionó una dieta alta en grasas (DAG) durante 16 semanas reveló que la frecuencia de muerte de adipocitos incrementa progresivamente de 0.1% en una semana a ~16% en la semana 12 en TA visceral, coincidiendo con un incremento en la expresión en el tejido adiposo de genes marcadores de macrófagos (F4/80 y CD11c), y de genes asociados a inflamación como: TNF- α , MCP-1, IL-10; así como un incremento en la resistencia a la insulina. En la semana 16 se alcanzó una muerte celular de adipocitos de ~80%, coincidiendo con

una acelerada macroesteatosis hepática. En la semana 20 se restableció el número de adipocitos con la presencia de pequeños adipocitos, coincidiendo con una reducción en la muerte de adipocitos. Asimismo, en TA subcutáneo la muerte celular se observó hasta la semana 12 y se mantuvo $\leq 3\%$ (Strissel *et al.*, 2007). Esto es comparable con altas tasas de proliferación y diferenciación para que la masa total de grasa continúe aumentando a medida que la obesidad avanza. Lo cual añade complejidad al modelo de obesidad, dado que la hipertrofia es seguida por la muerte celular y finalmente por la aparición de nuevos adipocitos (Rosen and Spiegelman 2014).

En investigaciones recientes se ha observado que en un modelo murino, denominado “AdipoChaser”, el principal proceso que contribuye a la expansión del tejido es la hipertrofia, al menos durante el primer mes de una alimentación alta en grasas. Sin embargo, después de 4 semanas de una DAG se inicia un proceso de adipogénesis preferentemente en TA visceral, mientras que en TA subcutáneo ocurren niveles insignificantes de adipogénesis (Wang *et al.*, 2013). Usando el modelo de ratón adiponectin-CreER;mT/mG para seguimiento de adipocitos recién formados, se observó que hay un incremento en la proliferación de adipocitos exclusivamente en TA visceral tras 8 semanas de exposición a una dieta alta en grasas (Jeffery *et al.*, 2015).

Por otra parte, dos estudios independientes han investigado las diferencias intrínsecas entre pre-adipocitos de TA visceral vs subcutáneo, así como las diferencias intrínsecas entre adipocitos maduros de TA visceral vs subcutáneo.

Gesta *et al.*, investigaron el papel que desempeñan genes del desarrollo en el origen de la obesidad y la distribución de grasa. Para ello extrajeron tejido adiposo epididimal (visceral) e inguinal (subcutáneo) de ratones de la cepa C57BL/6, separaron los adipocitos y la fracción estroma vascular (FEV) y extrajeron el mRNA de ambas fracciones para su posterior análisis usando un microarreglo de oligonucleótidos. Identificaron 197 genes expresados diferencialmente tanto en adipocitos como en la FEV de TA visceral y subcutáneo, 11 de ellos juegan un papel importante en el desarrollo temprano y patrones de especificación: *Tbx15*, *Shox2*, *En1*, *Sfrp2* y *HoxC9* se expresaron en altos niveles en TA subcutáneo; mientras, *Nr2f1*, *Gpc4*, *Thbd*, *HoxA5*, *HoxC8* y *Hrmt1/2* se expresaron en altos niveles en TA visceral. Los patrones de

expresión que presentan estos genes son independientes de factores extrínsecos como el flujo sanguíneo, niveles de oxigenación y nutrientes, y otros factores intersticiales.

Por otra parte, se correlacionaron los niveles de expresión que presentan estos 12 genes en TA visceral y TA subcutáneo de humano contra el índice de masa corporal y la distribución de grasa (relación cadera/cintura). Se encontró que la expresión de *HoxA5*, *Gpc4* y *Tbx15* varía con la distribución de grasa y que la expresión de los dos últimos puede ser un excelente marcador de acumulación de grasa visceral; por lo tanto altos niveles de expresión de *Tbx15* y *Gpc4* en TA subcutáneo y en bajos niveles en TA visceral parece estar relacionado con un incremento en la relación cadera/cintura y por extensión puede ser correlacionado con un alto riesgo de complicaciones metabólicas y cardiovasculares.

Ellos concluyen que en conjunto los datos sugieren que los genes implicados en el desarrollo embrionario y patrones de especificación en ratón y humanos juegan un papel potencialmente importante en el desarrollo de los adipocitos y la distribución de grasa corporal.

El otro estudio corresponde al realizado por Macotella *et al.*, (2012). El objetivo de este estudio fue identificar las diferencias intrínsecas en células precursoras de adipocitos (CPAs), provenientes de diferentes depósitos de tejido adiposo blanco. Ellos aislaron CPAs de tejido adiposo epididimal e inguinal de ratones de la cepa C57BL/6 que representan los TA visceral y subcutáneo, respectivamente. Extrajeron el ARNm de las CPAs y lo analizaron usando un microarreglo de oligonucleótidos; por otra parte, sometieron a diferenciación celular a las CPAs aisladas, usando un coctel de inducción de la diferenciación y pre-tratando las células con o sin BMP-4 o BMP-2.

Observaron que las CPAs de TA subcutáneo a los 7 días de la inducción de la diferenciación celular se diferencian más del 90% de las células, conteniendo grandes depósitos de lípidos. Por el contrario, menos del 20% de los CPAs de TA visceral se diferencian usando el mismo protocolo; aunado a esto, cuando las CPAs de TA visceral se someten a un pre-tratamiento con BMP-4 se observa una diferenciación de más del 90% de las células conteniendo grandes depósitos de lípidos.

Asimismo, encontraron que en la diferenciación de CPAs de TA subcutáneo y de TA visceral el incremento en la expresión de C/EBP- α es independiente del tratamiento

con BMP4; sin embargo, *Pparg* aumenta su expresión durante la diferenciación de CPAs de TA visceral solo en presencia de BMP4, mientras que su expresión no depende de BMP4 en células subcutáneas. Aunado a esto, observaron que BMP-2 actúa de forma similar que BMP-4 en CPAs de TA visceral, pero que no tiene efectos adicionales sobre CPAs de TA subcutáneo. También encontraron que los genes que codifican para CEBP- α y PPAR- γ se expresan en altos niveles en CPAs de TA subcutáneo con respecto a las viscerales. Adicionalmente, observaron que los genes para GATA2 y TGF- β 2 se expresan en altos niveles en CPAs de TA visceral con respecto a las subcutáneas, los cuales son genes anti-adipogénicos. Los genes *Lif*, *Igf1*, *Igf1bp7*, *Ctgf*, *Mgp*, *Trib2*, *Pgn1/Bgn*, los cuales son marcadores de células mesenquimales de médula ósea, se expresan en altos niveles en CPAs de TA visceral.

Aunado a lo anterior, observaron que tras la inducción de una DAG, en ratones de la misma cepa, aumenta el número de CPAs tanto en el TA subcutáneo como en el TA visceral; sin embargo, tras 2-4 semanas de dieta alta en grasas hay un incremento drástico del número de células no precursoras de adipocitos en el TA visceral, mientras que en el TA subcutáneo el número de células no precursoras de adipocitos permanece constante.

Ellos concluyen que tanto el TA visceral como el TA subcutáneo tienen importantes diferencias en términos de la expresión de genes, la respuesta a factores de crecimiento y la habilidad para diferenciarse, y la capacidad para expandirse en respuesta a factores genéticos y ambientales. Asimismo, las CPAs del TA subcutáneo están más comprometidas a diferenciarse, mientras que las CPAs de TA visceral tienen un perfil anti-adipogénico, por lo cual requieren factores de crecimiento, tales como BMP-4 y BMP-2, para diferenciarse.

Por lo tanto, se ha propuesto que la hipertrofia ocurre preferentemente en TA visceral, mientras que la hiperplasia es característica de TA subcutáneo. Sin embargo, en un estado crónico de obesidad puede ser que la adipogénesis en TA subcutáneo se vea deteriorada, mientras que en TA visceral se active para poder expandir el tejido graso, lo cual puede contribuir a complicaciones metabólicas (Pellegrinelli *et al.*, 2016).

De acuerdo a lo anterior, para poder entender el por qué la expansión excesiva del TA visceral y subcutáneo se asocian con riesgos metabólicos distintos, es

importante el estudio de las características intrínsecas de cada tipo de TA. Por lo cual, en el presente proyecto nos preguntamos si existen diferencias en los mecanismos transcripcionales involucrados en la formación de adipocitos entre el TA visceral y subcutáneo. Para ello, en el presente proyecto propusimos identificar, mediante un análisis *in silico*, genes y redes génicas potencialmente involucradas en el proceso de adipogénesis *in vivo*, además de dilucidar si existen diferencias en dichas redes entre el tejido adiposo visceral y el subcutáneo.

3. 2 Microarreglos y análisis bioinformático

El análisis *in silico* es un proceso de análisis experimental que se realiza únicamente por computadora, ya sea partiendo de datos experimentales de laboratorio o a partir de simulación computacional, con la finalidad de teorizar posibles modelos funcionales *in vivo*.

Dentro de los datos experimentales de laboratorio que se pueden analizar mediante este procedimiento son los obtenidos a partir de microarreglos; los cuales son un conjunto de oligonucleótidos (fragmentos de 13-25 nucleótidos que corresponden a un gen específico) de genes ordenados en una pequeña superficie. Este tipo de herramientas permite cuantificar la abundancia de miles de secuencias de oligonucleótidos, bajo una condición dada, en un tejido o tipo celular de una determinada especie animal (Ramírez y col., 2003).

Los datos obtenidos del microarreglo son sometidos, primeramente a un pre-análisis conocido como *análisis de la matriz* (exploración de datos, control de calidad y pre-procesamiento) y posteriormente se someten al *análisis y modelado de datos* (análisis bioinformático): que consiste en técnicas estadísticas y aprendizaje automático que se aplican sobre los datos ya pre-procesados para la extracción de conocimiento. Las técnicas estadísticas son habitualmente empleadas como primera aproximación al análisis de expresión de microarreglos de genes; sin embargo, resultan limitadas por el volumen y la naturaleza de los datos. De este modo, se hace necesaria la aplicación de técnicas de Aprendizaje Automático (*Machine Learning*) y Minería de Datos (*Data Mining*). De especial interés y extensión dentro de las técnicas de aprendizaje

automático para el análisis de microarreglos resultan las técnicas de agrupamiento para encontrar grupos funcionales de genes.

Por otra parte, la producción masiva de datos está incrementando vertiginosamente el volumen de datos disponibles y, por lo tanto, el número de descubrimientos biológicos deducidos del análisis de estos datos. En este contexto, en el que el volumen de información disponible desborda la capacidad humana de procesamiento y asimilación de la misma, se hace imprescindible la utilización de herramientas (minería de datos) para extraer el conocimiento de forma automática de la literatura. Para el estudio de la regulación genética resulta de especial interés la detección de entidades biológicas como genes, proteínas y enfermedades en los textos biomédicos y la identificación de interacciones y asociaciones entre estas entidades descritas en la literatura (Cano 2010).

4. JUSTIFICACIÓN

Dilucidar la programación transcripcional involucrada en la adipogénesis *in vivo* así como las diferencias existentes en la formación de adipocitos entre el tejido adiposo visceral y subcutáneo, permitirán no solo entender la biología celular básica detrás de la formación de una célula grasa, sino que además nos permitirán alcanzar una mejor comprensión de los distintos riesgos metabólicos que se asocian con la expansión de estos dos tipos de tejido adiposo.

5. HIPÓTESIS

La regulación de la expresión de genes durante la adipogénesis *in vivo* difiere entre el tejido adiposo visceral y el subcutáneo.

6. OBJETIVO GENERAL

Identificar, por medio de análisis *in silico* de dos microarreglos independientes genes y redes génicas del tejido adiposo visceral y subcutáneo que se asocien con los procesos de adipogénesis.

7. OBJETIVOS PARTICULARES

- Explorar de las bases de datos (microarreglos) correspondientes a preadipocitos y adipocitos maduros obtenidos de tejido adiposo visceral y tejido adiposo subcutáneo.
- Analizar los datos de los microarreglos: análisis estadístico inferencial (pre-adipocitos vs adipocitos, visceral y subcutáneo); determinación de expresión significativa y expresión diferencial marginal; análisis estadístico descriptivo: determinación de patrones de expresión.
- Analizar la expresión diferencial depósito dependiente e independiente.
- Analizar las redes génicas depósito dependiente e independiente.

8. MATERIAL Y MÉTODOS

8. 1 Bases de datos—Las bases de datos de expresión génica en pre-adipocitos y adipocitos, tanto viscerales como subcutáneos, de ratones de la cepa C57Bl/6 se obtuvieron de dos estudios: Gesta *et al.*, 2006 (adipocitos maduros) y Macotela *et al.*, 2012 (pre-adipocitos). Se unieron las dos bases de datos para formar una sola base de datos (matriz de expresión: la cual está formada por columnas que corresponden a los grupos celulares: pre-adipocitos y adipocitos, tanto viscerales como subcutáneos; y filas correspondientes a los niveles de expresión de cada gen), a partir de la cual se construyó el modelo de adipogénesis *in vivo*.

8. 1. 1 Modelo de adipogenesis *in vivo*: nos referimos a este modelo como de adipogenesis *in vivo* puesto que las células a partir de las cuales se obtuvieron las bases de datos de expresión génica, se diferenciaron en el tejido adiposo del animal integro, en condiciones fisiológicas, y tuvieron una manipulación mínima antes de la evaluación de su perfil de expresión génica.

8. 2 Exploración y análisis de bases de datos de microarreglos—La exploración y análisis de la matriz de expresión se realizó en el programa *RStudio v0.99.903 – July 18th, 2016*.

8. 2. 1 Análisis estadístico inferencial: el análisis de la expresión diferencial significativa entre adipocitos vs pre-adipocitos, tanto de tejido adiposo visceral como de subcutáneo, se calculó usando la prueba t-Student: los genes con valor $p < 0.05$ fueron considerados con expresión diferencial significativa. El análisis de la expresión diferencial marginal se calculó a partir de las veces de cambio en la expresión de genes entre los adipocitos vs los pre-adipocitos: genes con veces-cambio > 2 se consideraron como regulados al alza y con veces-cambio < 2 como regulados a la baja; esto es genes que aumentan su expresión cuando un pre-adipocito se diferencia en adipocito y genes que disminuyen su expresión cuando un pre-adipocito se diferencia en adipocito, respectivamente (reflejo de la regulación génica durante la adipogénesis).

8. 2. 2 Análisis estadístico descriptivo: se realizó un análisis aglomerativo jerárquico, a los genes regulados al alza y a la baja en cada tejido, para determinar grupos de genes que presentan patrones similares de expresión. Los parámetros utilizados fueron: \log_2 de los niveles de expresión, para el cálculo de la distancia entre genes se utilizó el coeficiente de correlación de Pearson, la agrupación de genes se realizó a partir del método de medias.

8. 3 Identificación de genes depósito dependiente e independiente—Una vez que se determinaron los genes que se regulan a la baja y al alza en cada depósito graso, se compararon las listas de genes para determinar los genes, regulados a la baja y al alza, que se expresaban solamente en TAV o en TAS (depósito dependiente) y aquellos genes que eran comunes en los dos tejidos grasos (depósito independiente, comunes). Para la búsqueda de genes adipogénicos y factores de transcripción (FT) se usaron las bases de datos: Animal TFDB (Zhang *et al.*, 2012), NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/biosystems/198299>).

8. 4 Análisis de ontología de genes— Se realizó un análisis de enriquecimiento tanto para genes regulados a la baja y al alza, depósito dependiente y depósito independiente. Este análisis se llevó a cabo en la plataforma ToppFun (<https://toppgene.cchmc.org/enrichment.jsp>).

8. 5 Construcción de redes de co-expresión génica— A partir del análisis ontológico se seleccionaron FT asociados a algún proceso biológico; a partir de estos FT se realizó la construcción de redes de co-expresión génica siguiendo el procedimiento descrito por Zhang *et al.*, (2005): a partir de los niveles de expresión de cada gen se busca una medida de concordancia en la expresión génica con una correlación de Pearson; posteriormente, se crea una matriz de adyacencia (matriz cuadrada que se utiliza como una forma de representar relaciones binarias), a partir de la cual se crea la red de co-expresión génica. Se busca que las redes de co-expresión génica se acercaran a una red libre de escala, para lo cual se realizó un análisis estadístico

basado en el test de Kolmogorov-Smirnov, en donde un valor p (K.s- p) alto indica que la red estudiada es libre de escala. La construcción de la redes se realizó en el programa *RStudio* v0.99.903 – July 18th, 2016 y la visualización y manejo de las mismas se llevó a cabo en el programa Cytoscape 3.4.0.

8. 6 Redes de asociación de proteínas funcionales—La construcción de las redes de asociación de proteínas funcionales se realizó en la plataforma <http://string-db.org>. Para todas las redes se buscó una puntuación de interacción mínima requerida (minimum required interaction score): alta confianza 0.700; y más de 50 interacciones.

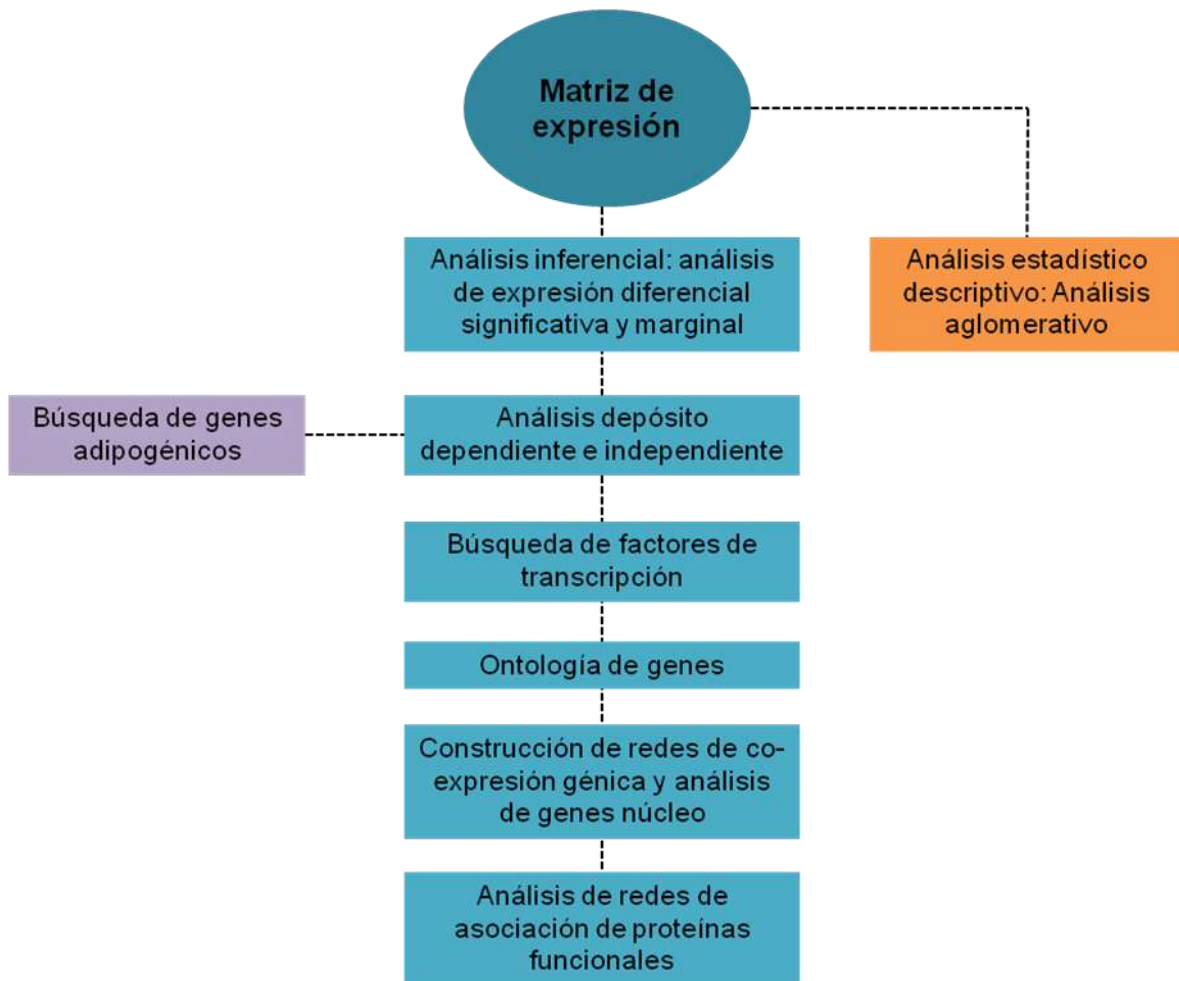


Figura 3. Protocolo de análisis del modelo de adipogénesis *in vivo*

9. RESULTADOS

9. 1 Perfil de la expresión de genes en pre-adipocitos y adipocitos maduros de tejido adiposo visceral y subcutáneo.

La matriz de expresión final determinó un total de 5964 genes para el análisis, tanto en TA visceral como en TA subcutáneo. Se compararon los cambios en la expresión de genes entre los pre-adipocitos y los adipocitos maduros, como un reflejo de la adipogénesis *in vivo*. Encontramos que en células de TA visceral 1931 genes fueron regulados al alza (veces-cambio >2 , expresados como adipocitos maduros entre pre-adipocitos; A/PA), 2996 genes fueron regulados a la baja (veces-cambio <2), mientras que 1037 genes permanecieron sin cambio en su expresión (Figura 4A). Por otra parte, en las células del TA subcutáneo 1701 genes fueron regulados al alza , 2703 genes se regularon a la baja y 1560 genes permanecieron sin cambio (Figura 4C).

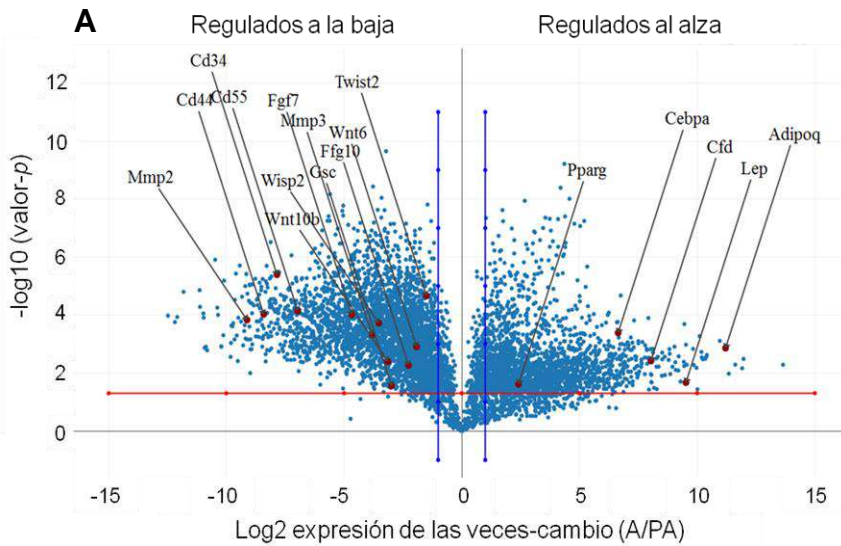
Esto permite establecer un modelo teórico basado en datos biológicos de adipogénesis *in vivo* (Figura 5). Los *pros* de este modelo es que parte de células adiposas primarias (pre-adipocitos y adipocitos maduros); además de que las células se diferenciaron en el animal en condiciones fisiológicas y que el análisis bioinformático aplicado es irrestricto e imparcial. Asimismo, los *contras* del modelo son que solo se tienen dos ventanas del proceso de adipogénesis: inicial y final; solo se utilizó información de dos microarreglos y no hay validación experimental de la información.

Para verificar la veracidad del modelo teórico de adipogénesis *in vivo*, tanto en TA visceral como en TA subcutáneo, se analizó la regulación de marcadores de células madre mesenquimales y de pre-adipocitos y adipocitos maduros, de acuerdo al análisis diferencial y marginal (Cawthorn *et al.*, 2012b). Se observó que los genes para Cd34, Cd55, Fgf7, Mmp2, Wnt10b, Wisp2, Twist2, Gsc, Mmp3 y Fgf10; los cuales son considerados marcadores de células madre mesenquimales y pre-adipocitos, se regulan a la baja tanto en TA visceral como en TA subcutáneo. Mientras que Fgf2 sólo se regula a la baja en TA subcutáneo, y Cd44 y Wnt6 sólo en TA visceral.

