



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

FACULTAD DE MEDICINA

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E
INVESTIGACIÓN

INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y
NUTRICIÓN SALVADOR ZUBIRÁN

**“DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD DE LAS CÉLULAS
MESENQUIMATOSAS DE PACIENTES CON SOBREPESO U OBESIDAD
I, CON Y SIN DIABETES MELLITUS TIPO 2, PARA GENERAR
ADIPOCITOS BEIGE”**

TESIS

**PARA OBTENER EL TÍTULO DE
ESPECIALISTA EN ENDOCRINOLOGIA**

PRESENTA

DR. JUAN MAURICIO VERA ZERTUCHE

TUTORES DE TESIS

DRA. IVETTE CRUZ BAUTISTA

Ciudad de México

2019



INCMNSZ



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.

Índice

1. Resumen.....	3
2. Marco teórico.....	4
3. Justificación.....	4
4. Hipótesis.....	5
5. Objetivos.....	5
6. Material y métodos.....	5
7. Resultados.....	8
8. Discusión.....	10
9. Conclusiones.....	12
10. Referencias.....	13

Resumen

Título: “DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD DE LAS CÉLULAS MESENQUIMATOSAS DE PACIENTES CON SOBREPESO U OBESIDAD I, CON Y SIN DIABETES MELLITUS TIPO 2, PARA GENERAR ADIPOCITOS BEIGE”

Introducción: Estudios en humanos y roedores, han demostrado que la actividad del tejido adiposo pardo y beige contrarrestan enfermedades metabólicas incluyendo la diabetes mellitus tipo 2 (DM2). Hasta la fecha no existe ningún estudio en humanos que identifique si a capacidad de desarrollar y activar adipocitos pardos en el tejido adiposo, confiere protección para el desarrollo de DM2 en personas con sobrepeso u obesidad.

Objetivo: Determinar la capacidad de formación y activación de adipocitos beige en pacientes con sobrepeso u obesidad grado I, con y sin DM2, a partir de células mesenquimatosas y adipocitos blancos..

Material y Métodos: Estudio clínico de análisis comparativo entre casos (biopsias de tejido adiposo subcutáneo en pacientes con DM2) y controles (con obesidad grado I ó sobrepeso).

Resultados: Hasta el momento se han reclutado 60 paciente (31 casos, 29 controles) en los cuales se demostró que hubo una mayor expresión relativa de los genes asociados a la termogénesis (GLUT4 1.0 vs 0.4 $p<0.05$, PPAR α 1 vs 0.7 $p<0.05$, PPAR 1 vs 0.7 $p<0.05$, PGC1 α ,1 vs 0.6 $p<0.05$, NRF1 1 vs 0.7 $p<0.05$) en el grupo control en comparación con los casos con DM2 respectivamente. La cuantificación del contenido relativo de ADN mitocondria en biopsias de tejido adiposo subcutáneo en pacientes control fue significativamente mayor en comparación con los casos con DM2 (1 vs 0.8 $p<05$).

Conclusiones: Los resultados preliminares expuestos sugieren que existe una menor capacidad de generación y activación de adipocitos beige a partir de células mesenquimales en pacientes con DM2 comparados con controles sin diabetes.

Marco teórico

El sobrepeso y la obesidad están asociados al desarrollo de diabetes mellitus tipo 2, aunque una proporción de personas con sobrepeso u obesidad no la desarrollan. Estas observaciones muestran que existen mecanismos celulares y fisiológicos que protegen a ciertas personas con un índice de masa corporal elevado de padecer DM2. Estudios en humanos y roedores, han demostrado que la actividad del tejido adiposo pardo (brown adipose tissue o BAT) y beige contrarrestan enfermedades metabólicas incluyendo la DM2(1). Ambos tipos de adipocitos comparten características fenotípicas y funcionales, incluyendo la gran capacidad catabólica que se traduce en el gasto de la energía química almacenada en lípidos para generar calor, también conocido como termogénesis(2). La generación de estos tipos de adipocitos, ha adquirido un gran interés por su potencial terapéutico contra la DM2. Un estudio reciente ha demostrado que la activación del tejido adiposo pardo controla la concentración plasmática de glucosa de manera circadiana en humanos (3). Los adipocitos blancos, beige y pardos, se desarrollan a partir de células madre mesenquimatosas. Se conocen los factores y estímulos que pueden promover tanto el desarrollo como la activación de los adipocitos beige y pardos, y la transdiferenciación entre adipocitos blancos y beige. Algunos de estos factores incluyen: Irisina, FGF21, agonistas β -adrenérgicos, de PPAR γ , etc. (4). Se tienen identificados una serie de marcadores específicos de adipocitos beige, pardos o de adipocitos blancos, los cuales juegan un papel central en la diferenciación y función de estos. Hasta la fecha no existe ningún estudio en humanos que identifique si la capacidad de desarrollar adipocitos pardos en el tejido adiposo, confiere protección para el desarrollo de DM2 en personas con sobrepeso u obesidad.

