

Información Importante

La Universidad de La Sabana informa que el(los) autor(es) ha(n) autorizado a usuarios internos y externos de la institución a consultar el contenido de este documento a través del Catálogo en línea de la Biblioteca y el Repositorio Institucional en la página Web de la Biblioteca, así como en las redes de información del país y del exterior con las cuales tenga convenio la Universidad de La Sabana.

Se permite la consulta a los usuarios interesados en el contenido de este documento para todos los usos que tengan finalidad académica, nunca para usos comerciales, siempre y cuando mediante la correspondiente cita bibliográfica se le de crédito al documento y a su autor.

De conformidad con lo establecido en el artículo 30 de la Ley 23 de 1982 y el artículo 11 de la Decisión Andina 351 de 1993, La Universidad de La Sabana informa que los derechos sobre los documentos son propiedad de los autores y tienen sobre su obra, entre otros, los derechos morales a que hacen referencia los mencionados artículos.

BIBLIOTECA OCTAVIO ARIZMENDI POSADA
UNIVERSIDAD DE LA SABANA
Chía - Cundinamarca

**MODULACIÓN FUNCIONAL Y MOLECULAR DEL
PROCESO ADIPOGÉNICO A TRAVÉS DE LA PROTEÍNA
EID1**

DIANA VARGAS TRUJILLO

**UNIVERSIDAD DE LA SABANA
PROGRAMA DOCTORADO EN BIOCENCIAS**

CHÍA, 9 DE DICIEMBRE DE 2013

**MODULACIÓN FUNCIONAL Y MOLECULAR DEL
PROCESO ADIPOGÉNICO A TRAVÉS DE LA PROTEÍNA
EID1**

DIANA VARGAS TRUJILLO

Trabajo presentado como requisito para optar el título de doctor en Biociencias

Director

Dr. FERNANDO LIZCANO LOSADA MD.PhD

**UNIVERSIDAD DE LA SABANA
PROGRAMA DOCTORADO EN BIOCENCIAS**

CHÍA, 9 DE DICIEMBRE DE 2013

NOTA DE ACEPTACION

FIRMA DEL JURADO

FIRMA DEL JURADO

FIRMA DEL JURADO

CHÍA, 9 DE DICIEMBRE DE 2013

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer al Dr Fernando Lizcano por darme la oportunidad de trabajar todos estos años en su laboratorio y por dejarme aprender de su amplia experiencia y entrega a la investigación.

A la Dra Carmenza Duque por su gran apoyo, diligencia y sus palabras de aliento en este camino.

Infinitas gracias a la Dra Leonor Botero por su orientación incondicional y por hacerme ver en medio de lo que para mi era una dificultad, las grandes oportunidades.

A la Dra Gloria Gonzalez por todo su esfuerzo y entrega en los inicios de este programa y por su apoyo.

Agradezco a la Dra Helena Groot y los miembros del Laboratorio de Genética Humana de La Universidad de los Andes por permitirme compartir su espacio, por su cálida acogida porque me hicieron sentir como un miembro del grupo.

Al Dr Noriyuki Koibuchi y los integrantes del grupo de fisiología Molecular de la Universidad de Gunma, por permitirme vivir esta gran experiencia académica y de crecimiento personal.

A los miembros de la comisión de doctorado (Dr Camilo Ososio, Dra Elizabeth Cabra, Dra Adriana Roldán, Dr Luis Eduardo Diaz) por su respaldo y ayuda a lo largo de mis estudios.

A los Doctores Virgilio Salgado, Patricia Cortés, Hernando Torres y Adriana Parra por su colaboración en la toma de las muestras de tejido.

Hago extensiva mi gratitud a mis compañeros Catalina Aguilar y Hernando Curtidor, por los momentos compartidos, por su ánimo y bonita forma de ser. Igualmente a mis compañeros del grupo de investigación CIBUS, Genética humana de la Universidad de La Sabana y grupo de investigación GIPA.

Por último y siendo para mi lo más importante, agradezco a mi Buen DIOS, a mi familia y a mi esposo pues su soporte me fortaleció sus palabras me levantaron y este logro lo debo a ustedes.

LISTA DE ABREVIATURAS

ADMSCs:	Adipose mesenchymal stem cells
aP2/FABP4:	Fatty Acid Binding Protein 4
C/EBPs:	CCAAT/enhancer-binding proteins
DBD:	DNA binding domain
DNA:	Deoxyribonucleic acid
EID1:	E1A-like inhibitor of differentiation
ER	Estrogen receptor
FAS	Fatty acid synthase
FDG-PET:	Fluorodeoxyglucose positron emission tomography
GRIP1:	Glucocorticoid receptor interacting protein-1
HSL:	Hormone-sensitive lipase
IBMX:	3-isobutil-1-metilxantina
IGF1:	Insulin-like growth factor 1
IL-1:	Interleukin
IMC:	Indice de masa corporal
LBD:	Ligand binding domain
LDL:	Lipoprotein lipase
MCP-1:	Monocyte chemoattractant protein-1
MEFs:	Mouse embrionic fibroblast
Myf 5:	Myogénic factor 5
MyoD:	Myogenic differentiation 1