Por otra parte, los genes para Ppar γ , Cebp α , Leptina, Adipoq, Adipsina (CFD) , los cuales son considerados marcadores de adipocitos maduros, se regulan al alza

tanto en TA visceral como en TA subcutáneo, respectivamente (Cawthorn *et al.*, 2012b) (Tabla 2).

Tejido adiposo visceral



Tejido adiposo subcutáneo

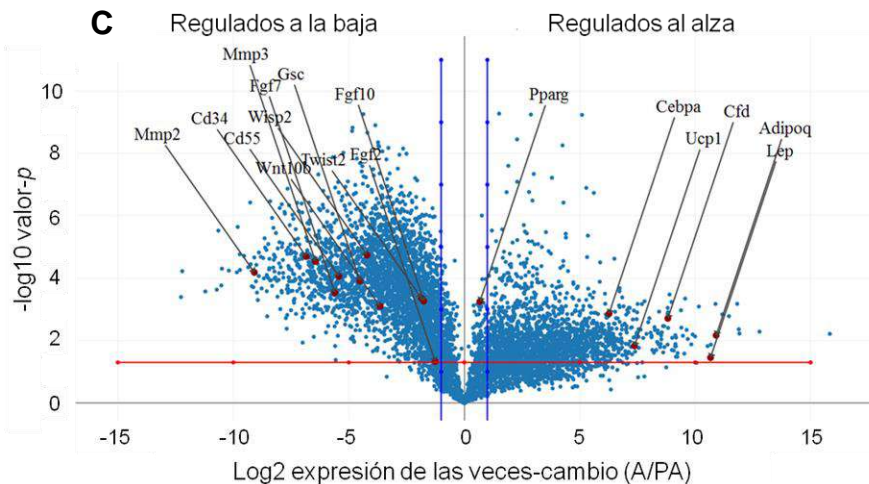


Figura 4. Perfil de expresión génica en la adipogénesis de tejido adiposo visceral y subcutáneo. Grafico de volcán de los cambios en la expresión de genes en adipocitos maduros vs pre-adipocitos en tejido adiposo visceral (A) y subcutáneo (C). El eje X = log₂ de las veces de cambio en Adipocitos maduros/pre-adipocitos (A/PA). El eje Y = significancia estadística. La línea roja horizontal representa $p=0.05$. Las líneas azules verticales representan 2 veces de cambio. Representación grafica de pastel de los genes alterados durante la adipogénesis de tejido adiposo visceral (B) y subcutáneo. Regulados a la baja “veces-cambio” < 2, Regulados al alza “veces-cambio” > 2, significancia estadística $p<0.05$.

Tabla 2: Expresión génica de marcadores de pre-adipocitos y adipocitos en TAV y TAS.

	TAV		TAS	
	Veces de cambio	Valor <i>p</i>	Veces de cambio	Valor <i>p</i>
Regulados a la baja				
<i>Cd34</i>	0.004	0.000	0.008	0.002
<i>Cd55</i>	0.008	0.000	0.023	0.000
<i>Fgf7</i>	0.039	0.000	0.02	0.000
<i>Mmp2</i>	0.001	0.000	0.001	0.000
<i>Wnt10b</i>	0.114	0.004	0.079	0.000
<i>Wisp2</i>	0.087	0.000	0.054	0.000
<i>Twist2</i>	0.353	0.000	0.274	0.000
<i>Gsc</i>	0.126	0.027	0.043	0.000
<i>Mmp3</i>	0.071	0.000	0.011	0.000
<i>Fgf10</i>	0.208	0.005	0.297	0.000
<i>Fgf2</i>			0.416	0.046
<i>Cd44</i>	0.002	0.000		
<i>Wnt6</i>	0.265	0.001		
Regulados al alza				
<i>Pparγ</i>	5.326	0.024	1.6	0.001
<i>Cebpa</i>	100.114	0.000	77.235	0.001
<i>Leptina</i>	736.520	0.021	1623.801	0.035
<i>Adipoq</i>	2365.614	0.001	1924.017	0.006
<i>Adipsina</i>	263.186	0.003	451.0	0.001

De manera cualitativa, la figura 6 muestra que los patrones adipogénicos de expresión génica que presenta el TA visceral con respecto al TA subcutáneo, son muy similares. Asimismo, el análisis aglomerativo jerárquico-correlación Pearson de los genes regulados a la baja y al alza en cada tejido (para eliminar los efectos de confusión de la variación de fondo se seleccionaron solo aquellos genes en los cuales el nivel de expresión fuera mayor a 100) identificó 64 aglomerados de los genes regulados a la baja y 8 aglomerados de los genes regulados al alza en TA visceral. Por otra parte, se identificaron 64 aglomerados de los genes regulados a la baja y 7 aglomerados de los genes regulados al alza en TA subcutáneo (Tabla 3).

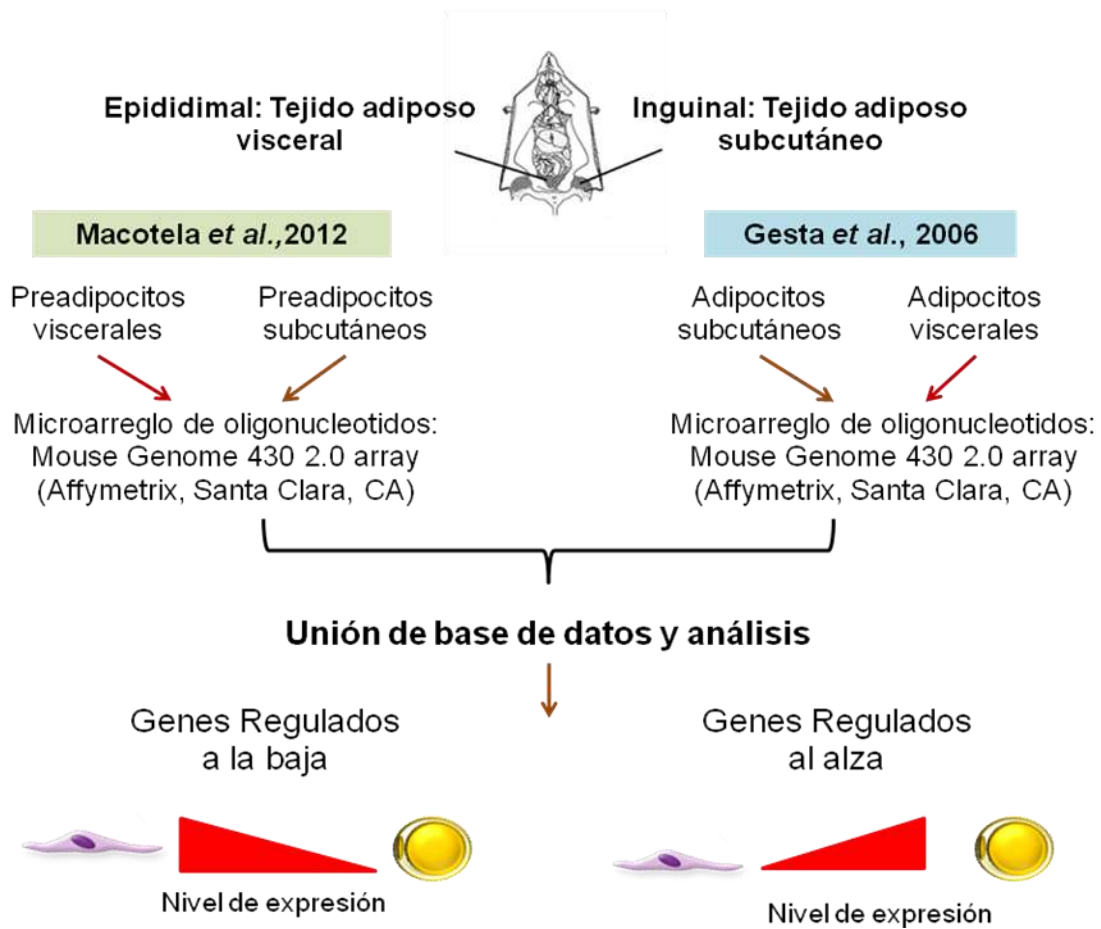


Figura 5. Desarrollo del modelo teórico basado en datos biológicos de adipogénesis *in vivo*.

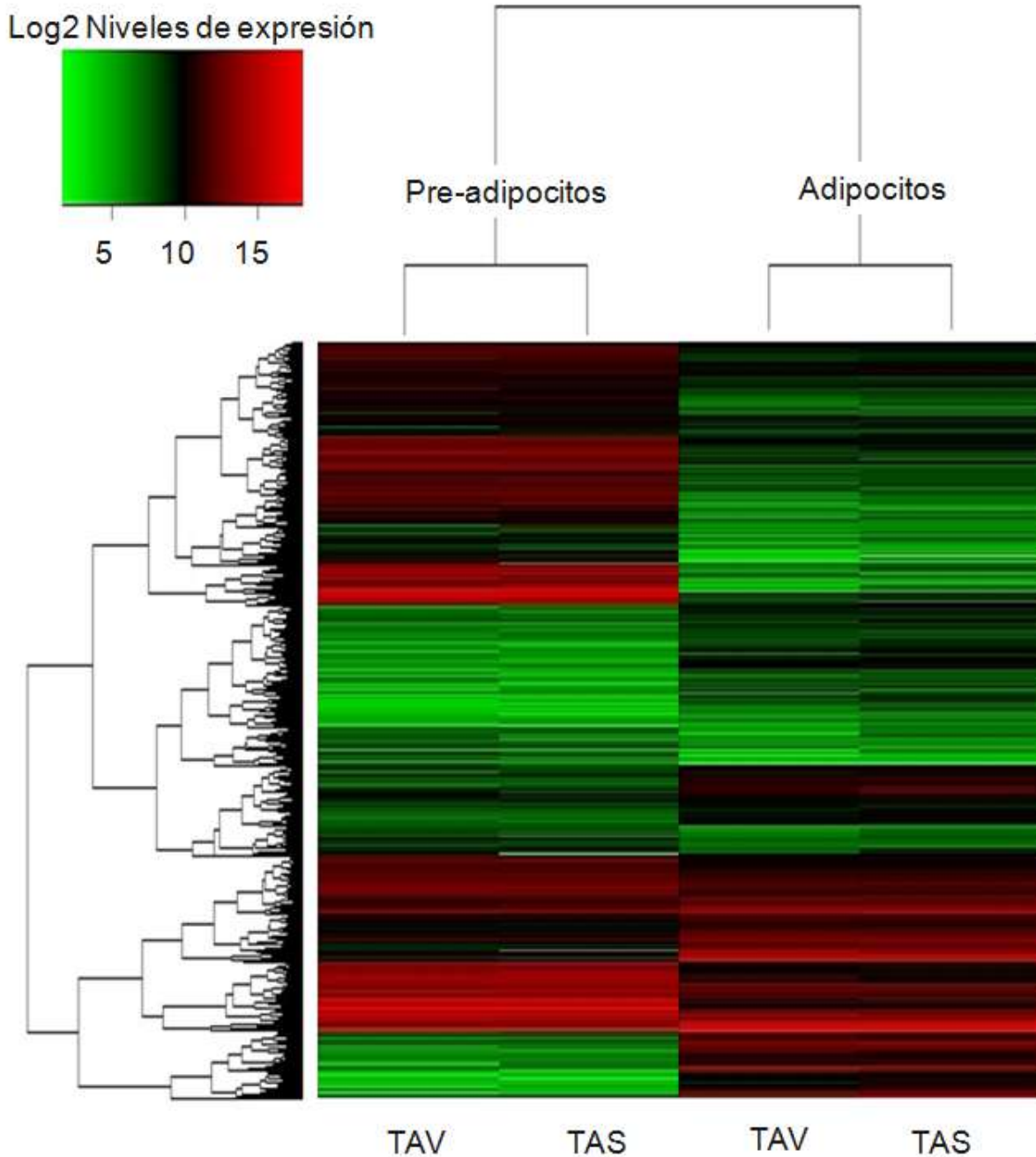


Figura 6. Heatmap de la matriz de expresión génica. La gráfica muestra 5964 genes. Se graficó el \log_2 de la media de los niveles de expresión génica de preadipocitos y adipocitos maduros, tanto de tejido adiposo visceral como de subcutáneo. El heatmap se realizó a partir de la medida de asociación euclídeana.

Tabla 3. Análisis aglomerativo jerárquico-correlación de Pearson de los genes alterados durante la adipogénesis en tejido adiposo.

Tejido adiposo	Tipo de regulación	Número de genes	Número de aglomerados
Visceral	Regulados a la baja	2967	64
	Regulados al alza	1865	8
Subcutáneo	Regulados a la baja	2697	64
	Regulados al alza	1646	7

Los datos muestran el número de genes con expresión diferencial significativa ($p < 0.05$) para cada tejido y tipo de regulación, los cuales tienen un nivel de expresión mayor a 100. El número de aglomerados para cada condición se obtuvo a partir de aquellos genes cuya correlación en sus niveles de expresión fue $r > 0.8$.

9. 2 Análisis de la expresión diferencial depósito dependiente e independiente.

Se observó que del total de los genes regulados a la baja tanto en tejido adiposo visceral como subcutáneo (número de genes = 3147) el 13.98% se encuentran únicamente expresados en TA visceral, el 5.40% se expresa únicamente de TA subcutáneo y el 80.29% se encuentran comúnmente expresados en los dos tejidos (Figura 7A); asimismo, los niveles de expresión de los genes regulados a la baja en común (\log_2 de la expresión de veces-cambio (A/PA)) entre los dos tejidos muestran una correlación significativa ($r=0.898$, $p < 0.05$) (Figura 7B); lo cual indica que estos genes no solamente son depósito-independiente sino que el patrón de expresión génica global de estos genes es similar entre depósitos.

Por otra parte, la figura 6C muestra que del total de los genes regulados al alza en los dos tejidos (número de genes = 2269) el 27.45% se expresa únicamente en TA visceral, el 17.80% se expresa solamente en TAS y el 53.41% se expresa en ambos tejidos. La figura 7D muestra una correlación significativa ($r=0.9$, $p < 0.05$) entre los dos tejidos con respecto a los niveles de expresión de los genes regulados al alza en común.

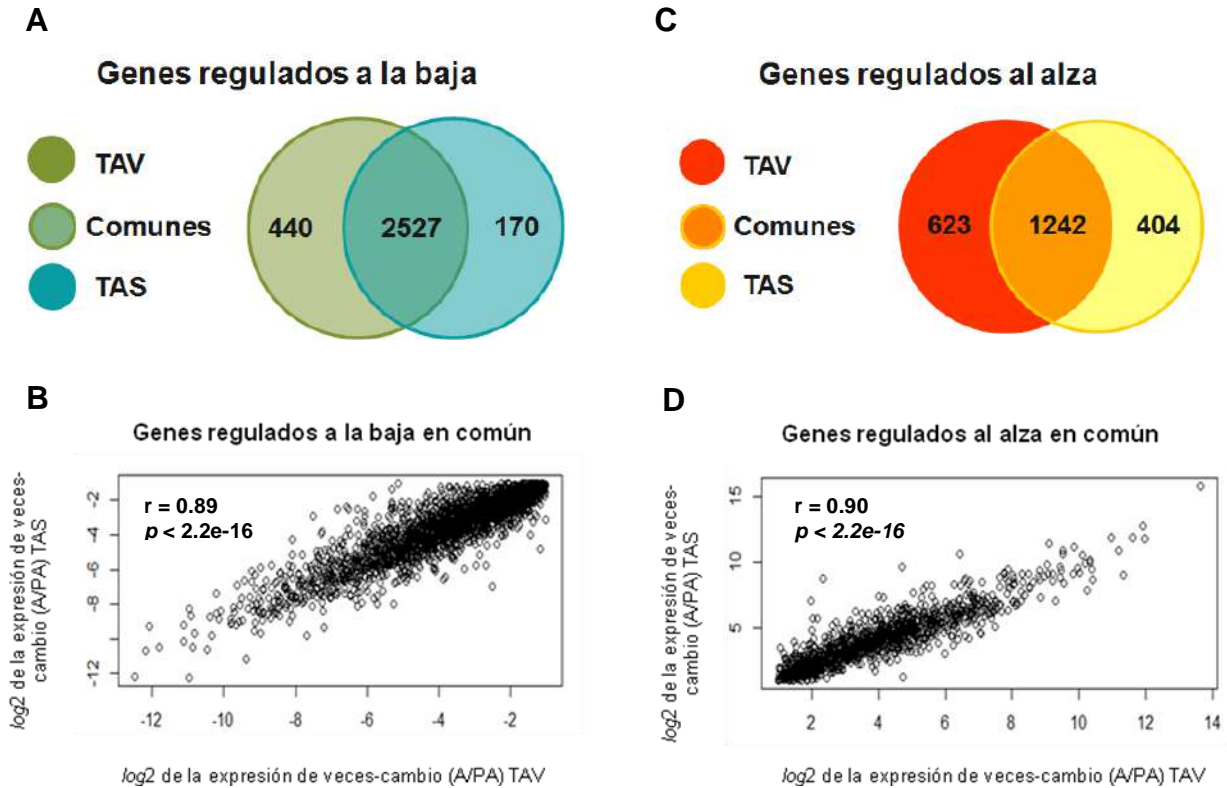


Figura 7. Genes significativamente alterados durante la adipogénesis en tejido adiposo. A y C) Diagramas de Venn de los genes significativamente alterados por la adipogénesis en tejido adiposo visceral y subcutáneo y genes en común entre los dos tejidos. B y D) Comparación entre la expresión de veces-cambio (Adipocito maduro/Pre-Adipocito; A/PA) de los genes en común entre los dos tejidos.

Tanto los genes regulados a la baja y al alza en ambos tejidos fueron mapeados en dos bases de datos de genes involucrados en la adipogénesis. Se encontró que los genes FT Ahr, Egr2, Gata2, Hmga1, Id3, Mef2c, Nr3c1 y Smad3 se regulan a la baja tanto TA visceral en como TA subcutáneo. En los genes regulados al alza se encontró que los FT Creb1, Ddit3, Ebf1, Gata3, Mef2a, Nr2f1, Rora, Sreb1 aparecen únicamente en TA visceral y que Foxc2 aparece únicamente en TA subcutáneo (tabla 3 y tabla 4).

Tabla 3. Genes adipogénicos regulados a la baja de TA visceral y subcutáneo

Comunes		TA visceral	TA subcutáneo	
Nombre del gen	Gen	----	Nombre del gen	Gen
Aryl-hydrocarbon receptor	*Ahr	----	Ciliary neurotrophic factor receptor	Cntfr
Bone morphogenetic protein 2	Bmp2		Twist gene homolog 1 (Drosophila)	Twist1
Bone morphogenetic protein 4	Bmp4			
CUG triplet repeat, RNA binding	Cugbp1			
Dishevelled, dsh homolog 1 (Drosophila)	Dvl1			
Early growth response 2	*Egr2			
Frizzled homolog 1 (Drosophila)	Fzd1			
GATA binding protein 2	*Gata2			
Growth differentiation factor 10	Gdf10			
High mobility group AT-hook 1	*Hmga1			
Wingless related MMTV integration site 10b	Wnt10b			
Inhibitor of DNA binding 3	*Id3			
Interleukin 6	Il6			
Insulin receptor substrate 1	Irs1			
Lipin 2	Lpin2			
Myocyte enhancer factor 2C	*Mef2c			
Macrophage migration inhibitory factor	Mif			
Nuclear receptor coactivator 2	Ncoa2			
Glucocorticoid receptor (Nuclear receptor subfamily 3, group C, member 1)	*Nr3c1			
Phosphoenolpyruvate carboxykinase 2 (mitochondrial)	Pck2			
Retinoblastoma-like 1 (p107)	Rbl1			
Secreted frizzled-related sequence protein 4	Sfrp4			
MAD homolog 3 (Drosophila)	*Smad3			
Wingless-related MMTV integration site 5B	Wnt5b			

Genes mapeados en las bases de datos <http://www.bioguo.org/> AnimalTFDB y <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/biosystems/198299>. * Corresponden a factores de transcripción en la especie.

Tabla 4. Genes adipogénicos regulados al alza de TA visceral y subcutáneo

Comunes		TA visceral		TA subcutáneo	
Nombre del gen	Gen	Nombre del gen	Símbolo del gen	Nombre de gen	Gen
Adiponectin, C1Q and collagen domain containing	Adipoq	cAMP responsive element binding protein 1	*Creb1	Forkhead box C2	*Foxc2
Agouti related protein	Agrp	DNA-damage inducible transcript 3	*Ddit3	Uncoupling protein 1 (mitochondrial, proton carrier)	Ucp1
Bernardinelli-Seip congenital lipodystrophy 2 homolog (human)	Bscl2	Early B-cell factor 1	*Ebf1	Sparc/osteonectin, cwcv and kazal-like domains proteoglycan 1	Spock1
CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), alpha	*Cebpa	GATA binding protein 3	*Gata3		
Myocyte enhancer factor 2D	*Mef2d	Myocyte enhancer factor 2A	*Mef2a		
Nuclear receptor co-repressor 2	*Ncor2	COUP-TF1(Nuclear receptor subfamily 2, group F, member 1)	*Nr2f1		
LXR- α (Nuclear receptor subfamily 1, group H, member 3)	*Nr1h3	Prostaglandin I2 (prostacyclin) synthase	Ptgis		
delta-like 1 homolog (Drosophila)	Dll1	RAR-related orphan receptor alpha	*Rora (Nr1F1)		
GATA binding protein 4	*Gata4	Sterol regulatory element binding factor 1	*Srebf1		
Hypoxia inducible factor 1, alpha subunit	*Hif1a				
Insulin receptor substrate 3	Irs3				
Leptin	Lep				
Lipase, hormone sensitive	Lipe				
Lipin 1	Lpin1				
Myocyte enhancer factor 2B	*Mef2b				
Prolactin receptor	Prlr				
Phosphoenolpyruvate carboxykinase 1, cytosolic	Pck1				
Peroxisome proliferator activated receptor alpha	*Ppara				
Peroxisome proliferator activated receptor gamma	*Pparg (Nr1C1)				
Resistin	Retn				
Retinoid X receptor alpha	*Rxra (Nr2B1)				
Solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 4	Slc2a4				
Transcription factor 1	Tcf1				
Transducin-like enhancer of	*Tle3				

split 3, homolog of Drosophila
E(spl)

Wingless-related MMTV
integration site 1

Wnt1

Suppressor of cytokine
signaling 1

Socs1

Signal transducer and
activator of transcription 5A

*Stat5a

Genes mapeados en las bases de datos <http://www.bioguo.org/> AnimalTFDB y <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/biosystems/198299>. * Corresponden a factores de transcripción en la especie.

9. 3 Factores de transcripción (FT) depósito dependiente e independiente involucrados en redes génicas relacionadas con diferenciación celular y desarrollo.

Una vez que se identificaron los genes regulados a la baja y al alza depósito dependiente e independiente, cada grupo de genes se sometió a un análisis ontológico para determinar qué genes estaban involucrados en algún proceso biológico y de esto qué genes se asociaban con procesos de diferenciación celular y desarrollo; aunado a esto también se determinó qué genes eran FT. La sección de suplementos (Apartado B) muestran las tablas con los FT asociados a algún proceso biológico, tanto para genes regulados a la baja como al alza, depósito dependiente e independiente.

Las tablas contienen el *Nombre del gen*, *Símbolo del gen*, *Veces de cambio*: correspondiente a la expresión diferencial marginal (ver apartado 2. 2. 1); *Valor p*: correspondiente a la expresión diferencial significativa (ver apartado 7. 2. 1); y *Aglomerado*: correspondiente al número de aglomerado al cual se asocia el gen (ver apartado 7. 2. 2).

9. 4 Redes de co-expresión génica.

A partir de los FT involucrados en algún proceso biológico se construyeron redes de co-expresión génica (ver suplementos: apartado C). Cada una de las redes se sometió a un análisis de centralidad para determinar genes núcleo: esto es genes que poseen el

mayor número de conexiones con otros genes (tabla 5) y que podrían ser reguladores importantes de cada una de las redes y por lo tanto factores importantes en la programación adipogénica. Se encontró que en TA visceral el FT Shox2 es un gen núcleo que además está asociado a procesos biológicos de desarrollo y diferenciación celular. Por otra parte, se observó que los FT Smad3, Gata4, Mef2d, Rorc son genes núcleo expresados en TA subcutáneo y se asocian a procesos biológicos de desarrollo y diferenciación celular.