Justificación

La población mexicana tiene riesgo aumentado de padecer DM2. El tejido adiposo pardo y beige es capaz de contrarrestar las alteraciones metabólicas en pacientes con DM2 y obesidad. Estudiar la relación causal y funcional que pudiera existir entre la actividad metabólica entre el tejido adiposo beige y la DM2.

Hipótesis

Los sujetos con normopeso y los sujetos con sobrepeso y/o obesidad GI sin DM2 tendrán una mayor capacidad para generar y/o activar adipocitos beige comparados con los pacientes con sobrepeso y/o obesidad GI con DM2.

Objetivos

Objetivo principal: determinar la capacidad de formación y activación de adipocitos beige en pacientes con sobrepeso u obesidad grado I, con y sin DM2, a partir de células mesenquimatosas y adipocitos blancos.

Objetivos específicos:

1. Determinar la capacidad de diferenciación de las células madre mesenquimatosas hacia adipocitos beige, o adipocitos blancos de pacientes con sobrepeso u obesidad grado I con y sin DM2.
2. Determinar la capacidad de transdiferenciación de los adipocitos blancos para generar adipocitos beige de pacientes con sobrepeso u obesidad grado I, con y sin DM2.
3. Determinar la capacidad de activación y la función termogénica de los adipocitos beige ante un estímulo termogénico de pacientes con sobrepeso u obesidad grado I, con y sin DM2.

Material y Métodos

Diseño del estudio: Se trata de un estudio clínico de análisis comparativo entre casos y controles, de recolección transversal.

Universo de estudio: El universo de estudio está conformado por los siguientes grupos:

1. Casos con sobrepeso (IMC entre 25 y 29.9 Kg/m²) u obesidad GI (IMC entre 30 y 34.9 Kg/m²) con diagnóstico de DM2.
2. Controles con sobrepeso (IMC entre 25 y 29.9 Kg/m²) u obesidad GI (IMC entre 30 y 34.9 Kg/m²) sin diagnóstico de DM2 pareados por edad y género con los casos

3. Controles con normopeso ($\geq 18 \text{ kg/m}^2 \leq 24.9 \text{ kg/m}^2$,) sin diagnóstico de DM2 pareados por edad y genero con los casos

Selección de sujetos de estudio: Se seleccionaron de la base de datos de la clínica de Diabetes y de la consulta externa de Diabetes y Obesidad del INCMNSZ. Fueron citados en una ocasión en la Unidad de Investigación de Enfermedades Metabólicas (UIEM) del INCMNSZ.

El tamaño de la muestra fue estimado considerando un error alfa de 0.05 y un poder del 80% mediante los siguientes métodos.

Debido a que no se ha reportado ningún estudio que analice la diferencia entre la activación de la grasa beige en individuos con o sin diabetes mellitus de tipo 2, para la realización del cálculo de la muestra nos hemos basado en la siguiente información.