NRF1:	Nuclear respiratory factor 1
p300:	Early region 1A (E1A) associated 300 kDa binding protein
PEPCK:	Phosphoenolpyruvate carboxykinase
PGC-1 α :	Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1 alpha
PPREs:	PPAR γ response elements
pRb:	Retinoblastoma protein
PRDM16:	PRD1-BF1-RIZ1 homologous domain containing 16
PRIP:	Peroxisome proliferator-activated receptor interacting protein
PRLR:	Prolactin receptor
RAR:	Retinoic acid receptor
RNA:	Ribonucleic acid
RXR:	Retinoid X receptor
SHP:	orphan nuclear receptor
SPPARMs:	Synthetic selective PPAR γ modulator
TFAM:	Transcription factor A mitochondrial
TMEM26:	Transmembrane protein 26
TNF α :	Tumor necrosis factor
TR:	Thyroid receptor
UCP1:	Uncoupling protein 1
VEGF:	Vascular endothelial growth Factor
VLDLs:	Very low-density lipoproteins

LISTA DE FIGURAS

	Pág
CAPITULO 1	
Figura 1. El adipocito como órgano endocrino	18
Figura 2. Diferenciación de células adiposas	22
Figura 3. Papel dual de las células adiposas beige	26
CAPITULO 2	
Figura 1. Telmisartán y rosiglitazona inducen la activación transcripcional de PPAR γ y la diferenciación de células adiposas.	59
Figura 2. Telmisartán y rosiglitazona inducen la activación transcripcional de PPAR γ y la diferenciación de células adiposas.	61
Figura 3. Activación de PPAR γ en presencia de diferentes coactivadores tras el tratamiento con telmisartán y rosiglitazona	63
Figura 4. Evaluación de la interacción del coactivador SRC1 con PPAR γ en presencia de telmisartán o rosiglitazona.	66
CAPITULO 3	
Figura 1. Evaluación de la interacción del coactivador SRC1 con PPAR γ en presencia de telmisartán o rosiglitazona.	85
Figura 2. La sobre-expresión de EID1 reduce la diferenciación adipogénica	88
Figura 3. Bloqueo de EID1 mediante RNA de interferencia	90
Figura 4. EID1 se une a pRb, reduce sus niveles de expresión y a su vez activa proteínas termogénicas como PGC1 y UCP1 en las células 3T3-L1	92
CAPITULO 4	
Figura 1. EID1 reduce la transactivación de PPAR γ y modula la actividad de coactivadores	113
Figura 2. La sobre-expresión de EID1 reduce la acumulación	

	de lípidos en ADMSCs	116
	Figura 3. EID1 reduce la expresión de pRb e incrementa los niveles de proteínas termogénica en ADMSC	118
	Figura 4. El bloqueo de EID1 mediante siRNA reduce la expresión de proteínas termogénicas	121
ANEXO 1	Figura 1. Obtención del ADN genómico de ratón a partir de tejido distal de la cola	140
	Figura 2. Ligación de cada uno de los segmentos que hacen parte del transgén	141
	Figura 3. Expresión de EID1 por estimulación del promotor del gen aP2 en adipocitos maduros 3T3-L1	141

TABLA DE CONTENIDO

	Pág
RESUMEN	1
CAPITULO 1 1. INTRODUCCIÓN, MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE	
ARTE	4
1.1 INTRODUCCIÓN	5
1.2 MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE	11
1.2.1 Causas de la obesidad	11
1.2.2 Prevalencia de la Obesidad	12
1.2.3 Blancos y tratamientos para la obesidad	13
1.3 CARACTERÍSTICAS Y DESARROLLO DEL TEJIDO ADIPOSO BLANCO	15
1.3.1 Tejido adiposo y sus funciones	16
1.3.2 Regulación transcripcional de los adipocitos blancos	20
1.4 TEJIDO ADIPOSO PARDO	23
1.4.1 Activación de tejido adiposo pardo y beige	24
1.4.2 Regulación transcripcional en adipocitos pardos	27
1.5 pRB Y ADIPOGÉNESIS	29
1.6 EID1	31
1.7 MODELOS DE ESTUDIO DE ADIPOGENESIS	33
1.7.1 Línea celular 3T3-L1	33
1.7.2 Células madre mesenquimales derivadas del tejido adiposo	34
1.8 BIBLIOGRAFÍA	36