Tabla 5. Factores de transcripción-genes núcleo en las redes de co-expresión génica en TA visceral y subcutáneo

Depósito graso	Regulados a la baja	Regulados al alza
Visceral	Mbd4, ^aHic1	Irx3, ^aRora, ^aZic3, ^aNr1i3, Repin1, *Shox2
Subcutáneo	^aTcf3, *^aSmad3	^aNr6a1, ^aIrf8, Neurog1, *^aGata4, *^aMef2d, ^aNr5a1, *^aRorc, ^aTef, Zbed3

Factores de transcripción con el máximo puntaje de centralidad (Score = 1) en las redes de co-expresión génica. * FT relacionados con procesos biológicos de desarrollo y diferenciación celular. ^a Genes que establecen interacciones proteína-proteína

9. 5 Redes de asociación de proteínas funcionales.

Posterior a la identificación de los genes núcleo, se evaluaron las interacciones de estos genes pero a nivel de proteínas (Figuras 8-11). Se observó que en TA visceral los factores de transcripción-genes núcleo (FT-gn) Hic1, Rora, Zic3 y Nr1i3 muestran interacciones con otras proteínas a nivel proteína-proteína. Los FT-gn de TA subcutáneo Tcf3, Smad3, Nr6a1, Irf8, Gata4, Mef2d, Nr5a1, Rorc y Tef muestran interacciones con otras proteínas a nivel proteína-proteína; asimismo, Nr5a1, Gata4 y Mef2d presentan interacciones, proteína-proteína, entre ellos (tabla5).

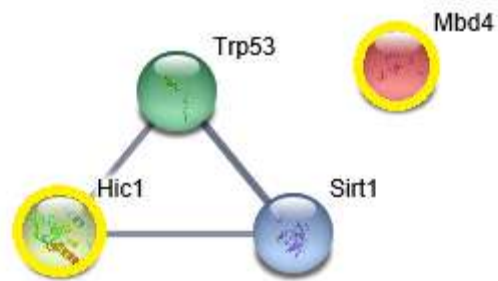


Figura 8. Red de asociación de proteínas funcionales de los genes regulados a la baja en TA visceral. Los genes marcados con amarillo son aquellos identificados como genes núcleo. La red se construyó utilizando la plataforma <http://string-db.org>.

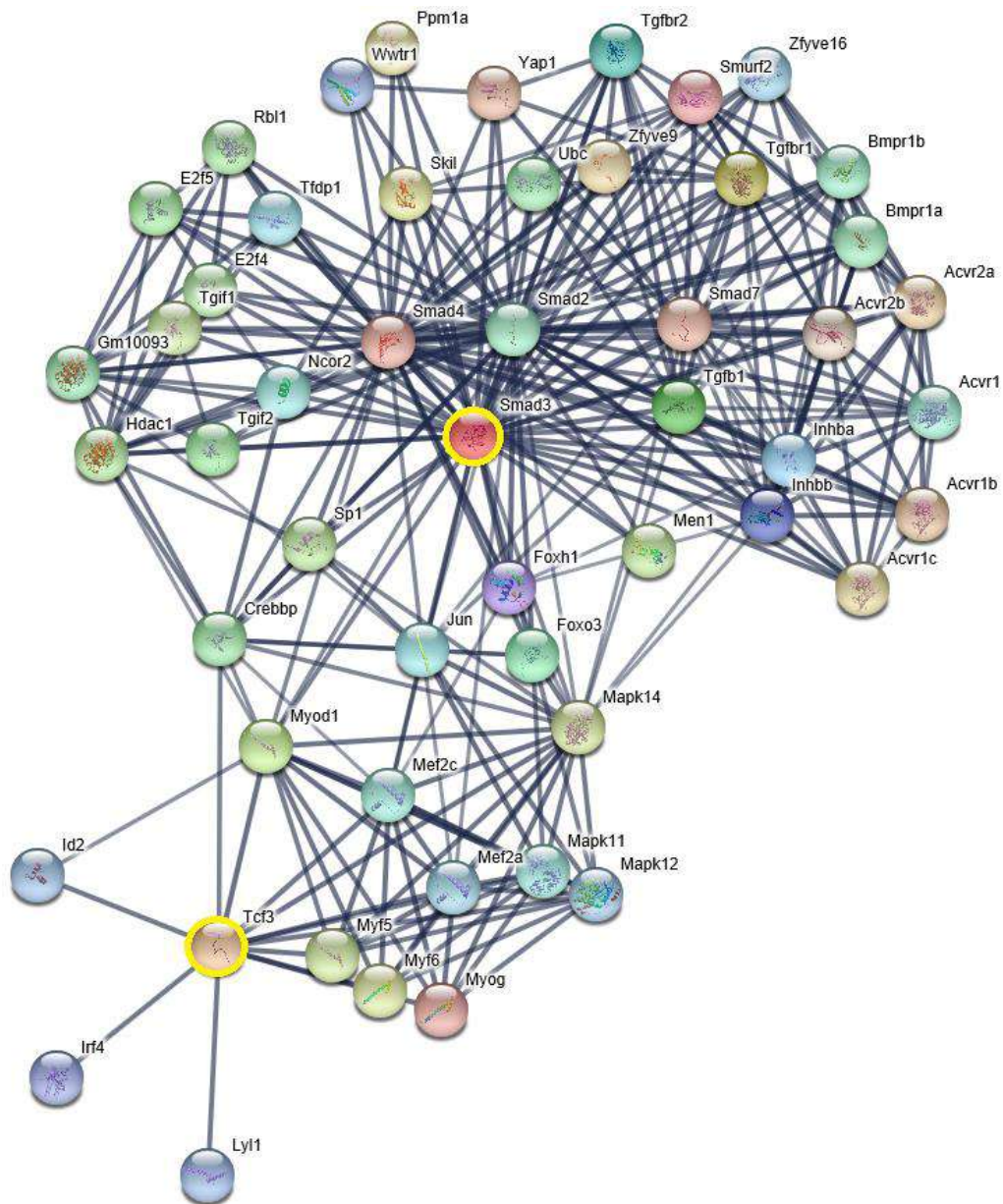


Figura 9. Red de asociación de proteínas funcionales de los genes regulados a la baja en TA subcutáneo. Los genes marcados con amarillo son aquellos identificados como genes núcleo. La red se construyó utilizando la plataforma <http://string-db.org>.

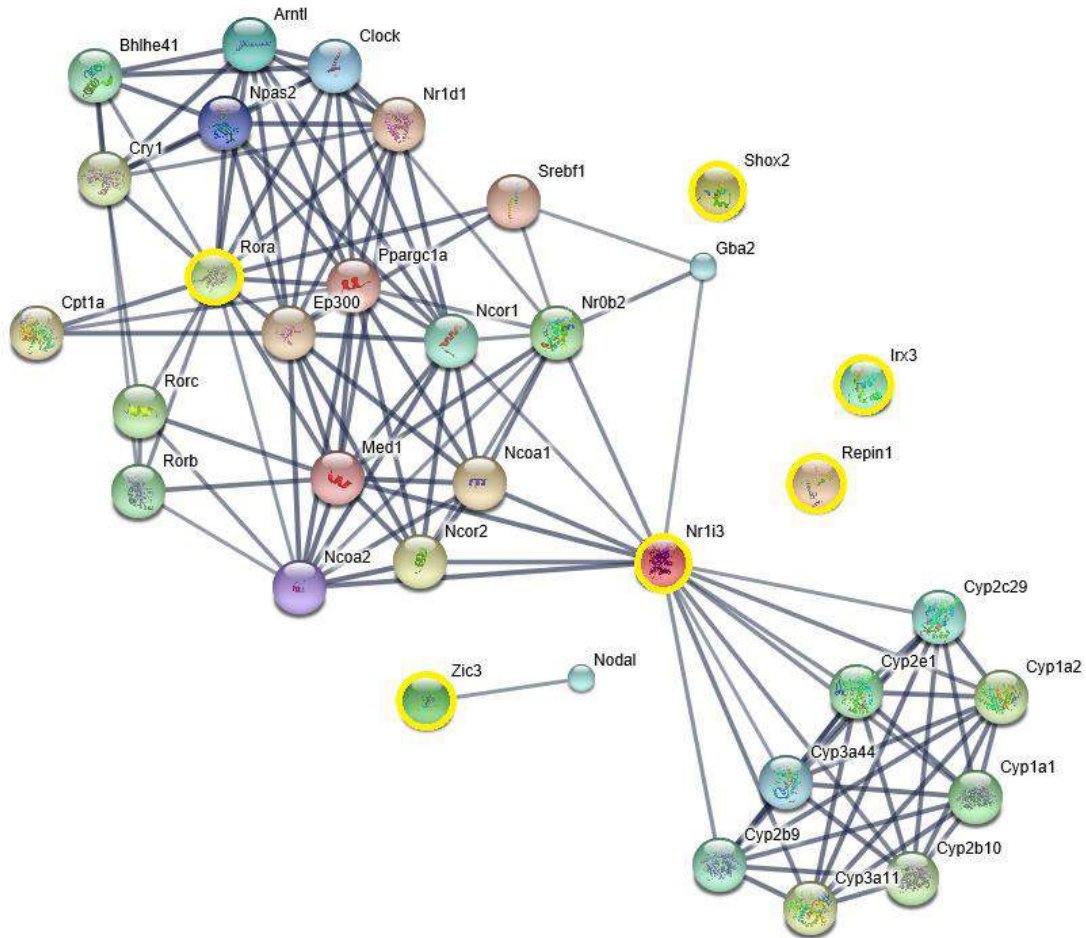


Figura 10.- Red de asociación de proteínas funcionales de los genes regulados al alza en TA visceral. Los genes marcados con amarillo son aquellos identificados como genes núcleo. La red se construyó utilizando la plataforma <http://string-db.org>.

10. DISCUSIÓN

Los microarreglos de oligonucleótidos han sido usados para comparar los patrones de expresión génica entre pre-adipocitos y adipocitos, en modelos tanto *in vitro* como *in vivo*. Aunque algunos estudios indican que los cambios en la expresión génica asociados con la diferenciación de los adipocitos *in vitro* e *in vivo* se superponen, en muchos aspectos son bastante diferentes. Específicamente, existen grandes grupos de genes que son expresados en altos niveles *in vivo* y no se expresan o son pobremente expresados *in vitro* (Soukas *et al.*, 2001). Aunado a esto, también hay pocos estudios *in vivo*, como ya se menciono anteriormente, que abordan la adipogénesis. Por lo cual, en el presente estudio se creó un modelo teórico basado en datos biológicos de adipogénesis *in vivo*, a partir de dos bases de datos de expresión de genes de microarreglos de oligonucleótidos obtenidos de células adiposas primarias. Este modelo sirvió para determinar los cambios en los patrones de expresión génica cuando un pre-adipocito se diferencia en un adipocito maduro en condiciones fisiológicas (no *in vitro*), sus diferencias entre el tejido adiposo subcutáneo y el tejido adiposo visceral, y además identificar genes que están asociados con la adipogénesis.

Como ya antes se mencionó, la señalización de Wnt inhibe la diferenciación del adipocito *in vitro* mediante el bloqueo de la expresión de PPAR- γ y C/EBP- α (Moseit *et al.*, 2015). Cawthorn *et al.*, (2012a) en un estudio sobre los efectos de WNT6, WNT10A y WNT10B sobre la adipogénesis *in vivo* e *in vitro*, observaron que la expresión de los genes para WNT6, WNT10A al igual WNT10B disminuye durante la adipogénesis *in vitro* en células de la línea 3T3-L1 y células bi-potenciales ST2; asimismo en un modelo *in vivo*, la expresión de estos genes se encuentra regulada a la baja en tejido adiposo epididimal de ratones C57BL/6 de 16 semanas de edad. En concordancia con su regulación a la baja durante la adipogénesis, la expresión ectópica de WNT6 y WNT10A inhiben este proceso *in vitro*, en grado similar a WNT10B. Asimismo, observaron que la represión endógena de WNT6, *in vitro*, está asociada con un mayor grado de estimulación de la adipogénesis y el deterioro de la osteoblastogenesis. Por lo cual, mencionan que WNT6 es un regulador endógeno potente del destino de las CMM, más que WNT10A o WNT10B endógenos.

En el presente estudio, en un primer análisis en donde se verificó la veracidad del modelo de adipogénesis (figura 3), se observó que a pesar de que Wnt10b se regula a la baja en TA subcutáneo en mayor grado que en TA visceral, se encontró que Wnt6 se regula a la baja únicamente en TA visceral, lo cual podría indicar que los pre-adipocitos de TA visceral presentan una mayor restricción a la diferenciación, debida a la función autocrina y paracrina de este factor. Lo cual puede ser consistente con lo reportado por Macotela *et al.*, (2012), que las CPAs del TA subcutáneo están más comprometidas a diferenciarse, mientras que las CPAs del TA visceral tienen un perfil anti-adipogénico. Por el contrario, se observó en nuestro estudio que Wnt10a se regula al alza, con mayor acentuación en TA subcutáneo que en TA visceral (veces-cambio 7.27 y 3.40, respectivamente) contrario a lo que observa Cawthorn *et al.*, (2012a); posiblemente como un mecanismo de control paracrino de la adipogénesis en tejido adiposo subcutáneo.

Aunado a lo anterior, UCP-1, la cual es una proteína implicada en el proceso de termogénesis, y que se expresa específicamente en adipocitos marrones y beige; se ha observado que en roedores con exposición prolongada al frío o a la señalización adrenérgica puede provocar la aparición de grupos celulares UCP-1⁺, con morfología semejante a células grasa marrón dentro de depósitos de grasa blanca. La abundancia de estos grupos celulares varía drásticamente entre depósitos, con un mayor número en el tejido graso inguinal y retro-peritoneal y un número mucho menor en tejido graso perigonadal (Rosen and Spiegelman 2014). Nosotros encontramos que la expresión del gen para Ucp-1 se regula al alza únicamente en TA subcutáneo ($vc = 165.575$, $p = 0.014$).

Por lo tanto, estos resultados sirven como una validación de nuestro modelo y de nuestro análisis, ya que confirman diferencias aceptadas y reportadas previamente entre los dos tipos de depósitos grasos.

En nuestro estudio, un primer análisis sobre el patrón global de expresión génica (la forma en cómo se relacionan los niveles de expresión de los 5964 genes de acuerdo a una medida de asociación, euclídeana) tanto de TA subcutáneo como visceral mostró que el perfil global de expresión génica de los pre-adipocitos es distinto del que presentan los adipocitos, tanto para TA visceral como para TA subcutáneo; lo cual es

debido a las diferentes características celulares, tanto morfológicas como bioquímicas entre pre-adipocitos vs adipocitos y que uno es precursor del otro. Sin embargo, los perfiles de expresión génica-global entre TA subcutáneo vs visceral son similares (figura 5). Inclusive, posterior al análisis diferencial y marginal para determinar genes regulados a la baja y genes regulados al alza, en un análisis aglomerativo-jerárquico que determina el número de aglomerados que forman los genes regulados a la baja y alza en cada depósito graso, esto en base a dos medidas de asociación (euclideana, datos no mostrados; correlación-Pearson, tabla 2); se observó que el número de aglomerados entre los dos tejidos era prácticamente idéntico. Esto significa que posiblemente la similitud en la expresión génica-global confiere el fenotipo de célula adiposa independiente del depósito.

Tchkonia *et al.*, (2006) obtuvieron resultados diferentes a nuestro estudio, al menos en cuanto a perfiles de expresión génica entre pre-adipocitos de diferentes depósitos. Ellos se plantearon determinar si los pre-adipocitos de diferentes depósitos de grasa abdominal humana (subcutánea, mesentérica y omental) son distintos. Extrajeron los pre-adipocitos del tejido adiposo a partir de un cultivo que produce poblaciones de pre-adipocitos puros; posteriormente, los pre-adipocitos se sometieron a un análisis genómico mediante un microarreglo para determinar los patrones globales de expresión génica. Ellos identificaron 920 transcritos que diferían entre depósitos, de los cuales 503 variaban entre pre-adipocitos y 462 entre adipocitos diferenciados. A partir de los 503 transcritos que variaban entre pre-adipocitos de diferentes depósitos, encontraron que los perfiles de expresión génica entre pre-adipocitos subcutáneos y mesentéricos eran similares, y que los perfiles génicos de estos dos tipos celulares diferían de los pre-adipocitos omentales, lo cual es un indicativo de que inclusive el TA visceral no es homogéneo. Aunado a esto, observaron que el perfil de expresión de 124 genes implicados en procesos de desarrollo era similar entre pre-adipocitos subcutáneos y mesentéricos, difiriendo del perfil de expresión génica de los pre-adipocitos omentales. Asimismo, para determinar si estas diferencias regionales en la expresión génica son inherentes, los pre-adipocitos se sometieron a inmortalización celular mediante la expresión estable de hTERT. Se observó que después de 40 duplicaciones de la población celular las diferencias en los perfiles de expresión génica

entre depósitos persistían, indicando que los progenitores de los adipocitos de diferentes depósitos de tejido adiposo son de hecho inherentemente diferentes.

Estas diferencias encontradas entre los dos estudios pueden deberse en primer lugar al origen de las células adiposas: nuestro estudio parte de pre-adipocitos y adipocitos maduros de ratones de la cepa C57BL/6 de tejido adiposo epididimal e inguinal y el de Tchkonja *et al.*, (2016) parte de células de humano de tejido adiposo subcutáneo, mesentérico y omental. En segundo lugar, Tchkonja *et al.*, comparan los perfiles de expresión génica únicamente aquellos genes que difieren entre depósitos y de genes relacionados con desarrollo. En nuestro estudio, inicialmente, comparamos genes tanto depósito dependiente como independiente. Sin embargo, a pesar de estas diferencias entre estudios, se observan similitudes entre los patrones de expresión génica tanto de tejido adiposo subcutáneo como visceral. Lo cual podría corroborar la hipótesis de que la similitud en la expresión génica-global confiere el fenotipo de célula adiposa, independiente del depósito.

Cabe recordar que la función principal del tejido graso es almacenar y liberar ácidos grasos en respuesta a las necesidades de balance energético y aunque tanto las funciones metabólicas como no metabólicas del TA varían de acuerdo al depósito graso, al tamaño del depósito y a la distribución de la grasa corporal (Stolic *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2005; Strissel *et al.*, 2007; Tran *et al.*, 2010; Tchkonja *et al.*, 2013); por lo tanto, deben existir ciertos factores que confieran tanto similitud fenotípica como diferencias fenotípicas, en lo cual también podría estar implicada la programación adipogénica. Por lo cual, en este estudio determinamos que genes eran depósito independientes (comunes entre depósitos) y dependientes, tanto para genes regulados a la baja como para los regulados al alza.

El análisis en la expresión génica depósito-dependiente muestra que las diferencias entre depósitos son sutiles, tanto para genes regulados al alza, como para genes regulados a la baja. Se encontró que los genes para *Creb1*, *Ddit3*, *Ebf1*, *Gata3*, *Mef2a*, *Nr2f1*, *Ptgis*, *Rora*, *Srebf1* se regulan al alza únicamente en TA visceral, en nuestro modelo (tabla 4). Se sabe, que el gen para CREB1 codifica para un factor de transcripción que se une como homodimero a elementos de respuesta a AMPc, recientemente ha demostrado ser tanto necesario como suficiente para la adipogénesis

in vitro de células 3T3-L1 (Rosen *et al.*, 2016). EBF1 estimula la adipogénesis en fibroblastos NIH-3T3 y la expresión de un dominante negativo para este factor suprime la diferenciación de pre-adipocitos 3T3-L1 (Rosen and MacDougald, 2006). MEF2A está implicado en el desarrollo muscular, diferenciación neuronal, control del crecimiento celular y apoptosis (Mckinsey *et al.*, 2002). SREBF1 (también conocido como SREBP1) es un regulador de genes lipogénicos; además, este factor de transcripción ha sido considerado como una base pro-adipogénica ya que induce la expresión de PPAR- γ (Rosen and MacDougald, 2006).

Por otra parte, C/EBP homologous protein 10 (CHOP10) también conocido como DNADamage-inducible transcript 3 (DDIT3) se expresa en adipocitos, se sabe que este gen codifica para una proteína que funciona como un inhibidor dominante-negativo formando heterodímeros con otros miembros de la familia de las C/EBPs; parece que suprime la adipogénesis a través de la heterodimerización con C/EBP- β , lo cual suprime la actividad de este factor (Rosen and MacDougald, 2006). GATA3 en conjunto con GATA2 son FT que se unen a secuencias específicas de ADN y están específicamente expresados en precursores de adipocitos en TA blanco, pero no en TA marrón. La expresión de estos FT disminuyen durante la diferenciación de los adipocitos, lo que sugiere que GATA2 y GATA3 ejercen efectos anti-adipogénicos sobre los adipocitos (Sarjeant and Stephens, 2017). NR2F1 (también conocido como COUP-TF1) es un factor de transcripción que está involucrado en el desarrollo temprano, también ha demostrado ser un regulador crítico de la adipogénesis. En células 3T3-L1 se ha observado que los niveles del ARNm de COUP-TF incrementa hasta la inducción de la diferenciación y después disminuye gradualmente durante la diferenciación. Pero no hay una alteración en sus niveles cuando las células son pre-tratadas con un inhibidor de la diferenciación (2,3,7,8 tetrachlorodibenzo tetrachlorodibenzo-p-dioxina); también se observa que hay un incremento de la unión de COUP-TF a un oligómero de la secuencia de unión a PPAR γ 2/RXR (ARE7) (Brodie *et al.*, 1996). Otros estudios han observado que el gen para NR2F1 se expresa en altos niveles en la fracción estroma vascular vs adipocitos de tejido adiposo epididimal de ratones de la cepa C57BL/6 (Gesta *et al.*, 2006). Asimismo, se ha observado que en pre-adipocitos 3T3-L1 RORA se regula al alza durante la diferenciación de los mismos;

sin embargo, la sobre-expresión de este factor inhibe la actividad transcripcional de C/EBP- β , bloqueando la inducción de PPAR- γ y C/EBP- α , resultando en la supresión de la adipogénesis dependiente de C/EBP- β , lo cual indica que es un regulador negativo de la adipogénesis (Ohoka *et al.*, 2009).

Aunque en el TA visceral se expresan genes depósito dependiente pro-adipogénicos, encontramos también la expresión de genes depósito dependiente anti-adipogénicos, los cuales también podrían ser los responsables de la complicaciones metabólicas asociadas con la expansión excesiva de este tejido.

Se encontró que de los genes regulados a la baja: *Cntfr* y *Twist1* se expresaban únicamente en TA subcutáneo. Se sabe que CNTF en roedores reduce la adiposidad y el peso corporal, además mejora los parámetros diabéticos tanto en modelos de obesidad inducida por dieta como en modelos génicos. En adipocitos marrones, se observó que el tratamiento con CNTF activa varias proteínas y vías de señalización metabólicas como STAT3, MAPK, Akt y p70S6k; aunado a esto CNTF potencia la estimulación β 3-adrenérgica de UCP-1, proporcionando la evidencia de un papel periférico en la regulación de la homeostasis energética (White and Stephens 2011); también se ha observado que el tratamiento con CNTF no inhibe la diferenciación de pre-adipocitos 3T3-L1, dado que no disminuye la expresión de adiponectina y PPAR- γ , los cuales son marcadores de adipocitos (White *et al.*, 2008). Esto puede indicar que la expresión del receptor de CNTF (CNTFR) en pre-adipocitos subcutáneos podría inducir la diferenciación de los mismos a adipocitos con propiedades termogénicas.

Por otra parte, Ma *et al.*, (2014) observaron que tanto el transcrito como la proteína para TWIST1, al menos en la diferenciación de pre-adipocitos 3T3-L1, se regulan al alza; asimismo, la interferencia retroviral de la expresión de TWIST1 en pre-adipocitos 3T3-L1 no perjudica la formación de gotas lipídicas, pero esta interferencia aumenta la expresión de PPAR- γ y múltiples adipocinas durante la diferenciación. Aunado a esto, observaron que la expresión del transcrito y la proteína para TWIST1 disminuyen en tejido adiposo subcutáneo de humanos obesos y roedores (C57BL/6 y Wistar) obesos inducidos por dieta. Por lo tanto, concluyen que TWIST1 podría ser un regulador de la expresión génica adipocitaria aunque no es probable que regule la diferenciación. Sin embargo, estos hallazgos nos indican que aunque no podría ser un

regulador directo de la diferenciación de los adipocitos, podría participar como un potenciador de la diferenciación ya que la supresión de este factor aumenta la expresión de PPAR- γ .