La grasa parda y beige se activan en condiciones de reducción de temperatura para generar calor, a costa del consumo de glucosa y lípidos. Los individuos con presencia de grasa parda (BAT+) presentan menores niveles de glucosa cuando son aclimatados al frío en comparación de individuos que no presentan grasa parda (BAT-). Grupo BAT; glucosa inicial = 90 ± 7.9 , glucosa final = 94 ± 3.4 . Grupo BAT+; glucosa inicial 93.4 ± 2 , glucosa final 89.5 ± 3 mg/ml. parda (5). Utilizando estos valores, se calculó el tamaño de muestra con la siguiente ecuación:

- Promedio inicial grupo control = 90
- Promedio final grupo control=94
- Promedio inicial grupo casos= 93.4
- Promedio final grupo casos=89.5
- Se considera la desviación estándar de las diferencias de los promedios inicial y final de cada grupo
- $Z_a=1.96$
- $Z_b=0.84$
- Delta= diferencia de promedio final de los grupos casos y controles.

$$n = \left[\frac{\sigma_d (Z_\alpha + Z_\beta)}{\Delta - 0} \right]^2 \quad n = \left[\frac{\sigma((94 - 90) - (89.5 - 93.4))(1.96 + 0.84)}{(89.5 - 94) - 0} \right]^2$$

El cálculo obtenido resulta en una muestra de 12 individuos por grupo.

Intervenciones:

1. Durante la visita inicial, los pacientes proporcionarán el consentimiento informado para participar en el estudio.
2. Se aplicó un cuestionario estandarizado de factores de riesgo para enfermedades metabólicas y cardiovasculares. Así como sus antecedentes personales patológicos y no patológicos.
3. Se recabó información antropométrica (circunferencia de cintura y cadera, índice cintura/estatura, peso, talla, IMC).
4. Se recabó información bioquímica (concentración plasmática de glucosa, creatinina, HbA1c, perfil de lípidos completos).
5. Los participantes fueron instruidos para seguir su dieta habitual durante el estudio. Además, fueron instruidos para mantener su actividad física habitual. Se utilizaron registros de dieta y un cuestionario que mide la actividad física (de la Universidad de Laval).
6. Se realizó densitometría (DXA) para estimar el contenido total de grasa corporal y visceral, masa muscular.
7. Biopsias de grasa subcutánea periumbilical: La biopsia de tejido adiposo, se otuvo cerca del ombligo. Se utilizó anestesia local y fue realizada por personal capacitado del servicio de cirugía endocrina en la Unidad de procedimientos quirúrgicos menores ubicado en la UIEM del INCMNSZ.

Las biopsias han sido utilizadas para:

a) Obtener células mesenquimatosas, las cuales se están diferenciando a adipocitos maduros utilizando dexametasona (1 μM), insulina (10 μM), indometacina (200 μM) y rosiglitazona (50, 250 y 500 nM).

b) Se está induciendo la diferenciación de dichas células mesenquimatosas a adipocitos beige, realizando cinéticas de diferenciación, utilizando concentraciones crecientes de rosiglitazona (50, 250 y 500 nM), CL 316-243 (15, 150 y 500 nM) y GW7647 (50, 100 y 250 nM).