CAPITULO 2	2. EL AGONISMO DIFERENCIAL DEL RECEPTOR	
	NUCLEAR PPARγ GENERA LA INCORPORACIÓN DE	
	DISTINTOS COACTIVADORES	49
	2.1 RESUMEN	50
	2.2 INTRODUCCIÓN	41
	2.3 METODOLOGÍA	53
	2.3.1 Plásmidos	53
	2.3.2 Transfecciones transitorias y doble híbrido	53
	2.3.3 Ensayo de diferenciación de células adiposas	54
	2.3.4 Análisis de Western Blot.	55
	2.3.5 Análisis estadístico	56
	2.4 RESULTADOS	57
	2.5 DISCUSIÓN	67
	2.6 BIBLIOGRAFÍA	69
CAPITULO 3	3. EID1 INDUCE CARACTERÍSTICAS DE ADIPOCITOS	
	“BROWN LIKE” EN PREADIPOCITOS 3T3-L1	74
	3.1 RESUMEN	75
	3.2 INTRODUCCIÓN	76
	3.3 METODOLOGÍA	79
	3.3.1 Plásmidos	79
	3.3.2 Transfecciones transitorias	79
	3.3.4 Ensayos de diferenciación adipogénica y	
	cuantificación de triglicéridos	80
	3.3.5 Análisis de western blot	81
	3.3.6 RNA de interferencia	82
	3.4 RESULTADOS	84
	3.4.1 EID1 disminuye la transactivación mediada por	
	PPAR γ	84

3.4.2 Función de EID1 en la diferenciación de los pre-adipocitos 3T3-L1	87
3.4.3 EID1 se une a pRb y disminuye su expresión durante la diferenciación adipogénica	91
3.4.4 EID1 induce precursores de grasa parda en pre-adipocitos blancos.	94
3.5 DISCUSIÓN	95
3.6 BIBLIOGRAFÍA	98

CAPITULO 4 4. EID1 ESTIMULA EL FENOTIPO ADIPOCÍTICO BEIGE EN ADMSCs OBTENIDAS DE TEJIDO HUMANO	102
4.1 RESUMEN	103
4.2 INTRODUCCIÓN	104
4.3 METODOLOGÍA	106
4.3.1 Muestras de tejido adiposo	106
4.3.2 Plásmidos y transfecciones transitorias	106
4.3.3 Cultivos celulares	107
4.3.4 Diferenciación y cuantificación de triglicéridos	108
4.3.5 RNA de interferencia	109
4.3.6 Análisis de western blot	110
4.3.7 Citometría de flujo	111
4.4 RESULTADOS	112
4.4.1 EID1 disminuye la transactivación de PPAR γ a través de coactivadores	112
4.4.2 La sobre-expresión de EID1 modula la diferenciación adipogénica de las ADMSCs	115
4.4.3 EID1 induce características de células “brown-like” en las ADMSC.	117
4.5 DISCUSIÓN	122

	4.6 BIBLIOGRAFÍA	125
	5. CONCLUSIONES	130
	6. PERSPECTIVAS	132
	7. PRODUCCIÓN CIENTÍFICA	134
	7.1 Publicaciones científicas	134
	7.2 Participaciones en congresos	134
ANEXO 1	GENERACIÓN DEL TRANSGEN DE EID1 (Ap2- EID1) PARA DESARROLLO Y EVALUACIÓN FUTURA DE UN RATÓN TRANSGÉNICO DE EID1	135
ANEXO 2	SOPORTES PRODUCCIÓN CIENTÍFICA	143

RESUMEN

El tejido adiposo cumple un papel clave como regulador del metabolismo energético y el exceso de energía acumulada en el adipocito, aumenta el riesgo de padecer obesidad y enfermedades metabólicas asociadas. El estudio de los mecanismos moleculares que involucra la adquisición del fenotipo adipocítico son de gran importancia para poder generar enfoques terapéuticos para combatir la obesidad. Este estudio doctoral provee nuevo conocimiento acerca de la modulación funcional del tejido adiposo y los mecanismos moleculares que podrían activar el gasto calórico y la termogénesis en el adipocito blanco.

Dentro del grupo de factores más destacados en las características del adipocito se encuentra el receptor PPAR γ . Este receptor junto a sus coreguladores de activación transcripcional, son un punto importante de investigación para el desarrollo de terapias para la diabetes tipo 2 y la obesidad. Por tanto el presente trabajo en el capítulo 1 describe la importancia de algunos enfoques terapéuticos para el tratamiento de la obesidad, realizando énfasis en el conocimiento actual de la fisiología del adipocito blanco, pardo y beige y los factores que podrían regular su fenotipo a nivel molecular. El capítulo 2 muestra como la activación selectiva mediante un agonismo diferencial de PPAR γ es determinado por la unión diferencial de cofactores que median cambios conformacionales en presencia de ligandos, ello modula la adipogénesis de los preadipocitos 3T3-L1 y podría mitigar los efectos indeseables de una agonismo completo de PPAR γ .