Por otra parte, nuestro modelo de adipogénesis mostró que de los genes regulados al alza *Foxc2*, *Spock1* y *Ucp-1*, se expresan únicamente en TA subcutáneo. Cederberg *et al.*, (2001) mostraron que FOXC2 se expresa tanto en TA blanco intrabdominal como en TA marrón interescapular de ratones de la cepa C57BL/6J, y que el ARNm de FOXC2 se expresa mayormente en la fracción de adipocitos maduros con respecto a la FSV, en TA blanco intrabdominal; aunado a esto, observaron que al sobre-expresar de FOXC2 (aP2-*Foxc2*) en ratones (C57BL/6J), los adipocitos de TA blanco intrabdominal incrementan la sensibilidad de la vía de señalización β -adrenérgica-AMPc-PKA, aumentan los niveles de expresión de PGC1, PPAR- α y PPAR- γ ; además esto adipocitos-tg contienen mitocondrias más grandes y su consumo de oxígeno es significativamente más elevado en comparación con adipocitos no transgénicos; lo cual, puede contribuir a inducir un fenotipo del TA blanco que conduzca a la disipación de energía a través el aumento de la β -oxidación y el desacoplamiento energético. También se observó que los ratones que sobre-expresan FOXC2, en adipocitos, presentan un fenotipo delgado y sensible a la insulina.

SPOCK1 es considerado un oncogén que está frecuentemente expresado en varios tejidos cancerosos, se ha demostrado que promueve la proliferación e inhibe la apoptosis de células de glioma U251, posiblemente a través de las vías de señalización PI3K/Akt y Wnt/ β -catenina las cuales son vías de señalización asociadas con la proliferación y metástasis de células cancerosas (Yang *et al.*, 2016); aunado a esto la sobre-expresión de FOXC2 en pre-adipocitos de TA epididimal de ratones macho Kunming potencia la proliferación e inhibe la apoptosis, vía Akt/mTORC1 y ERK/mTORC1; además de bloquear la diferenciación de los pre-adipocitos (Gan *et al.*, 2015).

Por lo cual, en nuestro modelo tanto la regulación a la baja de *Cntfr* como la regulación al alza de *Foxc2* y *Ucp1* (tabla 4) en TA subcutáneo podrían ser los responsables de una adipogénesis, en este tejido, que conduzca a un fenotipo de adipocito metabólicamente-sano y que la expresión a la alza de *Spock1*, *Wnt1* y *Foxc2*

podrían ser los responsables de una menor tasa de muerte celular en TAS como lo observa Strissel *et al.*, (2007) cuando comparan los niveles de muerte de células adiposas entre TA visceral y TA subcutáneo de ratones sometidos a dieta alta en grasas.

Por lo tanto, se observan diferencias en cuanto a la expresión génica entre depósitos, las cuales pueden ser las responsables de la programación adipogénica depósito específica.

Por otra parte, aunque este primer análisis muestra diferencias importantes entre depósitos grasos en cuanto a genes adipogénicos, el objetivo de este estudio fue encontrar reguladores de la adipogénesis tanto en TA visceral como en TA subcutáneo. Las redes de co-expresión génica permiten explorar la funcionalidad de los genes a nivel de sistemas (Zhang *et al.*, 2005), permitiendo localizar posibles reguladores importantes (genes núcleo) de una red génica; lo cual se traduce, en nuestro modelo, como reguladores adipogénicos. Asimismo, un análisis de funcionalidad proteína-proteína permite observar interacciones proteicas de los FT-gn, como un indicativo de su actividad biológica. Encontramos que a nivel proteína-proteína el FT-gn Hic1 regulado a la baja en TA visceral únicamente presentaba interacciones proteína-proteína. HIC1 es conocido como un supresor tumoral y un represor de la transcripción; también se ha observado que reprime la transcripción de FGF-BP1 (proteína 1 de unión al factor de crecimiento de fibroblastos, por sus siglas en inglés; implicada en la angiogénesis tumoral así como en el desarrollo de vasos sanguíneos durante el crecimiento del embrión) mediada por TGF- β (Briones *et al.*, 2006). Por otra parte, solo los FT-gn Smad3 y Tcf3 regulados a la baja en TA subcutáneo presentan interacciones proteína-proteína. SMAD3 es inhibidor de la adipogénesis mediado por TGF- β (Tsurutani *et al.*, 2011). TCF3 es un gen que codifica para la proteína E2A la cual ha demostrado ser necesaria para el nacimiento del linaje de células B; asimismo, es necesario que se alcance un umbral del nivel de la proteína, en momentos específicos, durante el desarrollo del cerebro, para que esto proceda correctamente (Ravanpay and Olson 2008).

De los FT-gn regulados al alza en TA visceral Rora, Zic3 y Nr1i3 presentan interacciones a nivel proteína. ZIC3 es un miembro de la familia de factores de

transcripción ZIC, los cuales están relacionados con las proteínas Gli (factores de transcripción que pueden actuar como activadores o represores de la transcripción, se conocen tres tipos Gli1, Gli2 y Gli3) que son mediadoras de la vía de señalización Hedgehog, una importante vía de desarrollo conservada para el establecimiento de los lados izquierdo-derecho durante la embriogénesis (Haaning *et al.*, 2013). Asimismo, CAR (receptor androstano constitutivo, por sus siglas en inglés) también conocido como NR1I3, participa en la biotransformación hepática y el transporte de fármacos; aunado a esto ha sido considerado como un importante regulador del metabolismo de lípidos y como un modulador de genes involucrados en una diversa gama de procesos fisiológicos que incluyen el crecimiento y diferenciación celular (Chen *et al.*, 2013).

Asimismo los FT-gn regulados al alza en TA subcutáneo: Nr6a3, Nr5a1, Irf8, Tef, Mef2d, Rorc y Gata4 presentan interacciones proteicas. En la diferenciación de pre-adipocitos 3T3-L1 se ha observado que NR6A3, también conocido como GCNF (factor nuclear de células germinales, por sus siglas en inglés), tiene una expresión constitutiva; por el contrario, NR5A1, también conocido como SF-1 (factor 1 esteroideogénico, por sus siglas en inglés), no se expresa durante la adipogénesis de esta línea celular (Fu *et al.*, 2005). GCNF está involucrado en la regulación del desarrollo embrionario y supervivencia, así como en la diferenciación celular (Zechel 2005); mientras que SF-1, mediado por un adenovirus (Adx-bSF-1), en células mesenquimatosas derivadas de tejido adiposo de ratones de la cepa C57BL/6J las conduce a un linaje esteroideogénico, siendo más propensas a producir esteroides suprarrenales y corticoesterona (Gondo *et al.*, 2008). Por otra parte, en la caracterización de sitios hipersensibles a DNasa (zonas accesibles de la cromatina que están relacionadas con la actividad transcripcional) dependientes de la diferenciación de pre-adipocitos 3T3-L1, se encontró que los factores reguladores de interferón (IRFs) tienen motivos de unión a regiones del DNA que flanquean a genes adipogénicos; dentro de los cuales se encuentra el IRF8, también se observó que este factor se expresa en pre-adipocitos 3T3-L1 para luego reprimirse temporalmente antes de volver a expresarse en adipocitos maduros; asimismo, se expresa mayormente en adipocitos maduros vs FSV de ratones de la cepa FVB (Eguchi *et al.*, 2008).

TEF contribuye a la transcripción circadiana de genes que codifican para tiroesterasas de acil-CoA, lo cual conducen a la liberación de ácidos grasos a partir de tioésteres en hígado de ratón (Gachon *et al.*, 2011). MEF2D forma parte de la familia de factores de transcripción ligados a vías de señalización dependientes de calcio para genes responsables de la división, diferenciación y muerte celular (Mckinsey *et al.*, 2002). RORC, también conocido como ROR- γ , muestra distintos patrones de expresión tejido específico; se conocen dos subtipos: ROR- γ 1, el cual se expresa en varios tejidos como hígado, tejido adiposo, músculo esquelético y riñón; ROR- γ t se expresa en pocos tipos celulares del sistema inmune. Se ha observado que ROR- γ t es esencial para el desarrollo de tejidos linfoides secundarios (Jetten 2009).

Por lo tanto, se puede observar en este análisis que el TA visceral posee una regulación adipogénica-negativa, contraria a lo que se observa en TA subcutáneo; el cual presenta una mayor regulación positiva de la adipogénesis. Aunado a esto, posiblemente la adipogénesis de TA subcutáneo conduce a la formación de otros tipos de adipocitos, como adipocitos esteroideogénicos, además de los adipocitos blancos y adipocitos termogénicos.

11. CONCLUSIÓN

En conclusión, existen diferencias intrínsecas en la programación transcripcional entre depósitos; siendo de igual importancia tanto las diferencias en la interacción entre genes, como las diferencias en la expresión génica entre depósitos. Asimismo, proponemos que los genes núcleo o conectores *Mbd4*, *Tgif2*, *Hic1*, *Irx3*, *Rora*, *Zic3*, *Sox15*, *Nr1i3* en TA visceral, y *Tcf3*, *Rxb*, *Samd3*, *Nr6a1*, *Irf8*, *Neurog1*, *Gata4*, *Mef2d*, *Nr5a1*, *Rorc* en TA subcutáneo están involucrados en la programación transcripcional diferencial de la adipogénesis entre TA visceral y subcutáneo, y posiblemente en las diferencias funcionales/metabólicas entre estos dos tejidos adiposos.

Suplementos

Apartado A

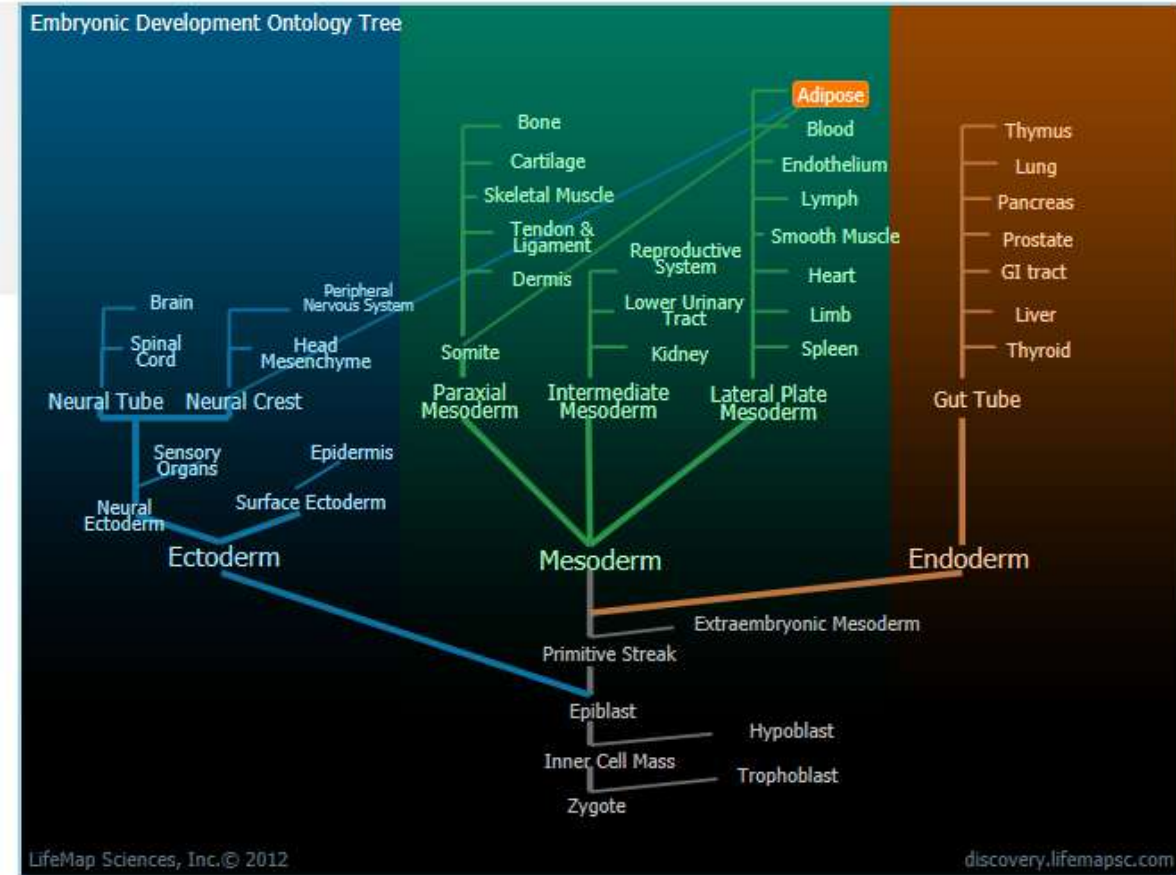


Figura 1S. Embryonic and Postnatal Development of the Adipose Tissue.

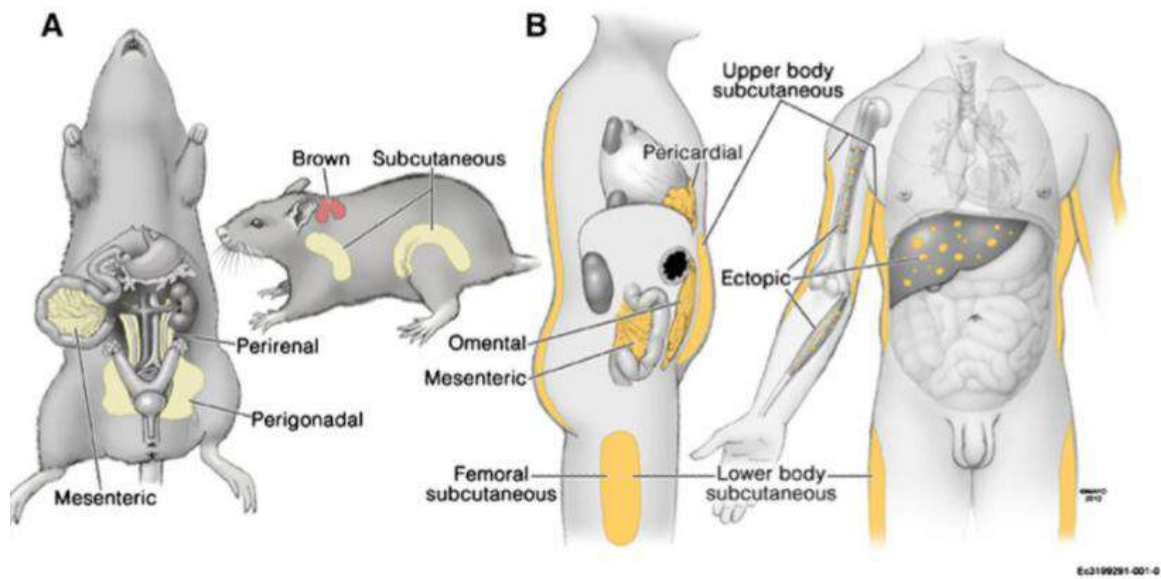


Figure 2S. Anatomy of major fat depots in rodents and humans. Several different names for particular fat depots in rodents (A) and humans (B) are used, as are different groupings of fat depots for physiological and clinical studies. The names and anatomies of the fat depots reviewed here are indicated (Tchkonina *et al.*, 2013)

Apartado B

Nota: las celdas marcadas en amarillo corresponden a los genes de la tabla 5 de la sección de Resultados.

Tabla 1S. Ontología de genes. Factores de transcripción regulados a la baja en TA visceral asociados a algún proceso biológico.

Nombre del gen	Símbolo del gen	Veces de cambio	Valor p	Aglomerado (Cluster)
TGFB-induced factor 2	Tgif2	0.488	0.046	4
T-cell leukemia, homeobox 2	Tlx2	0.150	0.000	4
human immunodeficiency virus type I enhancer binding protein 3	Hivep3	0.188	0.000	5
max binding protein	Mnt	0.298	0.007	8
ets variant gene 1	Etv1	0.091	0.001	9
transcription factor 21	Tcf21	0.011	0.000	11
Wilms tumor homolog	Wt1	0.032	0.000	12
ISL1 transcription factor, LIM/homeodomain	Isl1	0.177	0.025	13
nuclear factor, erythroid derived 2, like 3	Nfe2l3	0.081	0.010	13
vitamin D receptor	Vdr	0.069	0.006	13
forkhead box B1	Foxb1	0.371	0.046	22
interferon regulatory factor 1	Irf1	0.364	0.000	24
AT rich interactive domain 3A (Bright like)	Arid3a	0.130	0.002	26
DMRT-like family B with proline-rich C-terminal, 1	Dmrtb1	0.227	0.008	31
methyl-CpG binding domain protein 4	Mbd4	0.486	0.046	31
Paired box gene 5	Pax5	0.318	0.008	31
sine oculis-related homeobox 3 homolog (Drosophila) /// RIKEN cDNA E130112M24 gene	Six3	0.360	0.015	31
paired like homeodomain factor 1	Prop1	0.261	0.005	32
GLI-Kruppel family member GLI1	Gli1	0.335	0.002	34
Homeo box B9	Hoxb9	0.283	0.048	36
homeo box A13	Hoxa13	0.343	0.027	37
neurogenic differentiation 1	Neurod1	0.188	0.041	37
forkhead box F2	Foxf2	0.110	0.006	38

homeo box D9	Hoxd9	0.450	0.006	38
LIM homeobox protein 9	Lhx9	0.175	0.002	40
Homeo box A3	Hoxa3	0.383	0.000	45
aristaless related homeobox gene (Drosophila)	Arx	0.027	0.000	47
pre B-cell leukemia transcription factor 2	Pbx2	0.466	0.009	49
nuclear receptor subfamily 1, group H, member 4	Nr1h4	0.318	0.000	50
high mobility group AT-hook 2	Hmga2	0.265	0.005	58
AF4/FMR2 family, member 2	Aff2	0.182	0.000	59
D site albumin promoter binding protein	Dbp	0.337	0.044	59

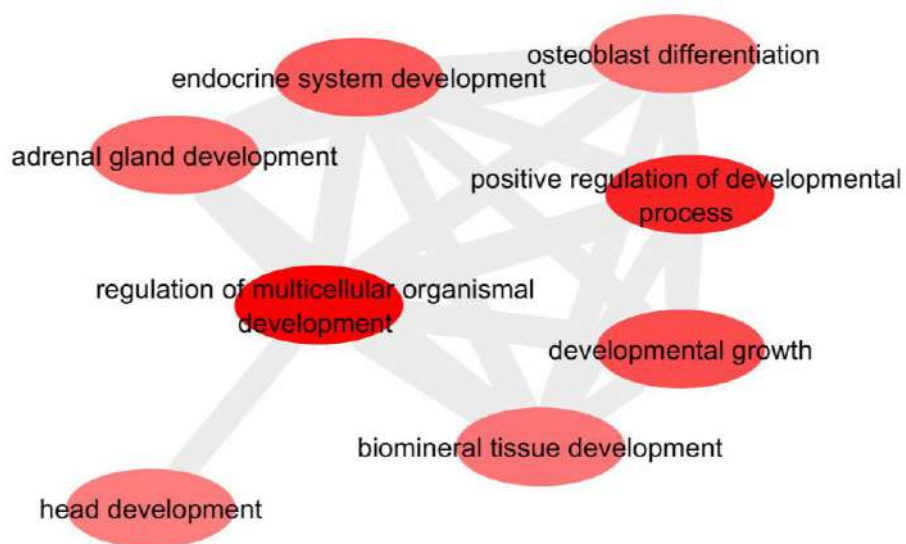


Figura 3S. Red génica de procesos biológicos asociados a diferenciación celular y desarrollo de genes regulados a la baja en TA visceral.

Tabla 2S. Ontología de genes. Factores de transcripción regulados a la baja en TA visceral, asociados a procesos biológicos relacionados con diferenciación celular y desarrollo.

Nombre del gen	Símbolo del gen	Veces de cambio	Valor p	Agglomerado (Cluster)
TGFB-induced factor 2	Tgif2	0.489	0.047	4
T-cell leukemia, homeobox 2	Tlx2	0.151	0.000	4
human immunodeficiency virus type I enhancer binding protein 3	Hivep3	0.189	0.000	5
ets variant gene 1	Etv1	0.092	0.001	9
transcription factor 21	Tcf21	0.012	0.000	11
Wilms tumor homolog	Wt1	0.032	0.000	12
ISL1 transcription factor, LIM/homeodomain	Isl1	0.177	0.026	13
vitamin D receptor	Vdr	0.069	0.007	13
forkhead box B1	Foxb1	0.371	0.047	22
interferon regulatory factor 1	Irf1	0.365	0.000	24
Paired box gene 5	Pax5	0.319	0.009	31
sine oculis-related homeobox 3 homolog (Drosophila) /// RIKEN cDNA E130112M24 gene	Six3	0.361	0.016	31
paired like homeodomain factor 1	Prop1	0.262	0.006	32
GLI-Kruppel family member GLI1	Gli1	0.335	0.003	34
Homeo box B9	Hoxb9	0.284	0.048	36
homeo box A13	Hoxa13	0.343	0.028	37
neurogenic differentiation 1	Neurod1	0.189	0.041	37
forkhead box F2	Foxf2	0.111	0.006	38
homeo box D9	Hoxd9	0.450	0.006	38
LIM homeobox protein 9	Lhx9	0.176	0.002	40
Homeo box A3	Hoxa3	0.383	0.001	45
aristaless related homeobox gene (Drosophila)	Arx	0.027	0.000	47
nuclear receptor subfamily 1, group H, member 4	Nr1h4	0.318	0.000	50
high mobility group AT-hook 2	Hmga2	0.266	0.006	58
AF4/FMR2 family, member 2	Aff2	0.182	0.000	59

D site albumin promoter binding protein	Dbp	0.338	0.044	59
---	-----	-------	-------	----

Tabla 3S. Ontología de genes. Factores de transcripción regulados a la baja en TA subcutáneo asociados a algún proceso biológico.

Nombre del gen	Símbolo del gen	Veces de cambio	Valor <i>p</i>	Aglomerado (Cluster)
retinoid X receptor beta	Rxb	0.316	0.002	2
T-box 15	Tbx15	0.006	0.000	14
transcription factor 3	Tcf3	0.470	0.035	15
tubby like protein 4	Tulp4	0.418	0.003	15
heat shock factor 2	Hsf2	0.338	0.002	26
distal-less homeobox 5	Dlx5	0.301	0.023	27
twist gene homolog 1 (Drosophila)	Twist1	0.391	0.000	39
homeo box, msh-like 1	Msx1	0.220	0.000	43
estrogen related receptor, beta	Esrrb	0.400	0.007	46
forkhead box Q1	Foxq1	0.449	0.019	48
homeo box gene expressed in ES cells	Hesx1	0.228	0.002	56
NK2 transcription factor related, locus 5 (Drosophila)	Nkx2-5	0.383	0.000	58
Kruppel-like factor 10	Klf10	0.479	0.000	60
LIM homeobox protein 8	Lhx8	0.137	0.000	62

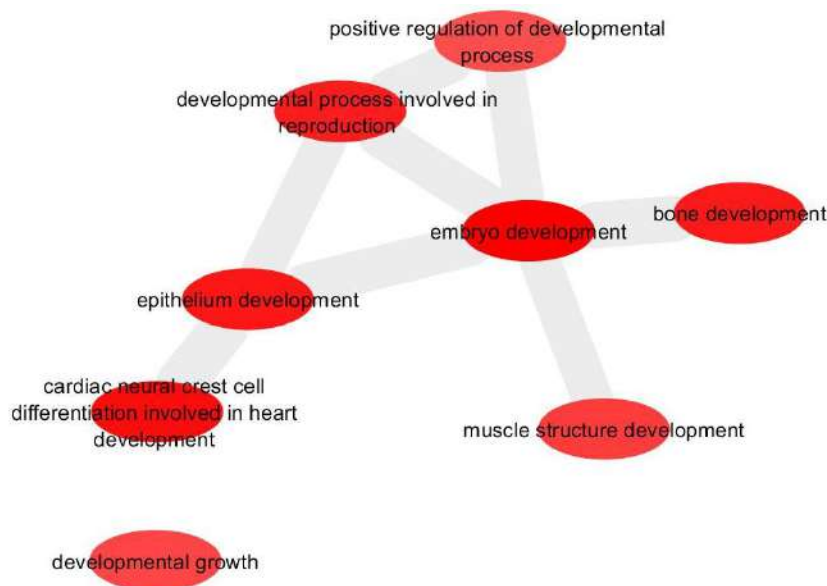


Figura 4S. Red génica de procesos biológicos asociados a diferenciación celular y desarrollo de genes regulados a la baja en TA subcutáneo.

Tabla 4S. Ontología de genes. Factores de transcripción regulados a la baja en TA subcutáneo, asociados a procesos biológicos relacionados con diferenciación celular y desarrollo.