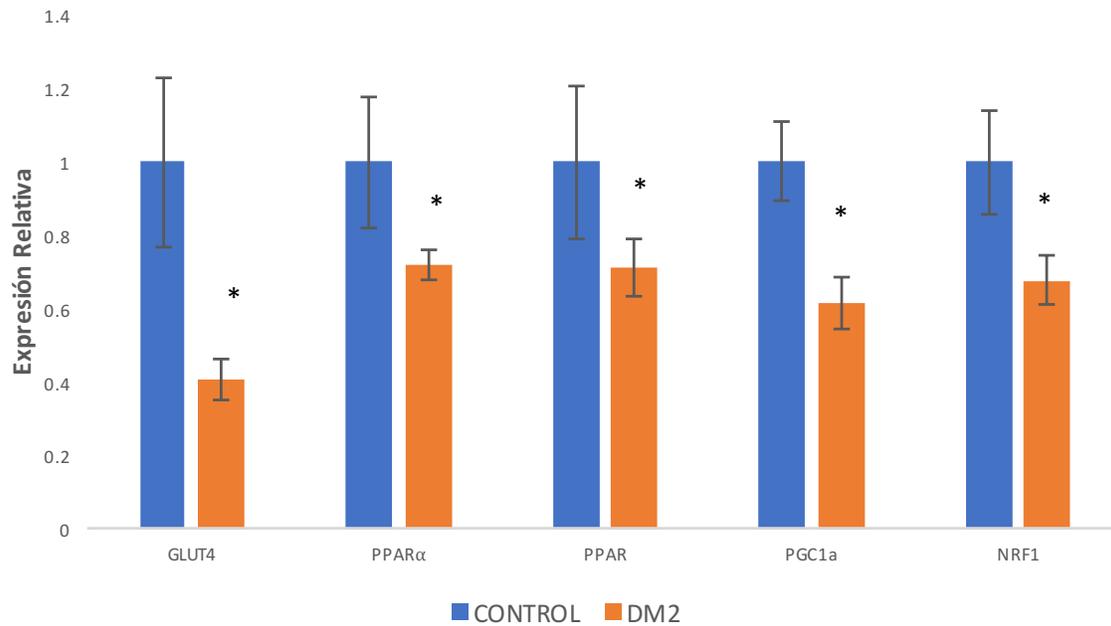
c) La determinación de la capacidad de activación de los adipocitos beige, se llevará a cabo analizando la expresión de genes que participan en la señalización simpática, oxidación de ácidos grasos, regulación de su actividad y biogénesis mitocondrial, así como la termogénesis, incluyendo reguladores transcripcionales como PGC1a, PRDM16, PRDM3, TAF7I, ZFP16, FOXA3, PPAR γ , IRF4, ZIC1, ZBTB16, NRF1 y moléculas efectoras (ADRB3, FABP3, CPT1b, UCP1-3) (6).

d) Se determinará el número de mitocondrias mediante el análisis de número de copias de DNA mitocondrial e inmunohistoquímica de proteínas mitocondriales como mtCO1.

Resultados

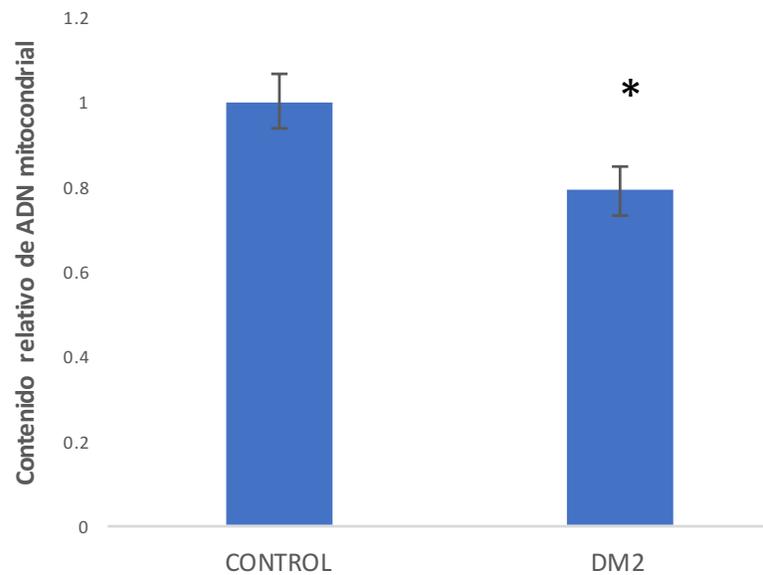
Se han reclutado un total de 60 pacientes de los cuales 31 presentan DM2 y 29 corresponden al grupo control sin diagnóstico de DM2. A continuación se presentan los resultados preliminares de la expresión de genes de termogénesis (gráfica 1) y la cuantificación del contenido relativo de ADN mitocondrial (gráfica 2) así como correlaciones de parámetros antropométricos y bioquímicos con los genes implicados en la vía termogénica (tabla 1).

Gráfica 1. Expresión de genes adipogénicos/termogénicos en biopsias de tejido adiposo subcutáneo.



Expresión relativa de genes asociados a la adipogénesis y a la activación de la vía termogénica en biopsias de tejido adiposo subcutáneo entre el grupo control (n=29) y el grupo con DM2 (31). Datos representados con error estándar ($p < 0.05$).

Gráfica 2. Cuantificación del contenido relativo de ADN mitocondrial en biopsias de tejido adiposo subcutáneo.