A partir del capítulo 3 se profundiza en la descripción de una posible vía de activación del gasto calórico en el tejido adiposo blanco mediante la inducción de proteínas involucradas en la termogénesis del adipocito pardo. Uno de los factores capaces de activar esta función en el adipocito blanco es la proteína pRb, reconocida sobre todo por su acción como supresor de tumores, pero con un papel importante a nivel de diferenciación de los adipocitos. pRb puede unirse a factores de la transcripción específicos y modular también la diferenciación miogénica, osteogénica

o adipogénica. A nivel de adipogénesis la inactivación de pRb produce resistencia a la obesidad por un aumento de la actividad de proteínas termogénicas en modelos murinos y en células mesenquimales. Por ello una alternativa plausible sería hallar factores que modulen la actividad de pRb en el adipocito blanco, este es el caso de la proteína EID1, la cual en estudios iniciales demostró un efecto regulador negativo de pRb en células mioblásticas, ello condujo a la valoración funcional de EID1 en células adiposas y al estudio más profundo de sus efectos en la diferenciación celular. Por ello el capítulo 3 describe los hallazgos funcionales, moleculares y fenotípicos de la acción de EID1 en la adipogénesis de los preadipocitos 3T3-L1, encontrando que la sobre-expresión de EID1 disminuye la acumulación de lípidos y regula negativamente la expresión de pRb durante la diferenciación de células 3T3-L1. Además, EID1 aumenta la expresión de proteínas involucradas en la termogénesis como UCP1 y PGC-1 α . El avance en los interesantes hallazgos de la acción de EID1 en la adipogénesis condujo a profundizar en su función caracterizando la acción de esta proteína en células mesenquimales derivadas de tejido adiposo humano (subcutáneo), resultados descritos en el capítulo 4. Los datos señalan que la sobre-expresión de EID1 disminuye la acumulación de lípidos luego de inducir diferenciación adipogénica y activa proteínas como UCP1, PGC-1 α y TFAM, comprometidas en el gasto calórico lo cual es característico de células "brown-like" o beige. De hecho las células mesenquimales moduladas con EID1 expresan CD137, un marcador específico de adipocitos beige recientemente caracterizado.

Todos los datos reunidos en esta investigación muestran interesantes hallazgos en la fisiología y la actividad molecular dada la modificación de la adipogénesis tanto de adipocitos de ratón (3T3-L1) como en células madre adiposas mesenquimales aisladas a partir de muestras de grasa subcutánea humana. En ambos casos observamos un aumento en la expresión de proteínas involucradas en el gasto calórico, mediante la sobre-expresión de la proteína blanco de estudio EID1. Consideramos que la posible vía de acción que tiene más relevancia en la modulación de la diferenciación del adipocito comprende la regulación negativa de la proteína del

retinoblastoma. Estos interesantes datos no solo contribuyen a la generación de nuevo conocimiento para el tratamiento de enfermedades crónicas no transmisibles sino, que abren una perspectiva adicional en el campo de la investigación traslacional. Consideramos que la continuidad de este estudio, incluye la realización de una construcción genética (transgén) con un promotor específico de tejido adiposo unido al gen de EID1 con miras al futuro desarrollo de un ratón transgénico como modelo para la caracterización de esta molécula como blanco terapéutico para tratar la obesidad.

CAPITULO 1

INTRODUCCIÓN, MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE

1.1 INTRODUCCIÓN

El sobrepeso y la obesidad son un problema de salud pública, que afecta tanto a países desarrollados como en vías de desarrollo (1). Claramente, la principal causa de esta epidemia se relaciona con un incremento en la ingesta de alimentos ricos en calorías, acompañado de poca actividad física (2, 3). Este exceso energético es almacenado en el tejido adiposo en forma de lípidos (4). Basados en estos conceptos, resulta imprescindible conocer los mecanismos moleculares que rigen el destino de los adipocitos, es decir, que el entendimiento de la diferenciación de los adipocitos es fundamental para lograr generar planes terapéuticos (5). En consecuencia, los estudios realizados en esta investigación se abordaron a partir de dos enfoques, el primero conllevó al entendimiento de la diferenciación de los adipocitos blancos a partir de la modulación del receptor nuclear PPAR γ , y la injerencia de sus proteínas coreguladoras en la adquisición del fenotipo adipocítico maduro. Dado que PPAR γ captura proteínas coactivadoras en presencia de ligando, el uso de ligandos sintéticos, puede generar cambios conformacionales en la proteína que modifican su función y por ende son blanco de estudio para el tratamiento de la obesidad y enfermedades como diabetes tipo 2 (6, 7).

El segundo enfoque de esta investigación doctoral incluyó la caracterización de una vía capaz de modificar el fenotipo del adipocito blanco cuya acción está sujeta a la reserva de energía en forma de triglicéridos, por un adipocito capaz de gastar la energía acumulada mediante la producción de calor.