Nombre del gen	Símbolo del gen	Veces del cambio	Valor <i>p</i>	Aglomerado (Cluster)
retinoid X receptor beta	Rxrb	0.316	0.002	2
T-box 15	Tbx15	0.006	0.000	14
transcription factor 3	Tcf3	0.470	0.035	15
distal-less homeobox 5	Dlx5	0.301	0.023	27
twist gene homolog 1 (Drosophila)	Twist1	0.391	0.000	39
homeo box, msh-like 1	Msx1	0.220	0.000	43
estrogen related receptor, beta	Esrrb	0.400	0.007	46
forkhead box Q1	Foxq1	0.449	0.019	48
homeo box gene expressed in ES cells	Hesx1	0.228	0.002	56
NK2 transcription factor related, locus 5 (Drosophila)	Nkx2-5	0.383	0.000	58
Kruppel-like factor 10	Klf10	0.479	0.000	60
LIM homeobox protein 8	Lhx8	0.137	0.000	62

Tabla 5S. Ontología de genes. Factores de transcripción regulados a la baja depósito independiente asociados a algún proceso biológico.

Nombre del gen	Símbolo del gen	Veces de cambio TA visceral	Valor <i>p</i> TA visceral	Veces de cambio TA subcutáneo	Valor <i>p</i> TA subcutáneo
AE binding protein 2	Aebp2	0.145	0.001	0.194	0.000
AF4/FMR2 family, member 1	Aff1	0.068	0.000	0.072	0.000
AF4/FMR2 family, member 4	Aff4	0.002	0.000	0.009	0.000
aryl-hydrocarbon receptor	Ahr	0.127	0.003	0.146	0.000
AT rich interactive domain 1A (Swi1 like)	Arid1a	0.034	0.011	0.011	0.008
AT rich interactive domain 2 (Arid-rfx like)	Arid2	0.223	0.000	0.194	0.000

aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like	Arntl	0.116	0.001	0.140	0.000
activating transcription factor 1	Atf1	0.224	0.000	0.155	0.000
activating transcription factor 3	Atf3	0.001	0.000	0.002	0.000
activating transcription factor 6	Atf6	0.218	0.001	0.226	0.000
BTB and CNC homology 1	Bach1	0.047	0.000	0.051	0.000
B-cell leukemia/lymphoma 6	Bcl6	0.302	0.001	0.356	0.000
cell division cycle 5-like (S. pombe)	Cdc5l	0.047	0.000	0.046	0.000
CCCTC-binding factor	Ctcf	0.020	0.000	0.056	0.000
E2F transcription factor 3	E2f3	0.059	0.004	0.235	0.000
E2F transcription factor 5	E2f5	0.114	0.000	0.184	0.000
E4F transcription factor 1	E4f1	0.345	0.006	0.245	0.001
early growth response 1	Egr1	0.002	0.000	0.000	0.000
early growth response 2	Egr2	0.002	0.000	0.014	0.001
E74-like factor 1	Elf1	0.002	0.001	0.005	0.000
ELK3, member of ETS oncogene family	Elk3	0.052	0.001	0.105	0.000
estrogen receptor 1 (alpha)	Esr1	0.006	0.000	0.006	0.000
E26 avian leukemia oncogene 1, 5' domain	Ets1	0.080	0.003	0.096	0.000
FBJ osteosarcoma oncogene	Fos	0.003	0.001	0.005	0.000
fos-like antigen 2 /// similar to fos-like antigen 2	Fosl2	0.026	0.000	0.038	0.000
forkhead box C1	Foxc1	0.084	0.002	0.357	0.028
GA repeat binding protein, alpha	Gabpa	0.023	0.000	0.013	0.000
GATA binding protein 2	Gata2	0.025	0.001	0.187	0.004
GATA binding protein 6	Gata6	0.031	0.000	0.115	0.000
GLI-Kruppel family member GLI2	Gli2	0.051	0.003	0.090	0.003
GLI-Kruppel family member GLI3	Gli3	0.025	0.000	0.043	0.000
goosecoid	Gsc	0.127	0.028	0.044	0.000
GTF2I repeat domain containing 2	Gtf2ird2	0.145	0.000	0.265	0.000
general transcription factor III A	Gtf3a	0.043	0.000	0.064	0.000
hairy and enhancer of split 1 (Drosophila)	Hes1	0.251	0.001	0.264	0.000
hypermethylated in cancer 1	Hic1	0.054	0.010	0.084	0.001
human immunodeficiency virus type I enhancer binding protein 1	Hivep1	0.351	0.020	0.408	0.004
high mobility group AT-hook 1	Hmga1	0.016	0.003	0.007	0.000

high mobility group box 2	Hmgb2	0.072	0.001	0.153	0.000
homeo box A1	Hoxa1	0.048	0.001	0.088	0.000
homeo box A10	Hoxa10	0.054	0.001	0.040	0.001
homeo box A9	Hoxa9	0.144	0.001	0.108	0.000
homeo box B4	Hoxb4	0.137	0.000	0.192	0.000
homeo box C4	Hoxc4	0.091	0.005	0.223	0.000
homeo box C8	Hoxc8	0.308	0.000	0.313	0.000
inhibitor of DNA binding 3	Id3	0.283	0.000	0.366	0.000
inhibitor of DNA binding 4	Id4	0.073	0.000	0.132	0.000
interferon regulatory factor 7	Irf7	0.298	0.004	0.319	0.000
Jun oncogene	Jun	0.160	0.001	0.121	0.000
Jun-B oncogene	Junb	0.315	0.002	0.479	0.000
Kruppel-like factor 12	Klf12	0.060	0.000	0.133	0.000
Kruppel-like factor 2 (lung)	Klf2	0.157	0.008	0.129	0.002
Kruppel-like factor 4 (gut)	Klf4	0.001	0.000	0.000	0.000
avian musculoaponeurotic fibrosarcoma (v-maf) AS42 oncogene homolog	Maf	0.002	0.000	0.010	0.000
v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene family, protein F (avian)	Maff	0.098	0.000	0.072	0.000
v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene family, protein G (avian)	Mafg	0.332	0.021	0.343	0.008
v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene family, protein K (avian)	Mafk	0.422	0.000	0.492	0.001
methyl-CpG binding domain protein 1	Mbd1	0.151	0.004	0.088	0.000
methyl-CpG binding domain protein 2	Mbd2	0.070	0.000	0.078	0.000
myocyte enhancer factor 2C	Mef2c	0.018	0.000	0.047	0.000
myeloid ecotropic viral integration site 1	Meis1	0.013	0.001	0.022	0.000
mesenchyme homeobox 1	Meox1	0.393	0.009	0.424	0.001
mesenchyme homeobox 2	Meox2	0.178	0.000	0.076	0.001
microphthalmia-associated transcription factor	Mitf	0.030	0.000	0.039	0.000
musculin	Msc	0.073	0.001	0.224	0.002
MAX dimerization protein 1	Mxd1	0.021	0.000	0.021	0.001
myelocytomatosis oncogene	Myc	0.080	0.000	0.057	0.001

v-myc myelocytomatosis viral related oncogene, neuroblastoma derived (avian)	Mycn	0.049	0.001	0.297	0.034
nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic, calcineurin-dependent 3	Nfatc3	0.012	0.000	0.015	0.000
nuclear transcription factor-Y beta	Nfyb	0.238	0.000	0.383	0.000
nuclear transcription factor-Y gamma	Nfyc	0.082	0.000	0.026	0.000
NK2 transcription factor related, locus 3 (Drosophila)	Nkx2-3	0.173	0.008	0.226	0.034
NK2 transcription factor related, locus 6 (Drosophila)	Nkx2-6	0.175	0.001	0.178	0.012
neuronal PAS domain protein 2	Npas2	0.031	0.000	0.055	0.003
nuclear receptor subfamily 1, group H, member 2	Nr1h2	0.331	0.002	0.221	0.000
nuclear receptor subfamily 2, group C, member 2	Nr2c2	0.005	0.001	0.006	0.000
nuclear receptor subfamily 3, group C, member 1	Nr3c1	0.017	0.000	0.018	0.000
nuclear receptor subfamily 4, group A, member 1	Nr4a1	0.188	0.001	0.137	0.000
Nuclear receptor subfamily 4, group A, member 2	Nr4a2	0.010	0.000	0.060	0.001
protein inhibitor of activated STAT 1	Pias1	0.070	0.001	0.046	0.000
protein inhibitor of activated STAT 2	Pias2	0.081	0.000	0.119	0.000
protein inhibitor of activated STAT 3	Pias3	0.143	0.007	0.264	0.005
paired-like homeodomain transcription factor 2	Pitx2	0.078	0.007	0.197	0.002
PR domain containing 5	Prdm5	0.036	0.000	0.014	0.000
prolactin regulatory element binding	Preb	0.033	0.000	0.057	0.002
paired related homeobox 1	Prrx1	0.009	0.000	0.006	0.000
paired related homeobox 2	Prrx2	0.126	0.000	0.097	0.001
retinoic acid receptor, gamma	Rarg	0.068	0.004	0.070	0.000
REST corepressor 1	Rcor1	0.056	0.000	0.074	0.000
reticuloendotheliosis oncogene	Rel	0.104	0.000	0.368	0.006
avian reticuloendotheliosis viral (v-rel) oncogene related B	Relb	0.168	0.001	0.128	0.000
regulatory factor X, 1 (influences	Rfx1	0.155	0.006	0.110	0.005

HLA class II expression)					
ring finger protein 138	Rnf138	0.082	0.000	0.130	0.000
runt related transcription factor 2	Runx2	0.106	0.009	0.258	0.049
sine oculis-related homeobox 5 homolog (Drosophila)	Six5	0.259	0.005	0.186	0.001
MAD homolog 3 (Drosophila)	Smad3	0.012	0.001	0.020	0.000
MAD homolog 4 (Drosophila)	Smad4	0.140	0.000	0.076	0.000
MAD homolog 5 (Drosophila)	Smad5	0.081	0.000	0.071	0.000
snail homolog 2 (Drosophila)	Snai2	0.232	0.000	0.324	0.000
SRY-box containing gene 10	Sox10	0.230	0.000	0.437	0.012
SRY-box containing gene 11	Sox11	0.069	0.016	0.074	0.017
SRY-box containing gene 5	Sox5	0.233	0.003	0.380	0.028
nuclear antigen Sp100	Sp100	0.123	0.002	0.179	0.000
trans-acting transcription factor 4	Sp4	0.071	0.000	0.080	0.000
structure specific recognition protein 1	Ssrp1	0.346	0.008	0.271	0.000
SUB1 homolog (S. cerevisia	Sub1	0.018	0.002	0.017	0.000
TEA domain family member 1	Tead1	0.079	0.006	0.237	0.005
TEA domain family member 3	Tead3	0.139	0.002	0.203	0.001
telomeric repeat binding factor 1	Terf1	0.025	0.001	0.178	0.002
transcription factor A, mitochondrial	Tfam	0.006	0.000	0.027	0.000
transcription factor Dp 1	Tfdp1	0.039	0.000	0.027	0.000
transcription factor EB	Tfeb	0.082	0.000	0.120	0.000
TSC22 domain family 3	Tsc22d3	0.042	0.002	0.025	0.000
twist homolog 2 (Drosophila)	Twist2	0.354	0.000	0.274	0.000
upstream binding protein 1	Ubp1	0.244	0.000	0.182	0.000
vitronectin	Vtn	0.150	0.002	0.181	0.000
zinc finger and BTB domain containing 17	Zbtb17	0.092	0.000	0.107	0.000
zinc finger and BTB domain containing 46	Zbtb46	0.224	0.001	0.277	0.003
zinc finger protein 37	Zfp37	0.024	0.000	0.041	0.000
zinc finger protein 90	Zfp90	0.066	0.000	0.091	0.003
zinc finger protein, multitype 2	Zfpm2	0.009	0.000	0.017	0.000
zinc finger protein X-linked	Zfx	0.103	0.000	0.110	0.000
zinc finger protein 22 (KOX 15)	Znf22	0.090	0.000	0.113	0.000

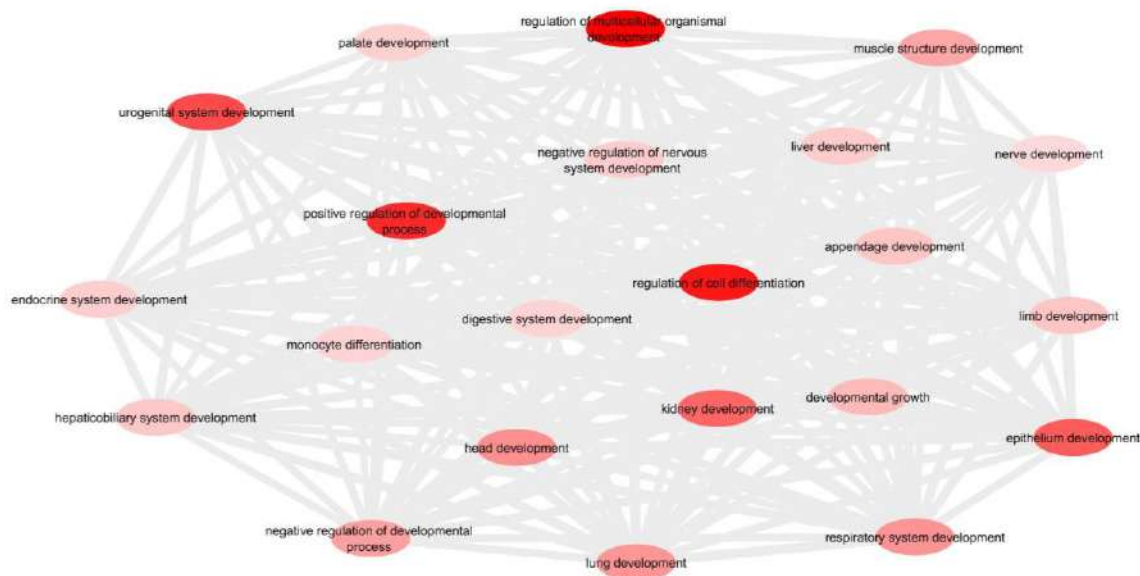


Figura 5S. Red génica de procesos biológicos asociados a diferenciación celular y desarrollo de genes regulados a la baja depósito independiente

Tabla 6S. Ontología de genes. Factores de transcripción regulados a la baja depósito independiente, asociados a procesos biológicos relacionados con diferenciación celular y desarrollo.

Nombre del gen	Símbolo del gen	Veces de cambio TA visceral	Valor p TA visceral	Veces de cambio TA subcutáneo	Valos p TA subcutáneo
AF4/FMR2 family, member 4	Aff4	0.002	0.000	0.009	0.000
aryl-hydrocarbon receptor	Ahr	0.127	0.003	0.146	0.000
AT rich interactive domain 1A (Swi1 like)	Arid1a	0.034	0.011	0.011	0.008
aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like	Arntl	0.116	0.001	0.140	0.000
activating transcription factor 1	Atf1	0.224	0.000	0.155	0.000
activating transcription factor 3	Atf3	0.001	0.000	0.002	0.000

activating transcription factor 6	Atf6	0.218	0.001	0.226	0.000
B-cell leukemia/lymphoma 6	Bcl6	0.302	0.001	0.356	0.000
E4F transcription factor 1	E4f1	0.345	0.006	0.245	0.001
early growth response 1	Egr1	0.002	0.000	0.000	0.000
early growth response 2	Egr2	0.002	0.000	0.014	0.001
ELK3, member of ETS oncogene family	Elk3	0.052	0.001	0.105	0.000
estrogen receptor 1 (alpha)	Esr1	0.006	0.000	0.006	0.000
E26 avian leukemia oncogene 1, 5' domain	Ets1	0.080	0.003	0.096	0.000
FBJ osteosarcoma oncogene	Fos	0.003	0.001	0.005	0.000
fos-like antigen 2	Fosl2	0.026	0.000	0.038	0.000
forkhead box C1	Foxc1	0.084	0.002	0.357	0.028
GA repeat binding protein, alpha	Gabpa	0.023	0.000	0.013	0.000
GATA binding protein 2	Gata2	0.025	0.001	0.187	0.004
GATA binding protein 6	Gata6	0.031	0.000	0.115	0.000
GLI-Kruppel family member GLI2	Gli2	0.051	0.003	0.090	0.003
GLI-Kruppel family member GLI3	Gli3	0.025	0.000	0.043	0.000
goosecoid	Gsc	0.127	0.028	0.044	0.000
hairy and enhancer of split 1 (Drosophila)	Hes1	0.251	0.001	0.264	0.000
high mobility group AT-hook 1	Hmga1	0.016	0.003	0.007	0.000
high mobility group box 2 /// high mobility group box 2 /// high mobility group box 2	Hmgb2	0.072	0.001	0.153	0.000
homeo box A1	Hoxa1	0.048	0.001	0.088	0.000
homeo box A10	Hoxa10	0.054	0.001	0.040	0.001
homeo box A9	Hoxa9	0.144	0.001	0.108	0.000
homeo box B4	Hoxb4	0.137	0.000	0.192	0.000
homeo box C4	Hoxc4	0.091	0.005	0.223	0.000
homeo box C8	Hoxc8	0.308	0.000	0.313	0.000
inhibitor of DNA binding 3	Id3	0.283	0.000	0.366	0.000
inhibitor of DNA binding 4	Id4	0.073	0.000	0.132	0.000
interferon regulatory factor 7	Irf7	0.298	0.004	0.319	0.000
Jun oncogene	Jun	0.160	0.001	0.121	0.000
Jun-B oncogene	Junb	0.315	0.002	0.479	0.000
Kruppel-like factor 2 (lung)	Klf2	0.157	0.008	0.129	0.002
Kruppel-like factor 4 (gut)	Klf4	0.001	0.000	0.000	0.000

avian musculoaponeurotic fibrosarcoma (v-maf) AS42 oncogene homolog	Maf	0.002	0.000	0.010	0.000
v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene family, protein F (avian)	Maff	0.098	0.000	0.072	0.000
v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene family, protein G (avian)	Mafg	0.332	0.021	0.343	0.008
methyl-CpG binding domain protein 1	Mbd1	0.151	0.004	0.088	0.000
myocyte enhancer factor 2C	Mef2c	0.018	0.000	0.047	0.000
myeloid ecotropic viral integration site 1	Meis1	0.013	0.001	0.022	0.000
mesenchyme homeobox 1	Meox1	0.393	0.009	0.424	0.001
mesenchyme homeobox 2	Meox2	0.178	0.000	0.076	0.001
microphthalmia-associated transcription factor	Mitf	0.030	0.000	0.039	0.000
musculin	Msc	0.073	0.001	0.224	0.002
myelocytomatosis oncogene	Myc	0.080	0.000	0.057	0.001
v-myc myelocytomatosis viral related oncogene, neuroblastoma derived (avian)	Mycn	0.049	0.001	0.297	0.034
nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic, calcineurin-dependent 3	Nfatc3	0.012	0.000	0.015	0.000
NK2 transcription factor related, locus 3 (Drosophila)	Nkx2-3	0.173	0.008	0.226	0.034
NK2 transcription factor related, locus 6 (Drosophila)	Nkx2-6	0.175	0.001	0.178	0.012
neuronal PAS domain protein 2	Npas2	0.031	0.000	0.055	0.003
nuclear receptor subfamily 1, group H, member 2	Nr1h2	0.331	0.002	0.221	0.000
nuclear receptor subfamily 2, group C, member 2	Nr2c2	0.005	0.001	0.006	0.000
nuclear receptor subfamily 3, group C, member 1	Nr3c1	0.017	0.000	0.018	0.000
nuclear receptor subfamily 4, group A, member 1	Nr4a1	0.188	0.001	0.137	0.000
Nuclear receptor subfamily 4, group A, member 2	Nr4a2	0.010	0.000	0.060	0.001
protein inhibitor of activated STAT 1	Pias1	0.070	0.001	0.046	0.000
protein inhibitor of activated STAT	Pias2	0.081	0.000	0.119	0.000

2

paired-like homeodomain transcription factor 2	Pitx2	0.078	0.007	0.197	0.002
paired related homeobox 1	Prrx1	0.009	0.000	0.006	0.000
paired related homeobox 2	Prrx2	0.126	0.000	0.097	0.001
retinoic acid receptor, gamma	Rarg	0.068	0.004	0.070	0.000
REST corepressor 1	Rcor1	0.056	0.000	0.074	0.000
avian reticuloendotheliosis viral (v-rel) oncogene related B	Relb	0.168	0.001	0.128	0.000
runt related transcription factor 2	Runx2	0.106	0.009	0.258	0.049
sine oculis-related homeobox 5 homolog (Drosophila)	Six5	0.259	0.005	0.186	0.001
MAD homolog 3 (Drosophila)	Smad3	0.012	0.001	0.020	0.000
MAD homolog 4 (Drosophila)	Smad4	0.140	0.000	0.076	0.000
MAD homolog 5 (Drosophila)	Smad5	0.081	0.000	0.071	0.000
snail homolog 2 (Drosophila)	Snai2	0.232	0.000	0.324	0.000
SRY-box containing gene 10	Sox10	0.230	0.000	0.437	0.012
SRY-box containing gene 11	Sox11	0.069	0.016	0.074	0.017
SRY-box containing gene 5	Sox5	0.233	0.003	0.380	0.028
nuclear antigen Sp100	Sp100	0.123	0.002	0.179	0.000
TEA domain family member 1	Tead1	0.079	0.006	0.237	0.005
TEA domain family member 3	Tead3	0.139	0.002	0.203	0.001
transcription factor Dp 1	Tfdp1	0.039	0.000	0.027	0.000
transcription factor EB	Tfeb	0.082	0.000	0.120	0.000
TSC22 domain family 3	Tsc22d3	0.042	0.002	0.025	0.000
twist homolog 2 (Drosophila)	Twist2	0.354	0.000	0.274	0.000
upstream binding protein 1	Ubp1	0.244	0.000	0.182	0.000
vitronectin	Vtn	0.150	0.002	0.181	0.000
zinc finger and BTB domain containing 17	Zbtb17	0.092	0.000	0.107	0.000
zinc finger and BTB domain containing 46	Zbtb46	0.224	0.001	0.277	0.003
zinc finger protein 37	Zfp37	0.024	0.000	0.041	0.000
zinc finger protein, multitype 2	Zfpm2	0.009	0.000	0.017	0.000
zinc finger protein X-linked	Zfx	0.103	0.000	0.110	0.000

Tabla 7S. Ontología de genes. Factores de transcripción regulados al alza en TA visceral asociados a algún proceso biológico.