Cuantificación del contenido relativo de ADN mitocondrial en biopsias de tejido adiposo subcutáneo de pacientes control (n=29) y pacientes con DM2 (n=31). Datos representados con error estándar ($p < 0.05$).

Tabla 1. Correlación de genes asociados a la vía termigénica de biopsias de tejido adiposo subcutáneo con parámetros bioquímicos y antropométricos.

	Cidea	Cpt1b	Glut4	Fabp3	Nrf1	Ucp2	Ucp3	Ppara	Pparg
Glu	-.317*	-.241	-.242	-.009	-.108	-.160	-.201	.012	-.090
Ins	-.220	-.342*	-.206	-.082	-.189	-.203	-.083	.115	-.115
HbA1c	-0.252!!	-0.268!!	-.341*	-.037	-.209	-.284*	-.166	-.012	-0.256!!
Dx (glu)	-.349*	-.338*	-.353*	-.165	-.231	-.324*	-.394**	-.068	-0.255!!
Dx(HbA1C)	-.328*	-.343*	-.277	-.214	-0.26!!	-0.243!!	-.363*	-.068	-.111
Masa grasa (kg)	-.564**	-.243	-.362*	.123	-.110	-0.272!!	-.026	-.188	-.425**
Masa grasa (%)	-.626**	-.230	-.330*	.191	-.005	-0.257!!	-.066	-.177	-.468**
Indice masa grasa (kg/m2)	-.593**	-.268	-.382**	.091	-.139	-.315*	-.090	-.228	-.458**
Masa Magra (kg)	.359*	.048	.172	-.089	-.018	.206	.140	.191	.308*
Masa magra (%)	.548**	.065	.028	-.113	-.059	.061	.126	.135	.174
Masa musculo	.390**	.162	.172	-.200	-.070	.195	.112	.092	.326*
IMC	-.461**	-.143	-.312*	.050	-.101	-.248	-.014	-.169	-.346*

Correlación de Pearson. Rosa: correlación negativa. Verde: correlación positiva.

*P<0.05, ** p<0.01 !! p<0.08 y > 0.05

Discusión

En el presente estudio se puede inferir con respecto a los resultados preliminares que la capacidad termogénica de los adipocitos beige inducidos a partir de células mesenquimatosas de pacientes con y sin DM2 es distinta.

La expresión mayor de GLUT 4 en los adipocitos del grupo control es mayor que la del grupo con DM2. Dicho transportador se expresa mayormente en tejido adiposo marrón, se cree que guarda relación con su mayor capacidad de captación de glucosa en respuesta a un estímulo simpático inducido por exposición a frío (7).

Se sabe que los receptores activados por proliferadores de peroxisomas (PPAR) juegan un papel central en la función termogénica de los adipocitos, modulando el metabolismo lipídico y la sensibilidad a la insulina. La activación de PPAR recluta varios cofactores formando complejos transcripcionales distintos que culmina en la transdiferenciación del tejido adiposo blanco a tejido adiposo beige, potenciando su capacidad termogénica. En la gráfica 1 se muestra cómo el grupo control posee mayor expresión relativa de PPAR, PPARa y PGC1a (8).

La proteína NRF1 es necesaria para la biogénesis mitocondrial en los adipocitos, en el presente estudio se demuestra que la expresión relativa de dicho gen se es menor en el grupo con DM2. Lo anterior podría traducir un mecanismo implicado en los resultados obtenidos en la gráfica 2, en la cual se demuestra que el contenido relativo de ADN mitocondrial en las células de dichos pacientes se encuentra disminuida. Se sabe que la UCP1 (por sus cifras en inglés proteína desacopladora 1) es parte fundamental de la cadena respiratoria mitocondrial encargada de la termogénesis en adipocitos marrón y beige (9).

Existen otros factores además del diagnóstico de DM2 que influyen sobre los genes asociados a la vía termogénica. En la tabla 1 se expone una correlación negativa entre las medidas antropométricas asociadas comúnmente a enfermedades metabólicas tales como el porcentaje de grasa corporal, la grasa corporal total expresada en kg y el índice de masa corporal y el gen *Cidea*. *Cidea* codifica una proteína asociada a la inclusión lipídica localizada primordialmente en los adipocitos marrón. Su función es promover la fusión de las inclusiones vía hélices alfa anfipáticas. Éste complejo proteico embebido en la membrana que rodea las inclusiones lipídicas ayuda a controlar el crecimiento y la liberación de los lípidos que contiene, de esta manera favoreciendo su utilización para la generación de calor (10). Lo anterior puede explicar que las alteraciones en la termogénesis se pueden observar desde las etapas iniciales de la DM2 caracterizadas por hiperinsulinismo y aumento de la masa grasa.