Bajo estos dos parámetros de estudio, los resultados de este trabajo se presentan a partir del capítulo 2, el cual considera el entendimiento de los mecanismos moleculares de la adipogénesis desde la modulación de PPAR γ , receptor nuclear que tiene una importante función como regulador transcripcional de múltiples genes involucrados en el metabolismo de lípidos y glucosa (8). PPAR γ es dependiente de ligandos para su activación y requiere de la asociación a cofactores que modulan la cromatina para iniciar la transcripción (9). Debido a que parte de la activación mediada por ligando depende del cofactor asociado a PPAR γ , se evaluó el efecto diferencial determinado por 2 ligandos sintéticos de PPAR γ (rosiglitazona y telmisartan) y su repercusión sobre la unión de diferentes cofactores y capacidad de modular tanto la expresión de genes específicos del adipocito como su efecto fenotípico a nivel de adipogénesis de preadipocitos 3T3-L1. Se encontró que células tratadas con telmisartan reducen la acumulación lípidos en comparación con rosiglitazona, estos hallazgos son debidos probablemente a una diferencia en cuanto al reclutamiento de coactivadores por parte de los agonistas estudiados. Así en estudios de transfecciones transitorias, la transactivación de PPAR γ es reducida tras el tratamiento con telmisartan comparado con rosiglitazona, efecto similar al observado en el estudio con los coactivadores SRC1, GRIP1, p300 y PRIP. Estos datos son también corroborados en estudios de interacción de proteínas a partir de doble híbrido donde PPAR γ tiene una afinidad significativa por el coactivador SRC1 en presencia de Rosiglitazona diferente a lo sucedido tras el tratamiento con telmisartán donde su unión no presenta valores significativos en la actividad de luciferasa. Estos

resultados finalmente muestran que los efectos moleculares de los diferentes agonistas estudiados sobre PPAR γ son traducidos en efectos fisiológicos ya reportados que muestran que si bien el efecto agonista total de PPAR γ , es beneficioso para la sensibilidad a la insulina por reducir los niveles de ácidos grasos libres en plasma e hígado, genera también efectos no deseados como el incremento de peso, retención de líquidos entre otros. Por tanto la activación parcial de PPAR γ podría mantener los efectos positivos sobre el metabolismo, eliminando los efectos deletéreos del agonismo total (7).

Continuando con la descripción del segundo enfoque de este estudio, que en un paso posterior se acoge a los conceptos que describe los mecanismos de regulación del gasto calórico y la termogénesis, los cuales son estudiados desde hace algunos años en el tejido adiposo pardo (10). Los adipocitos pardos tienen como función importante la generación de calor y la adaptación térmica. Si estos efectos fisiológicos pudiesen ser introducidos en el adipocito blanco, cuya función está sujeta a la reserva de energía en forma de triglicéridos, se podría plantear un plan terapéutico para la obesidad (11, 12). Bajo estos aspectos, si finalmente el problema de la obesidad está sujeto a una indebida acumulación de energía en el adipocito, un posible enfoque farmacológico sería aumentar la eficiencia en el gasto energético de estas células a través de la activación de la termogénesis (13-15).

Un estudio reciente mostró la presencia de un tejido adiposo con capacidad termogénica distinto del clásico adipocito pardo el cual fue denominado como adipocito beige/brown-like (similar al pardo), que actúa como adipocito blanco,

almacenando energía, pero al ser estimulado con frío u otras moléculas, puede activar un programa termogénico similar al llevado a cabo por los adipocitos pardos (16-18). El hecho que estos tejidos disipen los triglicéridos mediante la activación de la termogénesis ofrece una estrategia potencial para combatir la obesidad. Uno de estos factores capaces de activar el consumo calórico en el adipocito es la modulación de la función pRb (19). Esta proteína además de poseer una importante función como regulador del ciclo celular, a nivel adipogénico ha demostrado ser importante en la determinación de las células progenitoras en la diferenciación hacia célula grasa blanca o célula brown-like. La inactivación de pRb en células embrionarias de ratón y en modelos murinos sometidos a dieta alta en calorías, generó tanto activación de proteínas termogénicas como resistencia a la obesidad (20, 21). La función de pRb estaría más encaminada hacia una estimulación de la diferenciación de la adipogénesis hacia el adipocito blanco. La mayor actividad de pRb desempeña un papel como regulador negativo de genes que codifican para proteínas termogénicas como PGC-1 α y posteriormente UCP1, debido a su unión y represión de dos regiones del promotor de PGC-1 α . Adicionalmente, en experimentos con adipocitos blancos pRb^{-/-} se observó mayor expresión de proteínas involucradas en el gasto calórico como UCP1 y PGC-1 α (22). La búsqueda de nuevas proteínas que se unan a pRb y reduzcan su función fue una estrategia para identificar nuevos blancos en diferenciación celular y permitió el aislamiento de EID1. La descripción inicial de EID1 fue realizada en dos estudios paralelos que reportaron mediante el uso de la técnica de doble- híbrido en levadura y con librerías de cerebro y tejido cardiaco