Nombre del gen	Símbolo del gen	Veces de cambio	Valor <i>p</i>	Aglomerado (Cluster)
cAMP responsive element binding protein 1	Creb1	9.804	0.003	2
ELK4, member of ETS oncogene family	Elk4	6.864	0.013	2
growth factor independent 1B	Gfi1b	2.737	0.007	2
MYC-associated zinc finger protein (purine-binding transcription factor)	Maz	2.290	0.003	2
retina and anterior neural fold homeobox	Rax	50.164	0.011	2
transcription factor 7, T-cell specific	Tcf7	6.133	0.016	2
TEA domain family member 4	Tead4	11.406	0.048	2
telomeric repeat binding factor 2	Terf2	6.879	0.000	2
Zinc finger and BTB domain containing 7a	Zbtb7a	5.195	0.025	2
early B-cell factor 1	Ebf1	32.683	0.000	3
GATA binding protein 3	Gata3	9.280	0.001	3
glial cells missing homolog 1 (Drosophila)	Gcm1	3.963	0.001	3
grainyhead-like 2 (Drosophila)	Grhl2	7.293	0.038	3
one cut domain, family member 1	Onecut1	9.560	0.038	3
sterol regulatory element binding factor 1	Srebf1	4.799	0.022	3
Zic finger protein of the cerebellum 2	Zic2	22.413	0.036	3
achaete-scute complex homolog-like 2 (Drosophila)	Ascl2	9.560	0.031	4
B-cell CLL/lymphoma 6, member B	Bcl6b	2.172	0.014	4
cone-rod homeobox containing gene	Crx	7.495	0.002	4
AT rich interactive domain 3B (Bright like)	Arid3b	13.081	0.036	5
forkhead box P1	Foxp1	2.954	0.018	5
inhibitor of DNA binding 2	Id2	4.398	0.031	5
myocyte enhancer factor 2A	Mef2a	6.798	0.016	5
myogenic factor 6	Myf6	5.700	0.002	5
nuclear receptor subfamily 2, group F, member 1	Nr2f1	11.252	0.007	5

tumor protein p53 (Li-Fraumeni syndrome)	Tp53	65.275	0.011	5
hairy and enhancer of split 5 (Drosophila)	Hes5	2.933	0.043	6
nuclear transcription factor-Y alpha	NfyA	8.645	0.000	6
nuclear receptor subfamily 0, group B, member 1	Nr0b1	4.996	0.008	6
Pre B-cell leukemia transcription factor 3	Pbx3	5.555	0.005	6
sex determining region of Chr Y	Sry	6.549	0.000	6
E2F transcription factor 8	E2f8	6.705	0.018	7
forkhead box J1	Foxj1	5.586	0.031	7
Iroquois related homeobox 3 (Drosophila)	Irx3	2.881	0.003	7
LIM homeobox protein 6	Lhx6	13.365	0.009	7
metal response element binding transcription factor 1	Mtf1	21.729	0.042	7
RAR-related orphan receptor alpha	Rora	13.376	0.022	7
MAD homolog 7 (Drosophila)	Smad7	2.585	0.001	7
SRY-box containing gene 15	Sox15	2.040	0.041	7
SRY-box containing gene 7	Sox7	13.932	0.018	7
Zinc finger and BTB domain containing 16	Zbtb16	48.814	0.017	7
zinc finger protein of the cerebellum 3	Zic3	9.794	0.000	7
DNA-damage inducible transcript 3	Ddit3	5.380	0.014	8
FBJ osteosarcoma oncogene B	Fosb	2.484	0.005	8
homeo box B8	Hoxb8	4.863	0.008	8
myeloblastosis oncogene-like 2	Mybl2	3.147	0.027	8
orthopedia homolog (Drosophila)	Otp	4.665	0.020	8
pleiomorphic adenoma gene-like 1	Plagl1	10.457	0.026	8
T-box 3	Tbx3	8.166	0.024	8
T-box 6	Tbx6	2.308	0.020	8

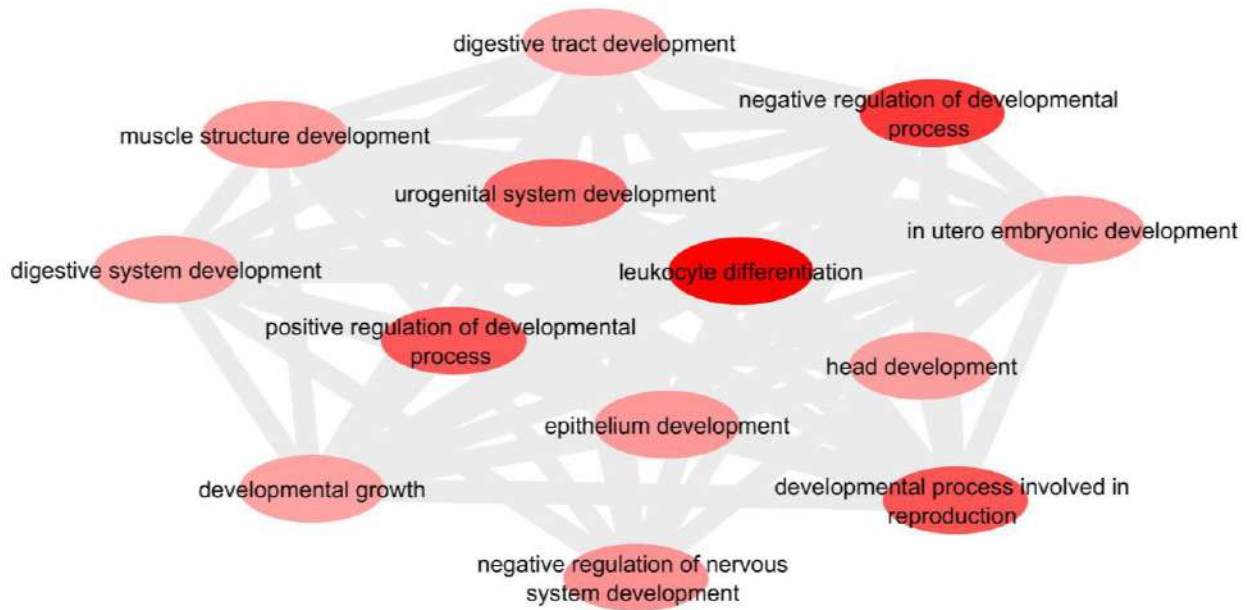


Figura 6S. Red génica de procesos biológicos asociados a diferenciación celular y desarrollo de genes regulados al alza en TA visceral.

Tabla 8S. Ontología de genes. Factores de transcripción regulados al alza en TA visceral, asociados a procesos biológicos relacionados con diferenciación celular y desarrollo.

Nombre del Gen	Símbolo del gen	Veces de cambio	Valor p	Aglomerado (Cluster)
cAMP responsive element binding protein 1	Creb1	9.804	0.003	2
growth factor independent 1B	Gfi1b	2.737	0.007	2
retina and anterior neural fold homeobox	Rax	50.164	0.011	2
transcription factor 7, T-cell specific	Tcf7	6.133	0.016	2
TEA domain family member 4	Tead4	11.406	0.048	2
telomeric repeat binding factor 2	Terf2	6.879	0.000	2
Zinc finger and BTB domain containing 7a	Zbtb7a	5.195	0.025	2
GATA binding protein 3	Gata3	9.280	0.001	3
glial cells missing homolog 1 (Drosophila)	Gcm1	3.963	0.001	3
grainyhead-like 2 (Drosophila)	Grhl2	7.293	0.038	3
one cut domain, family member 1	Onecut1	9.560	0.038	3

sterol regulatory element binding factor 1	Srebf1	4.799	0.022	3
Zic finger protein of the cerebellum 2	Zic2	22.413	0.036	3
achaete-scute complex homolog-like 2 (Drosophila)	Ascl2	9.560	0.031	4
B-cell CLL/lymphoma 6, member B	Bcl6b	2.172	0.014	4
cone-rod homeobox containing gene	Crx	7.495	0.002	4
forkhead box P1	Foxp1	2.954	0.018	5
inhibitor of DNA binding 2	Id2	4.398	0.031	5
myocyte enhancer factor 2A	Mef2a	6.798	0.016	5
myogenic factor 6	Myf6	5.700	0.002	5
nuclear receptor subfamily 2, group F, member 1	Nr2f1	11.252	0.007	5
tumor protein p53 (Li-Fraumeni syndrome)	Tp53	65.275	0.011	5
hairy and enhancer of split 5 (Drosophila)	Hes5	2.933	0.043	6
nuclear transcription factor-Y alpha	Nfya	8.645	0.000	6
nuclear receptor subfamily 0, group B, member 1	Nr0b1	4.996	0.008	6
Pre B-cell leukemia transcription factor 3	Pbx3	5.555	0.005	6
sex determining region of Chr Y	Sry	6.549	0.000	6
E2F transcription factor 8	E2f8	6.705	0.018	7
forkhead box J1	Foxj1	5.586	0.031	7
Iroquois related homeobox 3 (Drosophila)	Irx3	2.881	0.003	7
LIM homeobox protein 6	Lhx6	13.365	0.009	7
RAR-related orphan receptor alpha	Rora	13.376	0.022	7
MAD homolog 7 (Drosophila)	Smad7	2.585	0.001	7
SRY-box containing gene 15	Sox15	2.040	0.041	7
SRY-box containing gene 7	Sox7	13.932	0.018	7
Zinc finger and BTB domain containing 16	Zbtb16	48.814	0.017	7
zinc finger protein of the cerebellum 3	Zic3	9.794	0.000	7
DNA-damage inducible transcript 3	Ddit3	5.380	0.014	8
homeo box B8	Hoxb8	4.863	0.008	8
orthopedia homolog (Drosophila)	Otp	4.665	0.020	8
pleiomorphic adenoma gene-like 1	Plagl1	10.457	0.026	8
T-box 3	Tbx3	8.166	0.024	8
T-box 6	Tbx6	2.308	0.020	8

Tabla 9S. Ontología de genes. Factores de transcripción regulados al alza en TA subcutáneo asociados a algún proceso biológico.

Nombre del gen	Símbolo del gen	Veces de cambio	Valor p	Aglomerado (Cluster)
H6 homeo box 3	Hmx3	5.247	0.029	1
folliculogenesis specific basic helix-loop-helix	Figla	6.640	0.000	1
homeo box B13	Hoxb13	60.895	0.027	1
Paired box gene 3	Pax3	18.792	0.010	2
nuclear receptor subfamily 6, group A, member 1	Nr6a1	7.560	0.047	2
forkhead box A2	Foxa2	2.600	0.022	2
paired box gene 1	Pax1	2.495	0.001	2
SRY-box containing gene 13	Sox13	7.691	0.007	2
interferon regulatory factor 8	Irf8	6.820	0.000	2
hairy/enhancer-of-split related with YRPW motif 1	Hey1	3.459	0.037	2
BarH-like homeobox 2	Barx2	6.622	0.027	3
inhibitor of DNA binding 1	Id1	2.541	0.022	3
paired box gene 6	Pax6	19.025	0.027	4
single-minded homolog 1 (Drosophila)	Sim1	2.502	0.014	4
lymphoblastic leukemia	Lyl1	5.413	0.043	4
heart and neural crest derivatives expressed transcript 1	Hand1	5.623	0.044	4
engrailed 1	En1	2.590	0.043	4
Spi-B transcription factor (Spi-1/PU.1 related)	Spib	6.523	0.029	4
distal-less homeobox 3	Dlx3	3.195	0.013	5
homeo box B5	Hoxb5	6.035	0.004	5
POU domain, class 2, transcription factor 3	Pou2f3	4.342	0.001	5
autoimmune regulator (autoimmune polyendocrinopathy candidiasis ectodermal dystrophy)	Aire	17.058	0.010	5
forkhead box H1	Foxh1	14.463	0.009	6
homeo box A2	Hoxa2	3.171	0.000	6
interferon regulatory factor 4	Irf4	9.487	0.014	6
paired-like homeodomain transcription factor	Pitx1	3.928	0.021	6

1				
caudal type homeo box 1	Cdx1	9.354	0.001	6
tubby like protein 1	Tulp1	3.355	0.000	7
homeo box D3	Hoxd3	10.109	0.016	7
v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene family, protein B (avian)	Mafb	2.497	0.000	7
homeo box B6	Hoxb6	2.721	0.012	7
neurogenin 1	Neurog1	13.793	0.028	7
POU domain, class 2, transcription factor 2	Pou2f2	6.069	0.002	7
forkhead box C2	Foxc2	10.196	0.041	7
LIM homeobox transcription factor 1 beta	Lmx1b	5.084	0.001	7

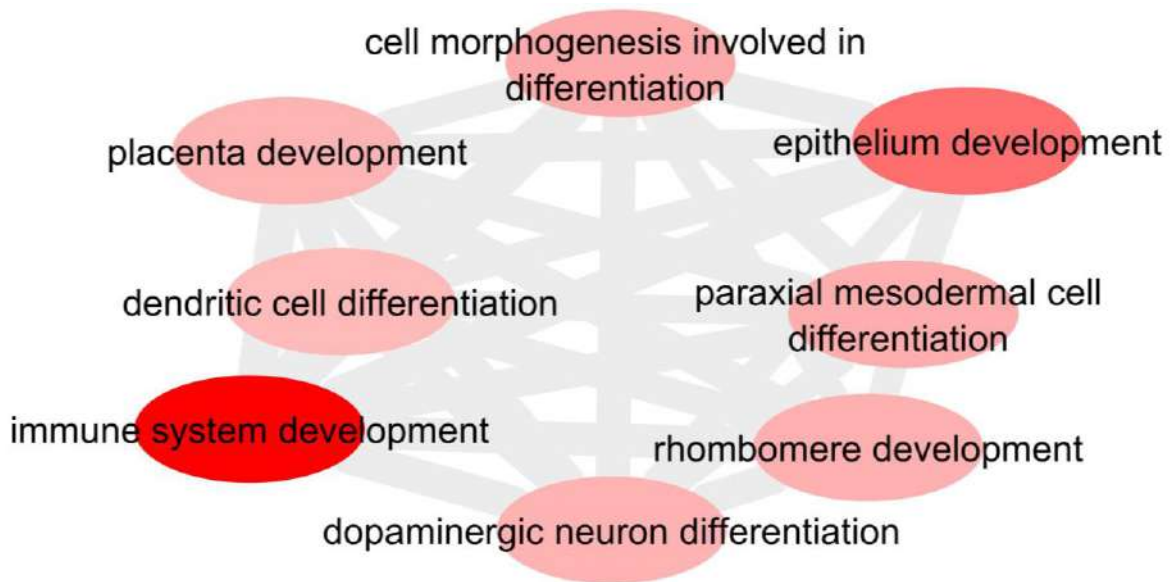


Figura 7S. Red génica de procesos biológicos asociados a diferenciación celular y desarrollo de genes regulados al alza en TA subcutáneo.

Tabla 10S. Ontología de genes. Factores de transcripción regulados al alza en TA subcutáneo, asociados a procesos biológicos relacionados con diferenciación celular y desarrollo.

Nombre del gen	Símbolo del gen	Veces de cambio	Valor p	Aglomerado (Cluster)
H6 homeo box 3	Hmx3	5.247	0.029	1
homeo box B13	Hoxb13	60.895	0.027	1
Paired box gene 3	Pax3	18.792	0.010	2
forkhead box A2	Foxa2	2.600	0.022	2
paired box gene 1	Pax1	2.495	0.001	2
SRY-box containing gene 13	Sox13	7.691	0.007	2
interferon regulatory factor 8	Irf8	6.820	0.000	2
hairy/enhancer-of-split related with YRPW motif 1	Hey1	3.459	0.037	2
BarH-like homeobox 2	Barx2	6.622	0.027	3
inhibitor of DNA binding 1	Id1	2.541	0.022	3
paired box gene 6	Pax6	19.025	0.027	4
single-minded homolog 1 (Drosophila)	Sim1	2.502	0.014	4
lymphoblastic leukemia	Lyl1	5.413	0.043	4
heart and neural crest derivatives expressed transcript 1	Hand1	5.623	0.044	4
engrailed 1	En1	2.590	0.043	4
Spi-B transcription factor (Spi-1/PU.1 related)	Spib	6.523	0.029	4
distal-less homeobox 3	Dlx3	3.195	0.013	5
homeo box B5	Hoxb5	6.035	0.004	5
POU domain, class 2, transcription factor 3	Pou2f3	4.342	0.001	5
autoimmune regulator (autoimmune polyendocrinopathy candidiasis ectodermal dystrophy)	Aire	17.058	0.010	5
forkhead box H1	Foxh1	14.463	0.009	6
homeo box A2	Hoxa2	3.171	0.000	6
interferon regulatory factor 4	Irf4	9.487	0.014	6
paired-like homeodomain transcription factor 1	Pitx1	3.928	0.021	6
caudal type homeo box 1	Cdx1	9.354	0.001	6
tubby like protein 1	Tulp1	3.355	0.000	7

homeo box D3	Hoxd3	10.109	0.016	7
v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene family, protein B (avian)	Mafb	2.497	0.000	7
homeo box B6	Hoxb6	2.721	0.012	7
neurogenin 1	Neurog1	13.793	0.028	7
POU domain, class 2, transcription factor 2	Pou2f2	6.069	0.002	7
forkhead box C2	Foxc2	10.196	0.041	7
LIM homeobox transcription factor 1 beta	Lmx1b	5.084	0.001	7

Tabla 11S. Ontología de genes. Factores de transcripción regulados al alza depósito independiente asociados a algún proceso biológico.

Nombre del Gen	Símbolo del gen	Veces de cambio TA visceral	Valor p TA visceral	Veces de cambio TA subcutáneo	Valor p TA subcutáneo
CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), alpha	Cebpa	100.114	0.000	77.236	0.001
ELK1, member of ETS oncogene family	Elk1	7.007	0.000	12.138	0.040
estrogen related receptor, alpha	Esrra	24.415	0.000	22.555	0.000
ets variant gene 4 (E1A enhancer binding protein, E1AF)	Etv4	29.369	0.040	82.269	0.038
forkhead box L1	Foxl1	26.958	0.042	68.878	0.001
forkhead box M1	Foxm1	43.178	0.003	297.019	0.024
GATA binding protein 4	Gata4	23.888	0.037	17.725	0.029
general transcription factor II I	Gtf2i	3.947	0.000	5.108	0.003
hypoxia inducible factor 1, alpha subunit	Hif1a	262.410	0.011	317.883	0.020
homeobox containing 1	Hmbx1	9.306	0.001	6.094	0.001
high mobility group box 3	Hmgb3	3.459	0.002	3.712	0.000
hepatocyte nuclear factor 4, gamma	Hnf4g	10.477	0.007	12.552	0.030
homeo box A7	Hoxa7	4.125	0.043	18.879	0.038
Jumonji, AT rich interactive domain 2	Jarid2	22.465	0.014	31.229	0.047
Kruppel-like factor 13	Klf13	78.175	0.004	80.927	0.010
methyl-CpG binding domain protein	Mbd3	3.808	0.000	4.297	0.008

3

myocyte enhancer factor 2B	Mef2b	5.462	0.023	13.719	0.002
Myocyte enhancer factor 2D	Mef2d	41.111	0.000	55.063	0.016
Max dimerization protein 4	Mxd4	13.792	0.008	12.227	0.001
myogenic differentiation 1	Myod1	46.532	0.021	38.883	0.017
nuclear receptor co-repressor 2	Ncor2	5.681	0.007	3.787	0.000
neurogenic differentiation 2	Neurod2	6.048	0.015	36.957	0.008
nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic, calcineurin-dependent 1	Nfatc1	3.972	0.007	2.127	0.007
Nuclear factor I/C	Nfic	394.578	0.003	363.737	0.013
nuclear receptor subfamily 1, group H, member 3	Nr1h3	3.979	0.007	4.347	0.001
nuclear receptor subfamily 1, group I, member 3	Nr1i3	48.650	0.032	25.511	0.001
nuclear receptor subfamily 5, group A, member 1	Nr5a1	51.020	0.030	91.213	0.008
Pbx/knotted 1 homeobox	Pknox1	4.507	0.000	4.908	0.013
peroxisome proliferator activated receptor alpha	Ppara	5.620	0.000	18.974	0.045
peroxisome proliferator activated receptor gamma	Pparg	5.326	0.024	1.600	0.001
replication initiator 1	Repin1	75.499	0.016	37.110	0.042
regulatory factor X, 2 (influences HLA class II expression)	Rfx2	5.217	0.007	10.478	0.000
RAR-related orphan receptor gamma	Rorc	17.645	0.005	23.597	0.008
retinoid X receptor alpha	Rxra	108.102	0.000	176.812	0.006
short stature homeobox 2	Shox2	14.785	0.000	3.295	0.000
SRY-box containing gene 17	Sox17	20.307	0.001	25.311	0.023
SRY-box containing gene 18	Sox18	12.233	0.024	10.288	0.029
SRY-box containing gene 4 /// similar to Transcription factor SOX-4	Sox4	107.659	0.026	92.958	0.030
SRY-box containing gene 6	Sox6	2.957	0.004	4.347	0.034
signal transducer and activator of transcription 5A	Stat5a	169.438	0.004	76.456	0.003
thyrotroph embryonic factor	Tef	38.717	0.004	165.878	0.008
TSC22 domain family 4	Tsc22d4	4.637	0.003	6.246	0.003
tubby-like protein 3	Tulp3	15.646	0.005	22.109	0.015
upstream transcription factor 1	Usf1	3.144	0.002	6.955	0.003
ventral anterior homeobox	Vax1	31.515	0.018	13.144	0.007

containing gene 1					
widely-interspaced zinc finger motifs	Wiz	15.371	0.000	12.571	0.032
Y box protein 1	Ybx1	1298.989	0.003	1022.873	0.007
Zinc finger, BED domain containing 3	Zbed3	33.839	0.001	78.065	0.005
zinc finger protein, multitype 1	Zfpm1	70.759	0.002	99.216	0.009

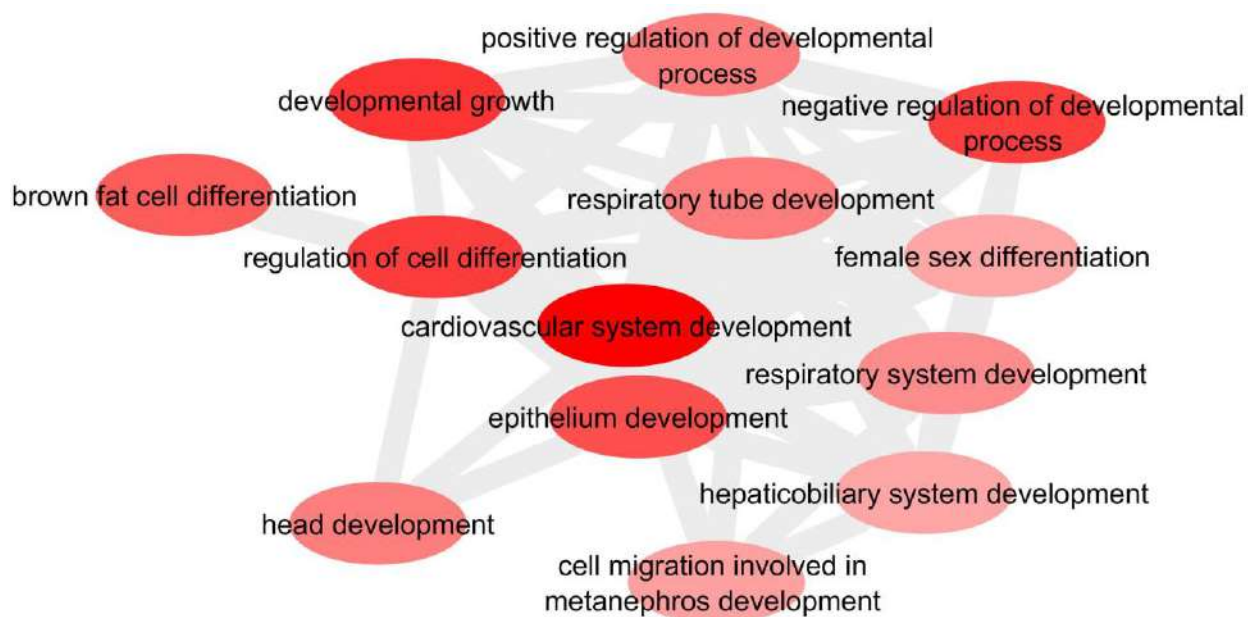


Figura 8S. Red génica de procesos biológicos asociados a diferenciación celular y desarrollo de genes regulados al alza depósito independiente

Tabla 12S. Ontología de genes. Factores de transcripción regulados a la baja depósito independiente, asociados a procesos biológicos relacionados con diferenciación celular y desarrollo.