Los hallazgos expuestos sugieren que la capacidad de generación y activación de adipocitos beige a partir de las células mesenquimales de tejido adiposo en pacientes con DM2 se encuentra limitada funcionalmente. Dicha limitación puede mermar el de generar un ambiente metabólico favorable que se traduzca en pérdida de peso y adecuado control glucémico en esta población. El presente estudio cuenta con la limitación de tratarse de resultados preliminares, por lo que el tamaño de la muestra por grupo es limitado, además se encuentra pendientes varias fases como la medición de la actividad mitocondrial, determinar los cambios en el potencial de membrana mitocondria, el nivel de fuga de protones a través de las proteínas UCP, ensayos de beta oxidación y

la capacidad termogénica; así como el análisis de correlación con las distintas variables clínicas recolectadas.

Conclusiones

- La expresión relativa de los genes involucrados en la función termogénica de los adipocitos beige inducidos a partir de células mesenquimales del tejido adiposo de pacientes con DM2 es menor en comparación con el grupo control.
- Parámetros antropométricos como el porcentaje de grasa corporal y el IMC demuestran una correlación negativa con la expresión de genes implicados en el proceso de termogénesis de los adipocitos.
- Los hallazgos expuestos sugieren que la capacidad de generación y activación de adipocitos beige a partir de las células mesenquimales de tejido adiposo en pacientes con DM2 se encuentra limitada funcionalmente, generando un entorno metabólico adverso.

Referencias

1. Labros Sidossis. Brown and beige fat in humans: thermogenic adipocytes that control energy and glucose homeostasis. *J Clin Invest*. 2015 Feb 2; 125(2): 478–486. Omar Al Ustwani. Clinical updates in adult acute lymphoblastic leukemia. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 99 (2016) 189–199.
2. Fenzl A. Brown adipose tissue and thermogenesis. *Horm Mol Biol Clin Investig*. 2014 Jul;19(1):25-37.
3. Weir G et al. Substantial Metabolic Activity of Human Brown Adipose Tissue during Warm Conditions and Cold-Induced Lipolysis of Local Triglycerides. *Cell Metab*. 2018 Jun 5;27(6):1348-1355.e4.
4. Tharp KM. Bioengineering Beige Adipose Tissue Therapeutics. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2015 Oct 20;6:164. Bruce D. Cheson. Revised Recommendations of the International Working Group for Diagnosis, Standardization of Response Criteria, Treatment Outcomes, and Reporting Standards for Therapeutic Trials in Acute Myeloid Leukemia. *Journal of Clinical Oncology*, Vol 21, No 24 (December 15), 2003: pp 4642-4649.
5. Rosenwald, M., et al., Bi-directional interconversion of brite and white adipocytes. *Nat Cell Biol*, 2013. 15(6): p. 659-667.
6. Orozco-Solis, R., et al., The Circadian Clock in the Ventromedial Hypothalamus Controls Cyclic Energy Expenditure. *Cell Metabolism*, 2016. 23(3): p. 467-478.
7. Shimizu Y. Increased expression of glucose transporter GLUT-4 in brown adipose tissue of fasted rats after cold exposure. *Am J Physiol*. 1993 Jun;264(6 Pt 1):E890.
8. Xinran Ma. et al. Deciphering the Roles of PPAR γ in Adipocytes via Dynamic Change of Transcription Complex. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2018; 9: 473.
9. Kalinovich AV et al. UCP1 in adipose tissues: two steps to full browning. *Biochimie*. 2017 Mar;134:127-137.
10. Barneda D. et al. The brown adipocyte protein CIDEA promotes lipid droplet fusion via a phosphatidic acid-binding amphipathic helix. *Elife*. 2015 Nov 26;4:e07485.