humanos (23, 24), la unión de EID1 a pRb. En dichos estudios, reportaron una marcada expresión de EID1 en célula muscular y además una inhibición recíproca entre las dos proteínas (23). Basados en estas observaciones iniciales se iniciamos los estudios para verificar si EID1 podría tener un papel funcional en el proceso de diferenciación de la célula grasa. Teniendo en cuenta que la diferenciación de la célula muscular depende del factor de la transcripción MyoD en forma paralela como el proceso en la adipogénesis es regulado en gran parte por PPAR γ , y que tanto en el músculo como en el adipocito, pRb podría tener un papel regulador de la diferenciación, planteamos el análisis de esta molécula en la célula adiposa. En este proceso de investigación se trazó un plan de estudios para desarrollar en 3 etapas. La primera etapa, descrita en el capítulo 3, se inicia con la valoración funcional de EID1 en los preadipocitos originados de células de ratón 3T3-L1 que son de linaje blanco. Observamos que EID1 se expresa efectivamente en estas células y su expresión se va reduciendo progresivamente durante el proceso de diferenciación de las células 3T3-L1. Cuando se realizaron los experimentos de aumento de la expresión de EID1, los niveles de pRb se disminuyeron en forma significativa y la acumulación de lípidos se redujo progresivamente durante el proceso de diferenciación. Igualmente EID1 es capaz de activar proteínas involucradas en la termogénesis en las células 3T3-L1.

En concordancia con estos datos, se procedió al avance en la caracterización de EID1 en una segunda etapa, descrita en el capítulo 4, para ello se utilizó un modelo de ADMSCs que se aislaron a partir de tejido adiposo subcutáneo de mujeres sometidas a cirugía abdominal. En estas células se encontró que también EID1 se expresaba en

forma similar a lo observado en la línea celular 3T3-L1. Al sobre expresar EID1 y posteriormente inducir la diferenciación hacia adipocitos de estas células progenitoras, las células disminuyeron la acumulación de lípidos comparada con los controles, además observamos una mayor expresión de proteínas termogénicas como PGC-1 α , UCP1 y la proteína TFAM.

Por último, en lo que respecta a EID1 como moduladora de la adipogénesis por su capacidad de inducir proteínas características de adipocitos brown-like, se planteó el diseño de una construcción genética (transgen) que permita en breve el estudio de EID1 en un modelo murino. Para ello se tomó el promotor del gen aP2 aislado del DNA genómico de ratón, y se unió al gen de EID1, con el fin de que el estímulo del promotor en el tejido adiposo genere la expresión de EID1 exclusivamente en este tejido. Posteriormente, se evaluó el constructo en células adiposas maduras 3T3-L1, encontrando que efectivamente EID1 es expresado cuando se estimula el promotor aP2.

En conclusión, la diferenciación adipocítica es una respuesta adaptativa al exceso nutricional que en la actualidad genera como consecuencia alteraciones metabólicas por la obesidad. Esta investigación doctoral explora por un lado una vía de modulación de la adipogénesis por diferentes agonistas de PPAR γ y por otro, la posibilidad de modificar el fenotipo adipocítico blanco, generando activación de proteínas involucradas en el gasto calórico y termogénesis a través de EID1, un interesante enfoque farmacéutico para el tratamiento de este tipo de enfermedad crónica no transmisible.

1.2 MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE

1.2.1 Causas de la obesidad

La obesidad es una enfermedad multifactorial y compleja que se desarrolla por la interacción del genotipo con el medio ambiente (25, 26). El conocimiento sobre cómo y porqué se produce esta alteración es aún incierto, pero está claro que el problema tiene su raíz en factores sociales, culturales, fisiológicos metabólicos y genéticos (3). Varias causas monogénicas han sido descritas en el desarrollo de la obesidad, como por ejemplo mutaciones en la leptina o su receptor, en el receptor de melanocortina 4 y pro-piomelanocortina liderando así una pronunciada hiperfagia (27, 28). No obstante, es indudable que los cambios en nuestro ambiente y estilo de vida, asociado a un desequilibrio de nutrientes, se traduce en un mayor almacenamiento de energía (29). A esto se suma un entorno obesogénico favoreciendo un comportamiento obesogénico ejemplarizado en el aumento del tamaño de las porciones, dieta rica en grasa y azúcar, mucho tiempo viendo televisión, video juegos o sentado frente al computador (29). Por otro lado un punto que ha llamado especial atención en el origen de la obesidad, es como el ambiente influye sobre la regulación de los genes. A lo largo de la historia, el hombre ha sobrevivido enfrentándose a la inclemencia del medio ambiente y la escasez de alimentos donde precisamente los genes han jugado un papel fundamental en la supervivencia, en sentido estos genes conocidos como “genes ahorradores de energía se han convertido en una desventaja metabólica, pues la menor actividad física y la ingestión de grandes cantidades de alimentos con alta densidad energética forman

parte de un mundo en la abundancia que no ha tenido suficiente tiempo para suprimir la expresión de genes relacionados a la supervivencia de un mundo con escasez de alimentos (26).