Nombre del gen	Símbolo del gen	Veces de cambio TA visceral	Valor p TA visceral	Veces de cambio TA subcutáneo	Valor p TA subcutáneo
CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), alpha	Cebpa	100.114	0.000	77.236	0.001
estrogen related receptor, alpha	Esrra	24.415	0.000	22.555	0.000
ets variant gene 4 (E1A enhancer binding protein, E1AF)	Etv4	29.369	0.040	82.269	0.038
forkhead box L1	Foxl1	26.958	0.042	68.878	0.001
forkhead box M1	Foxm1	43.178	0.003	297.019	0.024
GATA binding protein 4	Gata4	23.888	0.037	17.725	0.029
general transcription factor II I	Gtf2i	3.947	0.000	5.108	0.003
hypoxia inducible factor 1, alpha subunit	Hif1a	262.410	0.011	317.883	0.020
high mobility group box 3	Hmgb3	3.459	0.002	3.712	0.000
homeo box A7	Hoxa7	4.125	0.043	18.879	0.038
Jumonji, AT rich interactive domain 2	Jarid2	22.465	0.014	31.229	0.047
Kruppel-like factor 13	Klf13	78.175	0.004	80.927	0.010
methyl-CpG binding domain protein 3	Mbd3	3.808	0.000	4.297	0.008
Myocyte enhancer factor 2D	Mef2d	41.111	0.000	55.063	0.016
myogenic differentiation 1	Myod1	46.532	0.021	38.883	0.017
nuclear receptor co-repressor 2	Ncor2	5.681	0.007	3.787	0.000
neurogenic differentiation 2	Neurod2	6.048	0.015	36.957	0.008
nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic, calcineurin-dependent 1	Nfatc1	3.972	0.007	2.127	0.007
nuclear receptor subfamily 1, group H, member 3	Nr1h3	3.979	0.007	4.347	0.001
nuclear receptor subfamily 5, group A, member 1	Nr5a1	51.020	0.030	91.213	0.008
Pbx/knotted 1 homeobox	Pknox1	4.507	0.000	4.908	0.013

peroxisome proliferator activated receptor alpha	Ppara	5.620	0.000	18.974	0.045
peroxisome proliferator activated receptor gamma	Pparg	5.326	0.024	1.600	0.001
RAR-related orphan receptor gamma	Rorc	17.645	0.005	23.597	0.008
retinoid X receptor alpha	Rxra	108.102	0.000	176.812	0.006
short stature homeobox 2	Shox2	14.785	0.000	3.295	0.000
SRY-box containing gene 17	Sox17	20.307	0.001	25.311	0.023
SRY-box containing gene 18	Sox18	12.233	0.024	10.288	0.029
SRY-box containing gene 4 /// similar to Transcription factor SOX-4	Sox4	107.659	0.026	92.958	0.030
SRY-box containing gene 6	Sox6	2.957	0.004	4.347	0.034
signal transducer and activator of transcription 5A	Stat5a	169.438	0.004	76.456	0.003
tubby-like protein 3	Tulp3	15.646	0.005	22.109	0.015
ventral anterior homeobox containing gene 1	Vax1	31.515	0.018	13.144	0.007
Y box protein 1	Ybx1	1298.989	0.003	1022.873	0.007
zinc finger protein, multitype 1	Zfpm1	70.759	0.002	99.216	0.009

Apartado C

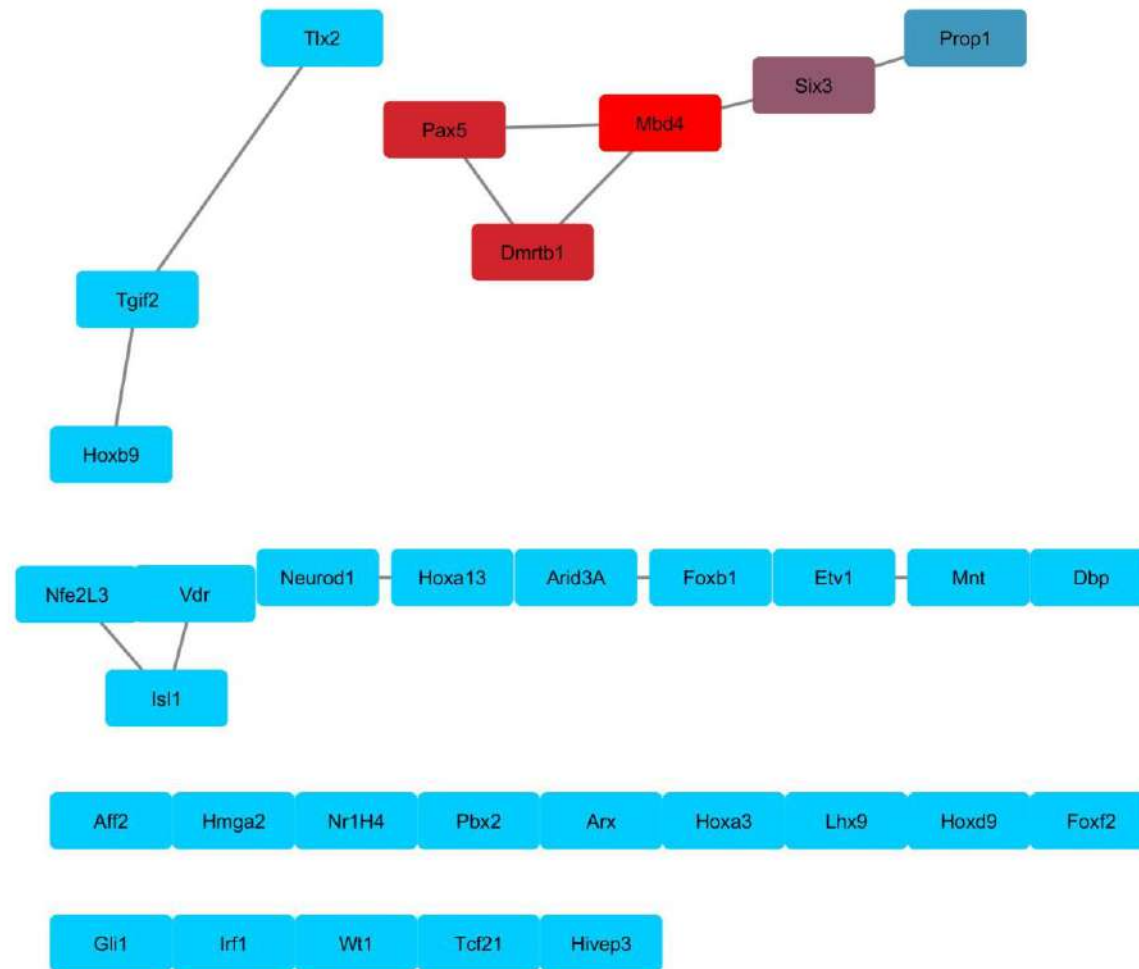


Figura 9S. Red de co-expresión génica de factores de transcripción regulados a la baja en TA visceral. Estos genes se extrajeron de la red génica de procesos biológicos construida a partir del análisis ontológico funcional. Las interacciones en la red muestran co-expresión entre los genes.

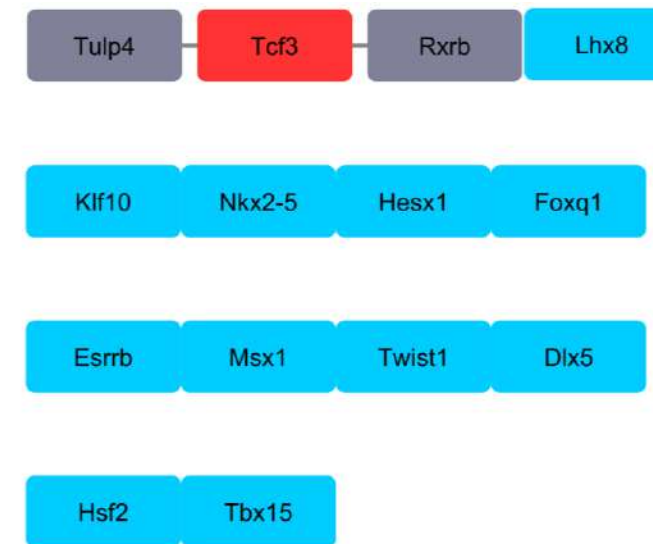
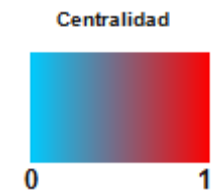


Figura 10S. Red de co-expresión génica de factores de transcripción regulados a la baja en TAsubcutáneo. Estos genes se extrajeron de la red génica de procesos biológicos construida a partir del análisis ontológico funcional. Las interacciones en la red muestran co-expresión entre los genes.

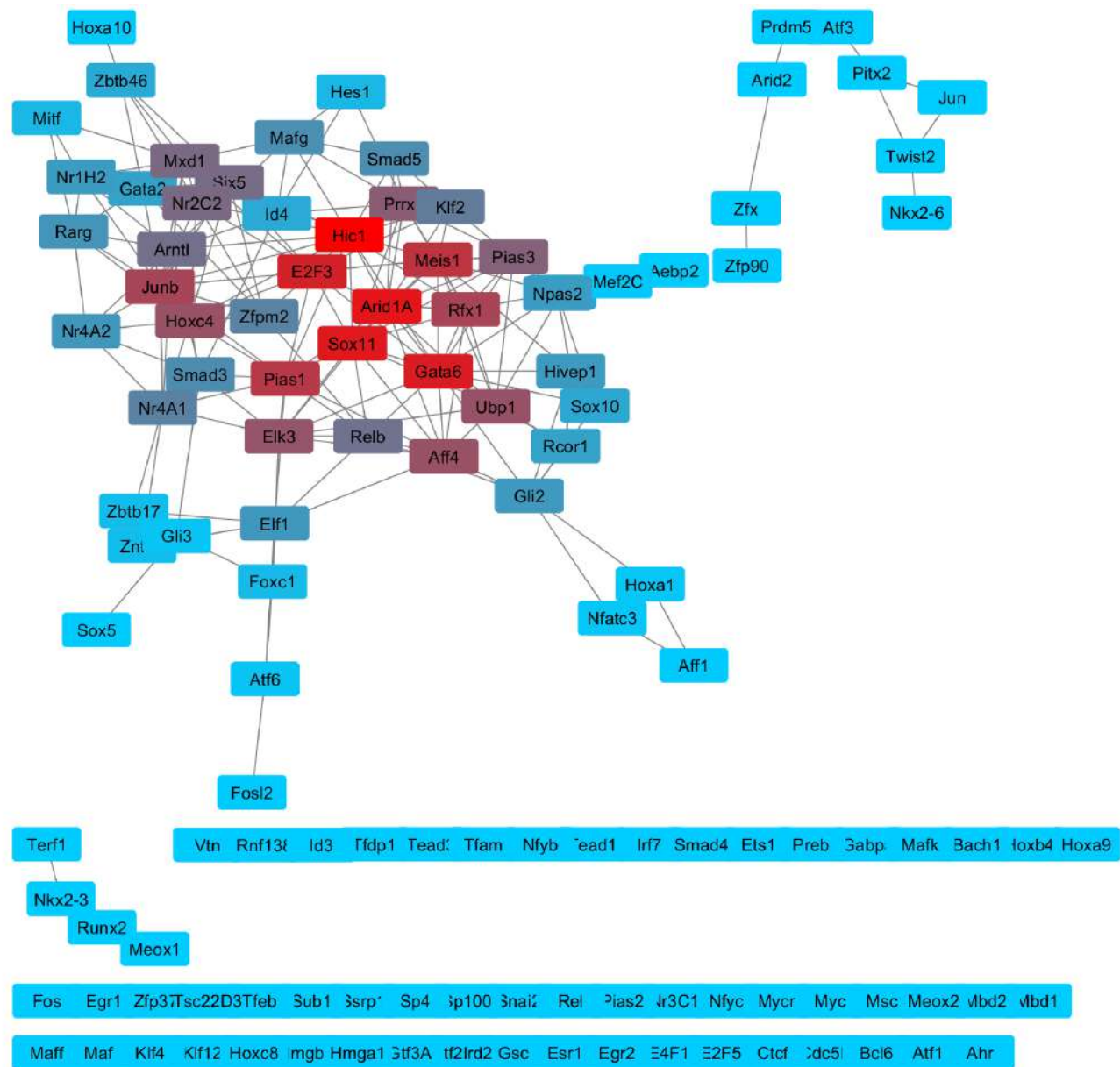


Figura 11S. Red de co-expresión génica de factores de transcripción regulados a la baja depósito independiente. TA visceral. Estos genes se extrajeron de la red génica de procesos biológicos construida a partir del análisis ontológico funcional. Las interacciones en la red muestran co-expresión entre los genes.

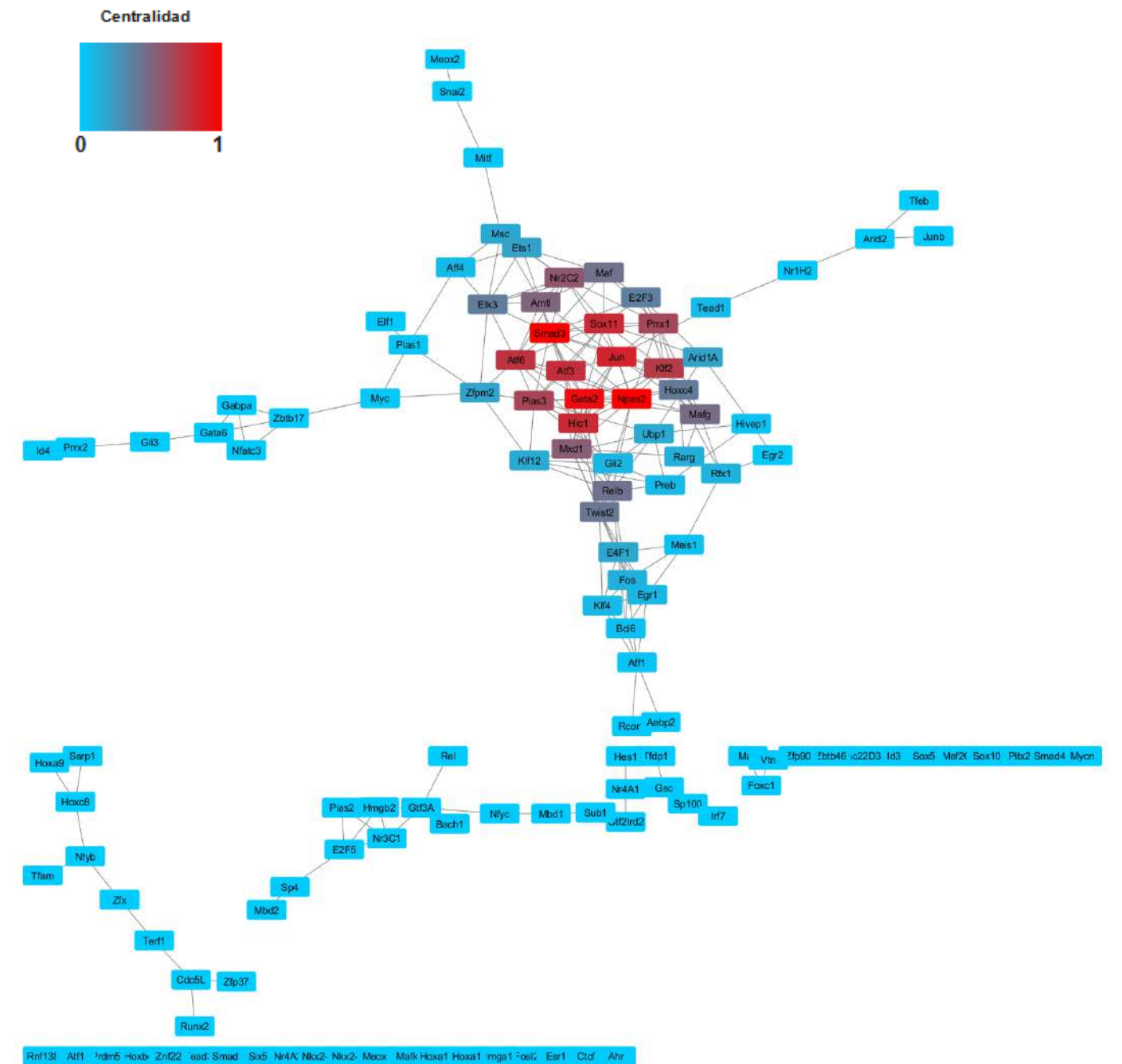


Figura 12S. Red de co-expresión génica de factores de transcripción regulados a la baja depósito independiente. TA subcutáneo. Estos genes se extrajeron de la red génica de procesos biológicos construida a partir del análisis ontológico funcional. Las interacciones en la red muestran co-expresión entre los genes.

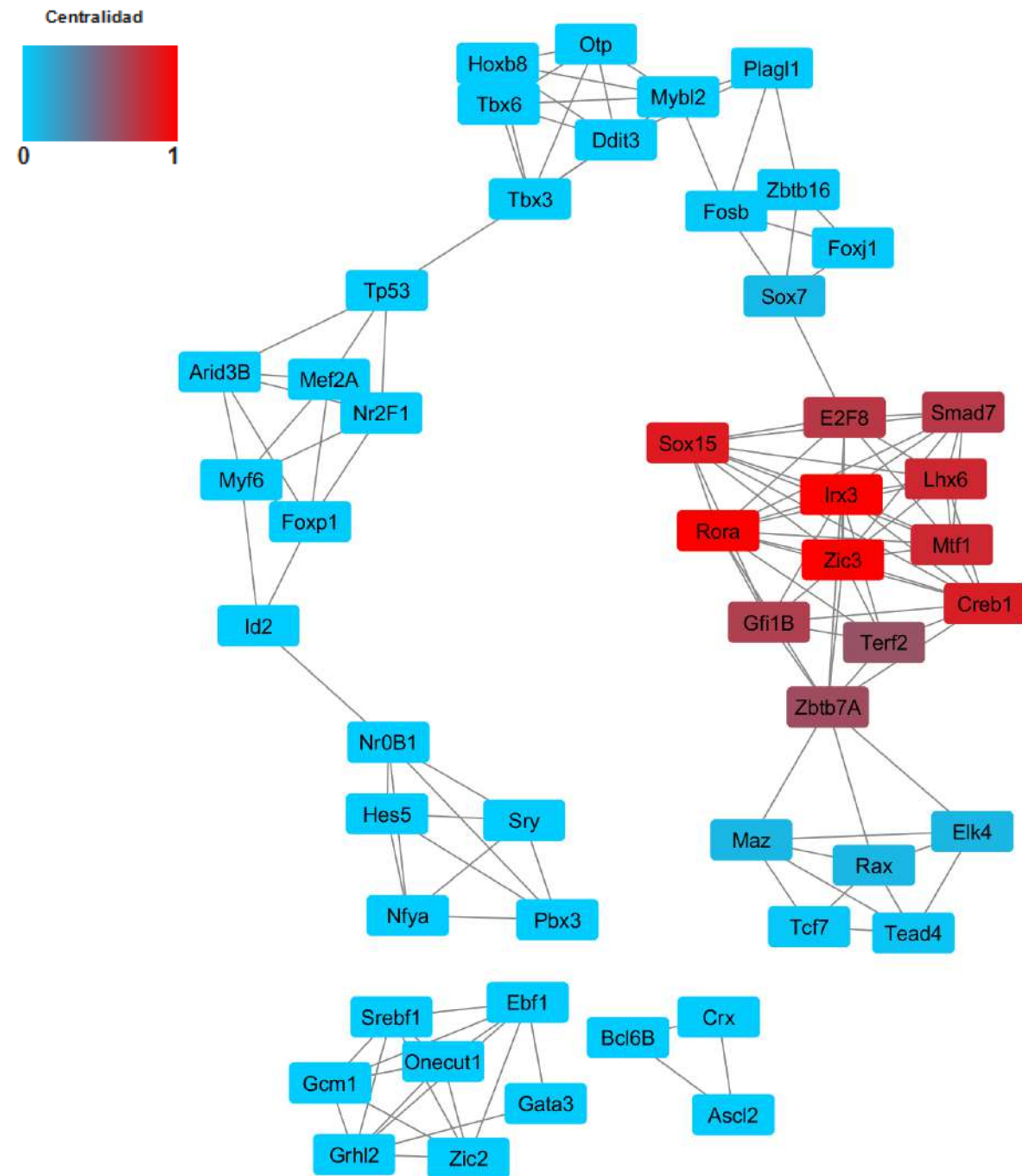


Figura 13S. Red de co-expresión génica de factores de transcripción regulados al alza en TA visceral. Estos genes se extrajeron de la red génica de procesos biológicos construida a partir del análisis ontológico funcional. Las interacciones en la red muestran co-expresión entre los genes.

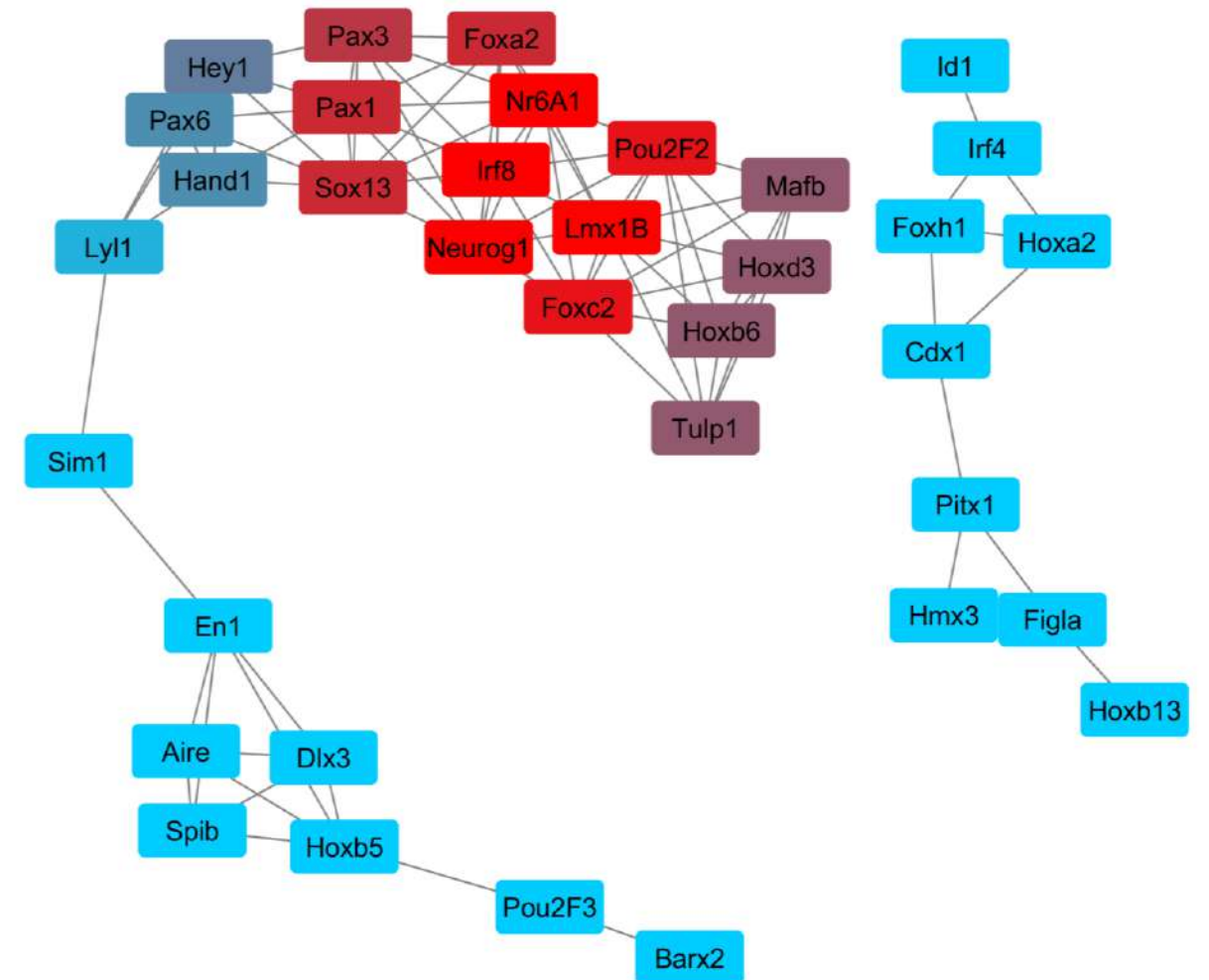


Figura 14S. Red de co-expresión génica de factores de transcripción regulados al alza en TA subcutáneo. Estos genes se extrajeron de la red génica de procesos biológicos construida a partir del análisis ontológico funcional. Las interacciones en la red muestran co-expresión entre los genes.