1.2.2 Prevalencia de la Obesidad

El alto impacto de la obesidad ha llegado a límites de pandemia a nivel mundial. Datos estadísticos estimaron que en el 2008 1.46 billones de adultos presentaban sobrepeso con un IMC (índice de masa corporal) $>25 \text{ Kg/m}^2$ y 502 millones eran obesos con un IMC $>30 \text{ Kg/m}^2$ (30), la tendencia manifiesta que la cifra aumentará 50% en los próximos 10 años. En Colombia no somos ajenos a esta problemática ya que el 34.6% de la población tiene sobre peso y el 16.5% es obesa, cifras que aumentaron 2 y 3 puntos respecto a los últimos reportes en el 2005 (Encuesta nacional de la situación nutricional en Colombia 2010). Aunque la obesidad no es una enfermedad per se, es el mayor factor de riesgo de adquirir diabetes tipo 2, enfermedades cardiovasculares y ciertos tipos de cáncer (25, 31, 32). En concordancia con el incremento en la prevalencia de obesidad, la diabetes por ejemplo, según cifras publicadas por la Federación Internacional de Diabetes está afectando a 371 millones de personas en todo el mundo. En Colombia, la prevalencia comparativa de diabetes mellitus tipo 2 se estima que se encuentra alrededor del 7.26% de la población, lo que se traduce en 2.070.000 personas de los cuales casi 950.000 de los afectados desconocen la presencia de enfermedad. La FID Federación Internacional de Diabetes) predice que en 2030, 435 millones de personas presentarán

diabetes con un aumento superior al 60% en los países latinoamericanos. Todos estos datos son alarmantes, afectan la economía mundial y generan retraso en el desarrollo de la población.

1.2.3 Blancos y tratamientos para la obesidad

De acuerdo con las guías publicadas por el instituto nacional de salud de los Estados Unidos, las estrategias más exitosas para reducir peso en personas obesas, incluye la disminución de ingesta calórica, el aumento de la actividad física y el apoyo psicológico para mejorar el comportamiento alimentario y los hábitos de actividad física. Sin embargo cuando los pacientes utilizan esta terapia se ha encontrado recidivas con bastante frecuencia, incluso luego de 5 años de tratamiento, menos del 10% de los pacientes han mantenido el descenso de peso (33). Otra de las alternativas es la cirugía, indicada para pacientes con un IMC (peso kg/estatura mts²) mayor a 40 ó 35 si presenta comorbilidad. No obstante, este procedimiento requiere supervisión médica de por vida luego de realizado y no está exento de efectos secundarios (34, 35). Por otro lado, existen en el mercado fármacos que han sido desarrollados para tratar la obesidad pero han sido retirados por sus efectos secundarios (36). Algunos de ellos como las que reducen la absorción de lípidos, pero con efectos indeseables a nivel intestinal y baja efectividad (36). Otros fármacos que tienen efecto anorexígeno inducen aumento de la presión arterial y alteraciones de otros neurotransmisores. Incluso alguno de ellos fue retirado del mercado por la propensión a ideaciones suicidas (37).

En el 2012 fue aprobado por la FDA un medicamento que activa el receptor de Serotonina 2C en el cerebro lo cual incrementa la saciedad, no obstante debe estar acompañado de actividad física y reducción en el consumo de calorías. Adicionalmente sus efectos secundarios encierran dolor de cabeza, fatiga, nauseas, resequedad en la boca, mareos y estreñimiento (37).

Un interesante blanco terapéutico que en los últimos años ha llamado la atención de los investigadores es la activación de la termogénesis a partir del tejido adiposo pardo en adultos (13, 38-40). Esta teoría surgió gracias a unos estudios que reportaron la capacidad de activación de grasa parda en pacientes sometidos a frío y posteriormente analizados con tomografía de emisión de positrones, además las biopsias de tejido detectaron presencia de proteínas como UCP1 que permite la producción de calor por desacoplar la cadena transportadora de electrones evitando la producción de ATP, lo que genera producción de calor (41, 42). La vía que activa esta cascada, involucra la activación del sistema nervioso simpático por disminución en la temperatura, lo cual permite la liberación de norepinefrina que se asocia a los receptores β -adrenérgicos de los adipocitos pardos para activar el programa termogénico (39, 43). Así, los mecanismos de regulación de la termogénesis en grasa parda son mejor entendidos hoy en día, incluso existen varias hipótesis para estimular la acción de este tejido energéticamente más activo. De hecho, moléculas sintéticas capaces de activar el sistema nervioso simpático han mostrado activación de adipocitos pardos (44). No obstante estas moléculas no son tejido específicas por tanto han sido catalogadas como inseguras para la salud humana por incrementar el riesgo de enfermedad

cardiovascular (45). Por otra parte, han surgido antagonistas que son potentes activadores de la termogénesis en ratones pero que en humanos ha tenido poco éxito posiblemente por la diferente expresión de los receptores β_3 entre especies (46). Todas estas razones fortalecen la profundización en el estudio de mecanismos que le permitan al adipocito gastar la energía acumulada y en las vías que regulan la termogénesis en el adulto.