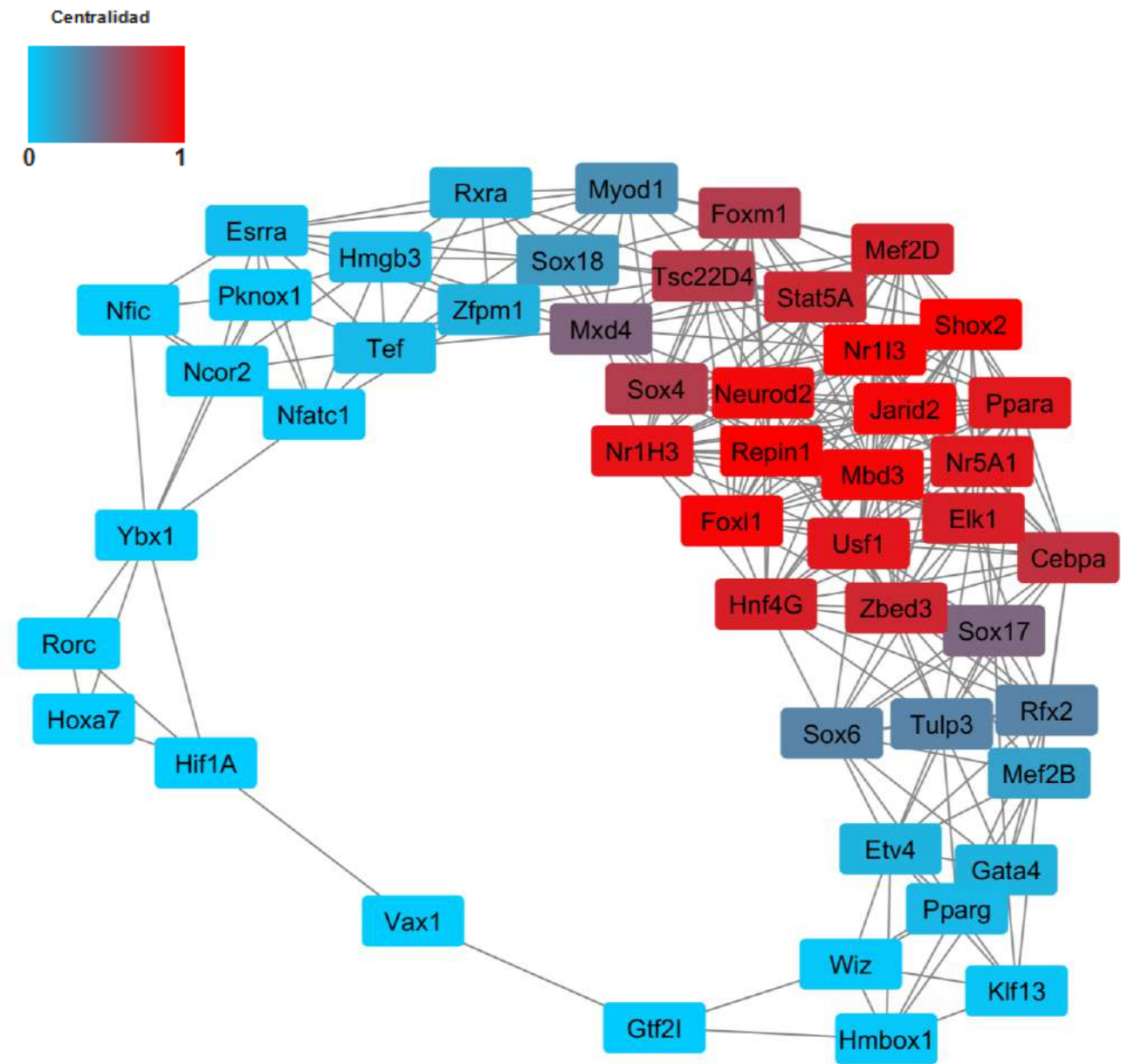


Figura 15S. Red de co-expresión génica de factores de transcripción regulados al alza depósito independiente. TA visceral. Estos genes se extrajeron de la red génica de procesos biológicos construida a partir del análisis ontológico funcional. Las interacciones en la red muestran co-expresión entre los genes.

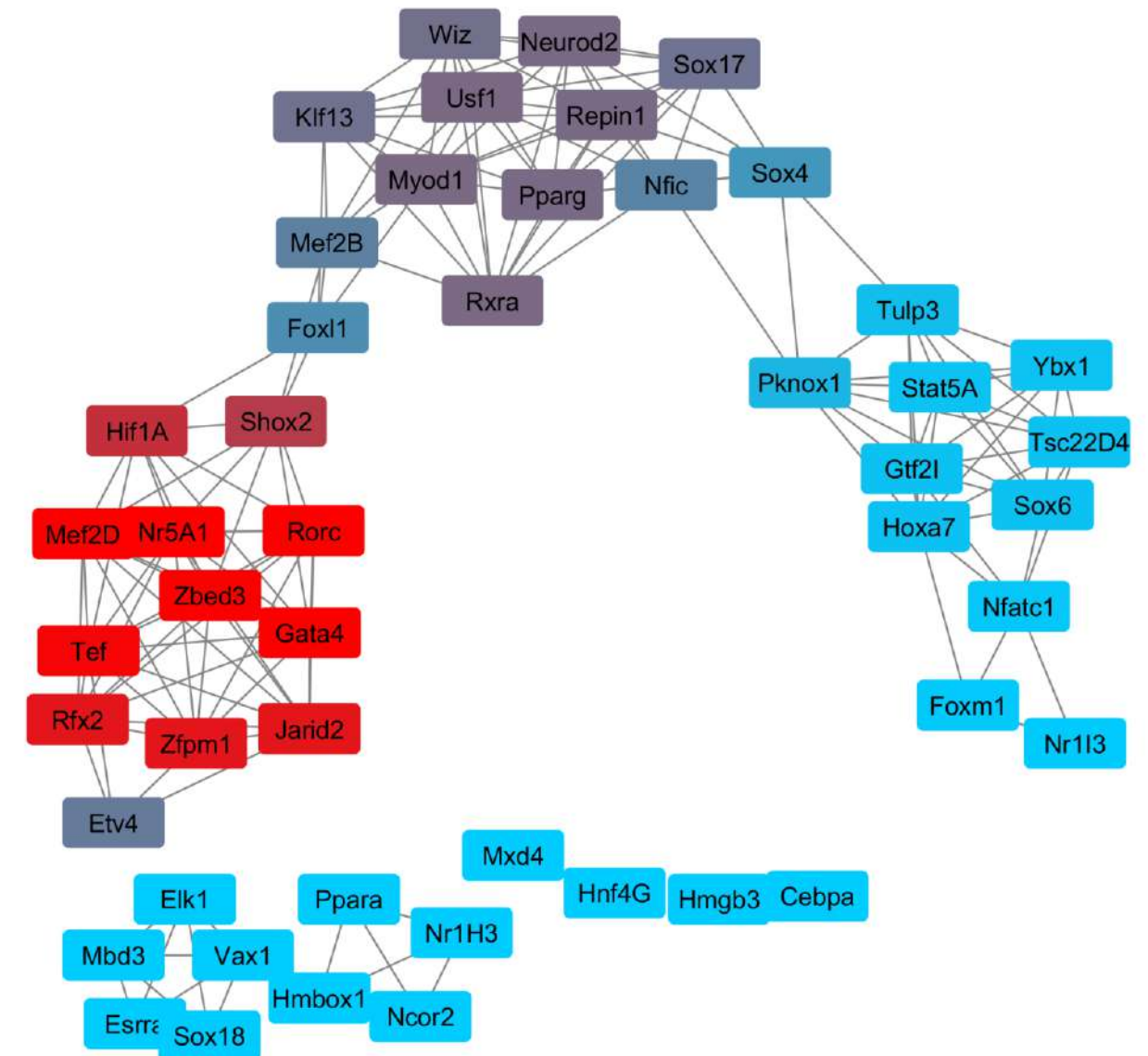


Figura 16S. Red de co-expresión génica de factores de transcripción regulados al alza depósito independiente. TA subcutáneo. Estos genes se extrajeron de la red génica de procesos biológicos construida a partir del análisis ontológico funcional. Las interacciones en la red muestran co-expresión entre los genes.

REFERENCIAS

- Biddinger S.B. and Emanuelli B. 2010. Insulin resistance in metabolic syndrome. Philadelphia: Springer Science, pp175-198
- Bouchard C. 2008. Gene–Environment Interactions in the Etiology of Obesity: Defining the Fundamentals. *Obesity* (Silver Spring). 2008 Dec;16 Suppl 3:S5-S10.
- Briones V. R., Chen S., Riegel A. T., Lechleider R. J. 2006. Mechanism of fibroblast growth factor-binding protein 1 repression by TGF- β . *Biochem Biophys Res Commun*. 2006 Jun 30;345(2):595-601.
- Brodie A. E., Manning V. A., and Hu C. Y. 1996. Inhibitors of Preadipocyte Differentiation Induce COUP-TF Binding to a PPAR/RXR Binding Sequence. *Biochem Biophys Res Commun*. 1996 Nov 21;228(3):655-61.
- Cano G. C. 2010. Extracción de conocimiento de microarrays y literature biomédica para el estudio de la regulación genética. Memorias para la obtención del Título de Doctor. Universidad de Granada, España. Dpto. Ciencias de la computación e Inteligencia Artificial. ISBN: 978-84-693-1323-7.
- Castro-Muñozledo F., Beltrán-Langarica A., and Kuri-Harcuch W. Commitment of 3T3-F442A cells to adipocyte differentiation takes place during the first 24–36 h after adipogenic stimulation: TNF- α inhibits commitment. *Exp Cell Res*. 2003 Apr 1;284(2):163-72.
- Carvajal K., Hernández-Esquivel M., Moreno-Sánchez R. 2007. PPARs, síndrome metabólico y enfermedad cardíaca. *www.archcardiolmex.org.mx*. Vol. 77 Supl. 4 /Octubre-Diciembre: S4, 66-76.
- Chen F., Zamule S. M., Coslo D. M., Chen T., and Omiecinski C. J. 2013. The human constitutive androstane receptor promotes the differentiation and maturation of hepatic-like cells. *Dev Biol*. 2013 December 15; 384(2): 155-65
- Clavijo M. A., Gómez-Camargo D., Gómez-Alegría C. 2007. Adipogénesis *in vitro* de células 3T3-L1. *Rev. Fac. Med*. Vol 15 No. 2 Bogotá.
- Cawthorn W. P., Bree A. J., Yao Y., Du B., Hemati N., Martinez-Santibañez G., and MacDougald O. A. 2012a. Wnt6, Wnt10a and Wnt10b inhibit adipogenesis and stimulate osteoblastogenesis through a β -catenin-dependent mechanism. *Bone*. February ; 50(2): 477–489.
- Cawthorn W. P., Scheller E. L., and MacDougald O. A. 2012b. Adipose tissue stem cells meet preadipocyte commitment: going back to the future. *J Lipid Res*. 2012 Feb; 53 (2): 227-46.

- Cederberg A., Grønning L. M., Ahrén B., Taskén K., Carlsson P., and Enerbäck S. 2001. *FOXC2* Is a Winged Helix Gene that Counteracts Obesity, Hypertriglyceridemia, and Diet-Induced Insulin Resistance. *Cell*, Vol. 106, 563–573, September 7, 2001.
- Choi J., and Bothwell A. L. M. 2012. The Nuclear Receptor PPARs as Important Regulators of T-Cell Functions and Autoimmune Diseases. *Mol. Cells* 33, 217-222, March 31.
- Czech M. P. 2017. Insulin action and resistance in obesity and type 2 diabetes. *Nat Med*. 2017 Jul 11;23(7):804-814.
- Després J. P., and Lemieux I. 2006. Abdominal Obesity and metabolic syndrome. *Nature*. 2006 Dec 14;444(7121):881-7.
- Dixon J. B. 2010. The effect of obesity on health outcomes. *Mol Cell Endocrinol*. 2010 Mar 25;316(2):104-8.
- Elsen M., Raschke S., Tennagels N., Schwahn U., Jelenik T., Roden M., Romacho T., and Eckel J. 2013. BMP4 and BMP7 induce the white-to-brown transition of primary human adipose stem cells. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2014 Mar 1;306(5):C431-40.
- Encuesta Nacional de Salud y Nutrición. 2016. México. Instituto Nacional de Salud Pública. 31 de octubre del 2016.
- Eguchi J., Yan Q. W., Schones D. E., Kamal M., Hsu C. H., Zhang M. Q., Crawford G. E., and Rosen E. D. 2008. Interferon-regulatory factors (IRFs) are transcriptional regulators of adipogenesis. *Cell Metab*. January ; 7(1): 86–94.
- Fu M., Sun T., Bookout A. L., Downes M., Yu R. T., Evans R. M., and Mangelsdorf D. J. 2005. A Nuclear Receptor Atlas: 3T3-L1 Adipogenesis. *Mol Endocrinol*. 2005 Oct;19(10):2437-50.
- Gachon F., Leuenberger N., Claudel T., Gos P., Jouffe C., Olela F. F., du J. X., Wahli W., and Schibler U. 2011. Proline- and acidic amino acid-rich basic leucine zipper proteins modulate peroxisome proliferator-activated receptor α (PPAR α) activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 Mar 22;108(12):4794-9.
- Gan L., Liu Z., Jin W., Zhou Z., and Sun C. 2015. Foxc2 enhances proliferation and inhibits apoptosis through activating Akt/mTORC1 signaling pathway in mouse preadipocytes. *J Lipid Res*. 2015 Aug;56(8):1471-80.
- Gesta S., Blüher M., Yamamoto Y., Norris A. W., Berndt J., Kralisch S., Boucher J., Lewis C., and Kahn C. R. Evidence for a role of developmental genes in the origin of obesity and body fat distribution. 6676–6681 *PNAS* April 25, 2006 vol. 103 no. 17.
- Gondo S., Yanase T., Okabe T., Tanaka T., Morinaga H., Nomura M., Goto K., and Nawata H. 2004. SF-1/Ad4BP transforms primary long-term cultured bone marrow cells into ACTH-responsive steroidogenic cells. *Genes Cells*. 2004 Dec;9(12):1239-47.

- González-Sandoval C. E, Díaz B. Y, Mendizabal-Ruiz A. P., Medina D. E y Morales J. A. 2014. Prevalencia de obesidad y perfil lipídico alterado en jóvenes universitarios. *Nutr Hosp.* 29(2):315-321.
- Green H and Kehinde O. 1975. An Established Preadipose Cell Line and its Differentiation in Culture II. Factors Affecting the Adipose Conversion. *Cell*, Vol. 5, 19-27, May, Copyright© 1975 by MIT.
- Haaning A. M., Quinn M. E., and Ware S. M. 2013. Heterotaxy-spectrum heart defects in *Zic3* hypomorphic mice. *Pediatr Res.* 2013 November ; 74(5): 494–502.
- Hacker D. C., and Deitel M. 1991. The Etiology of Obesity. *Obesity Surgery*, 1, 21-27.
- Huang H., Songa T., Li X., Hua L., Hea Q., Liua M. Lane M. D., and Tanga, Q. 2009. BMP signaling pathway is required for commitment of C3H10T1/2 pluripotent stem cells to the adipocyte lineage. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009 Aug 4;106(31):12670-5.
- Jeffery E., Church C. D., Holtrup B., Colman L., Rodeheffer M. S. 2015. Rapid depot-specific activation of adipocyte precursor cells at the onset of obesity. *Nat Cell Biol.* Apr;17(4):376-85.
- Jetten A. M. 2009. Retinoid-related orphan receptors (RORs): critical roles in development, immunity, circadian rhythm, and cellular metabolism. *Nucl Recept Signal.* 2009;7:e003.
- Jo J., Gavrilova O., Pack, Jou W., Mullen S, Sumner A. E, Cushman S. W, Perival V. 2009. Hypertrophy and/or Hyperplasia: Dynamics of Adipose Tissue Growth. *PLoS Comput Biol.* 2009 Mar;5(3):e1000324.
- Kershaw E. E. and Flier J. S. 2004. Adipose Tissue as an Endocrine Organ. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004 Jun;89(6):2548-56.
- LifeMap. Embryonic development and stem cells compendium. <http://discovery.lifemapsc.com/in-vivo-development/adipose>. (Reviewed: 19/10/2016).
- Lowe C. E., O’Rahilly S., and Rochford J. J. 2011. Adipogenesis at a glance. *J Cell Sci.* 2011 Aug 15;124(Pt 16):2681-6.
- Ma W., Lu S., Sun T., Wang X., Ma Y., Zhang X., Zhao R., Yunshan Wang Y. 2014. Twist 1 regulates the expression of PPAR γ during hormone-induced 3T3-L1 preadipocyte differentiation: a possible role in obesity and associated diseases. *Lipids Health Dis.* 2014 Aug 16;13:132.
- Macotela Y., Emanuelli B., Mori M.A., Gesta S, Schulz T.J., Tseng Y.H., Kahn C.R. 2012. Intrinsic differences in adipocyte precursor cells from different white fat depots. *Diabetes.* Jul;61(7):1691-9.

- McKinsey T. A., Zhang C. L., and Olson E. N., 2002. MEF2: a calcium-dependent regulator of cell division, differentiation and death. *Trends Biochem Sci.* 2002 Jan;27(1):40-7.
- MEF2A_HUMAN,Q02078. Reviewed: 20/06/2017.
<http://www.uniprot.org/uniprot/Q02078#function>
- Moseti D., Regassa A., and Kim W. K. 2016. Molecular Regulation of Adipogenesis and Potential Anti-Adipogenic Bioactive Molecules. *Int. J. Mol. Sci.* 17, 124.
- Ohoka N., Kato S., Takahashi Y., Hayashi H., and Sato R. 2009. The Orphan Nuclear Receptor ROR α Restrains Adipocyte Differentiation through a Reduction of C/EBP β Activity and Perilipin Gene Expression. *Mol Endocrinol.* 2009 Jun;23(6):759-71.
- OMS. Obesidad y sobrepeso. (2015). <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/es/>
- Patti M. E, Kutmon M, Hanspers K., Martijn van Iersel, Villanueva C. Adipogenesis genes (Musculus). last modified on 15 July 2016.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/biosystems/198299?report=docsum>
- Pellegrinelli V., Carobbio S., and Vidal-Puig A. 2016. Adipose tissue plasticity: how fat depots respond differently to pathophysiological cues. *Diabetologia.* 2016 Jun;59(6):1075-88.
- Ramírez J., Chávez L., Santillán J. L., y Guzmán S. 2003. Microarreglos de ADN. Depto Bioquímica, Fac Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. Cd Universitaria, México, DF, MÉXICO. (2003). <http://bq.unam.mx/mensajebioquimico>.
- Ravanpay A. C., and Olson J. M. 2008. E Protein Dosage Influences Brain Development More Than Family Member Identity. *J Neurosci Res.* 2008 May 15;86(7):1472-81.
- Rosen E. D., and MacDougald O. A. 2006 Adipocyte differentiation from the inside out. *Nature reviews.* *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2006 Dec;7(12):885-96.
- Rosen E. D., and Spiegelman B. M. 2014. What we talk about when we talk about fat. *Cell.* January 16; 156(0): 20–44.
- Rosen E. D., Walkey C. J., Puigserver P., and Spiegelman B. M. 2016. Transcriptional regulation of adipogenesis. *Genes Dev.* 2000 Jun 1;14(11):1293-307.
- Sánchez-Muñoz F. García-Macedo R. Alarcón-Aguilar F. y Cruz Miguel. 2005. Adipocinas, tejido adiposo y su relación con células del sistema inmune. *Gac Méd Méx* Vol. 141 No. 6.
- Sarjeant K., and Stephens J. M. 2017. Adipogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2012 Sep 1;4(9):a008417.
- Sosa-Garrocho M. y Macías-Silvia M. 2004. El Factor De Crecimiento Transformante Beta (Tgf-B): Funciones Y Vías De Transducción. Departamento de Biología Celular. Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México. *REB* 23 (1): 3-11.

- Soukas A., Nicholas D., Socci N. D., Saatkamp B. D., Novelli S., and Friedman J. M. 2001. Distinct Transcriptional Profiles of Adipogenesis *in Vivo* and *in Vitro*. *J Biol Chem*. 2001 Sep 7;276(36):34167-74.
- Spalding K. L., Arner E., Westermark P.O., Bernard S., Buchholz B.A., Bergmann O., Blomqvist L., Hoffstedt J., Näslund E., Britton T., Concha H., Hassan M., Rydén M., Frisén J., Arner P. 2008. Dynamics of fat cell turnover in humans. *Nature*. 2008 Jun 5;453(7196):783-7.
- Stolic M., Russell A., Hutley L., Fielding G., MacDonald G., Whitehead J., and Prins J. 2002. Glucose uptake and insulin action in human adipose tissue--influence of BMI, anatomical depot and body fat distribution. *Int. J Obes. Relat Metab Disord*. 2002; 26:17–23.
- Strissel K. J., Stanchev Z., Miyoshi H., Perfield J. W., II, DeFuria J., Jick Z., Greenberg A. S., and Obin M. S. 2007. Adipocyte Death, Adipose Tissue Remodeling, and Obesity Complications. *Diabetes*, vol. 56, december.
- Suzuki R., and Shimodaira H. 2006. Pvcust: an R package for assessing the uncertainty in hierarchical clustering. *Bioinformatics application note*. Vol. 22 no. 12, pages 1540–1542.
- Tanaka T., Yoshida N., Kishimoto T., and Akira S. 1997. Defective adipocyte differentiation in mice lacking the C/EBP β and/or C/EBP δ gene. *EMBO J*. 1997 Dec 15;16(24):7432-43.
- Tang Q., Otto T. C., and Lane M. D. 2004. Commitment of C3H10T1_2 pluripotent stem cells to the adipocyte lineage. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Jun 29;101(26):9607-11.
- Tchkonia T., Lenburg M., Thomou T., Giorgadze N., Frampton G., Pirtskhalava T., Cartwright A., Cartwright M., Flanagan J., Karagiannides L., Gerry N., Forse R. A., Tchoukalova Y., Jensen M.D., Pothoulakis C., Kirkland J. L. 2007. Identification of depot-specific human fat cell progenitors through distinct expression profiles and developmental gene patterns. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 292: E298–E307.
- Tchkonia T., Thomou T., Zhu Y., Karagiannides I., Pothoulakis C., Jense M. D., and Kirkland L. J. 2013. Mechanism and metabolic implication of regional differences among fat depots. *Cell Metab*. 2013 May 7; 17(5): 644-656.
- Tran T.T., and Kahn C. R. 2010. Transplantation of adipose tissue and adipose-derived stem cells as a tool to study metabolic physiology and for treatment of disease. *Nat Rev Endocrinol*. April; 6(4): 195-213.
- Tsurutani Y., Fujimoto M., Takemoto M., Irisuna H., Koshizaka M., Onishi S., Ishikawa T., Mezawa M., He P., Honjo S., Maezawa Y., Saito Y., Yokote K.. 2011. The roles of transforming growth factor- β and Smad3 signaling in adipocyte differentiation and obesity. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011 Apr 1;407(1):68-73.

- Tremolada C., Colombo V., and Ventura C. 2016. Adipose Tissue and Mesenchymal Stem Cells: State of the Art and Lipogems® Technology Development. *Curr Stem Cell Rep* (2016) 2:304–312.
- Vögele Claus. 2005. Etiology of obesity. School of Psychology and therapeutic studies, Roehampton University, London, UK. Obesity and Binge Eating Disorder. *Bibliotheca Psychiatrica*. No. 171.
- Wang F., Mullican S. E, DiSpirito J. R., Peed L.C., and Lazar M. A. 2013. Lipoatrophy and severe metabolic disturbance in mice with fat-specific deletion of PPAR γ . *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013 Nov 12;110(46):18656-61.
- Wang Q. A., Tao C., Gupta R. K., and Scherer P. E . 2013. Tracking adipogenesis during white adipose tissue development, expansion and regeneration. *Nat Med*. 2013 Oct;19(10):1338-44.
- Wang Q. A., Tao C., Jiang L., Shao M., Ye R., Zhu Y., Gordillo R., Ali A., Lian Y., Holland W. L., Gupta R. K., and Scherer P. E. 2015. Distinct regulatory mechanisms governing embryonic versus adult adipocyte maturation. *Nat Cell Biol*. 2015 Sep;17(9):1099-111.
- Wang Y., Rimm E. B., Stampfer M. J., Willett W. C., Hu F. B. 2005. Comparison of abdominal adiposity and overall obesity in predicting risk of type 2 diabetes among men. *Am J Clin Nutr*. 2005; 81:555–563.
- White U. A., and Stephens J. M. 2011. The gp130 Receptor Cytokine Family: Regulators of Adipocyte Development and Function. *Curr Pharm Des*. 2011 ; 17(4): 340–346.
- White U. A., Stewart W. C., Mynatt R. L., and Stephens J. M. 2008. Neuropoietin Attenuates Adipogenesis and Induces Insulin Resistance in Adipocytes. *J Biol Chem*. 2008 Aug 15; 283(33): 22505–22512.
- Yang J., Yang Q., Yu J., Li X., Yu S., and Zhang X. 2016. SPOCK1 promotes the proliferation, migration and invasion of glioma cells through PI3K/AKT and Wnt/ β -catenin signaling pathways. *Oncol Rep*. 2016 Jun;35(6):3566-76.
- Zhang B., Horvath S., 2005. A general framework for weighted gene co-expression network analysis. *Stat Appl Genet Mol Biol*. 2005;4:Article17.
- Zhang H. M., Chen H., Liu H., Gong J., Wang H., and Guo A. Y. 2012. AnimalTFDB: a comprehensive animal transcription factor database. *Nucleic Acids Res*. 2012 Jan; 40(Database issue): D144–D149.
- Zechel C. 2005. The Germ Cell Nuclear Factor (GCNF). *Molecular Reproduction And Development* 72:550–556.