1.3 CARACTERÍSTICAS Y DESARROLLO DEL TEJIDO ADIPOSO BLANCO

Este tejido adiposo se encuentra distribuido de manera abundante en todo el cuerpo gracias a su capacidad de expandirse masivamente, se habla que adultos humanos de constitución delgada poseen de 3 a 4.5kg de este tejido y en individuos con obesidad severa la cantidad puede aumentar hasta 45 kg o más del peso total del cuerpo (47). Los adipocitos, células que componen el tejido se caracterizan por ser uniloculares, es decir, poseen una gota de grasa en el citoplasma que desplaza el núcleo a un lado de la célula. Dado el tamaño de los adipocitos maduros, las observaciones histológicas inducían a pensar que estas células eran prácticamente las únicas existentes en este tejido, o al menos las más abundantes, sin embargo, actualmente se sabe que los adipocitos están rodeados por fibroblastos, células endoteliales, macrófagos, células madre, neutrófilos y linfocitos, incluso la proporción de los diferentes tipos celulares puede variar según la situación fisiológica (inflamación) y la localización (48). En cuanto al desarrollo del tejido adiposo durante el proceso embrionario, se considera

que el segundo trimestre es un periodo crítico para la generación del tejido y la adipogénesis en la zona abdominal ocurre a las 14.5 semanas (49). Gran parte del desarrollo del tejido adiposo finaliza luego del nacimiento, sin embargo su expansión se determina a lo largo de la vida (12). En este sentido, se comprobó que la cifra de adipocitos constituye la abundancia de grasa en el adulto, en concordancia, el número de estas células se establece durante la niñez y adolescencia y se mantiene constante en la adultez, incluso después de una pérdida de peso (50). Con esto se concluye que la expansión del tejido adiposo está relacionado principalmente con el aumento en el tamaño de los adipocitos blancos y que los individuos obesos tienen un mayor número de adipocitos ya desde la infancia (50). En cuanto al origen embrionario los adipocitos derivan de la placa lateral del mesodermo, provenientes de células madre que son negativas para la proteína Myf5 (51). Así, es ampliamente reportado que las ADMSCs residen en la región vascular que envuelve el tejido adiposo, localizadas en los vasos sanguíneos que irrigan el tejido, de allí que el estímulo nutricional lidere la diferenciación de estas células hacia adipocitos maduros (52).

1.3.1 Tejido adiposo y sus funciones

A pesar que el exceso de adiposidad predispone a complicaciones metabólicas, el tejido adiposo cumple funciones esenciales en el organismo. Este tejido, es el principal reservorio energético del organismo, además de atribuírsele la función de aislamiento y protección mecánica para algunos órganos vitales. Los adipocitos maduros muestran el perfil de expresión requerido para la síntesis de triacilgliceroles, captación de glucosa y lipogénesis, así como de lipólisis. Este fenotipo permite que

cuando el aporte de energía al organismo es excesivo y/o el gasto energético disminuye, el exceso de energía se deposita en los adipocitos en forma de triacilgliceroles. Por otro lado, frente a una situación de escasez de ingesta energética y/o incremento del gasto energético el adipocito moviliza los depósitos de lípidos liberando ácidos grasos y glicerol que a través de la sangre son transportados a los tejidos, donde serán oxidados para obtener energía (53). Tradicionalmente el tejido adiposo ha sido considerado poco activo, sin embargo, en la última década se ha puesto de manifiesto su papel altamente dinámico sintetizando y secretando factores lipídicos y proteicos, que intervienen en la regulación de un amplio rango de procesos fisiológicos y metabólicos. Por tanto el adipocito cumple funciones endocrinas, paracrinas y autocrinas (54).

Las moléculas secretadas por los adipocitos blancos incluye se encuentra como TNF α , IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, IL-4, IL-13 y MCP-1, dichas sustancias están relacionadas con el sistema inmunitario, de hecho desde hace décadas se incluyó un nexo entre la inflamación y obesidad, pero solo hasta hace pocos años se estableció una vinculación fisiopatológica que demostró que el exceso de tejido adiposo desencadena una situación de inflamación crónica debido a un aumento en la secreción de adipocitoquinas pro-inflamatorias (54, 55).

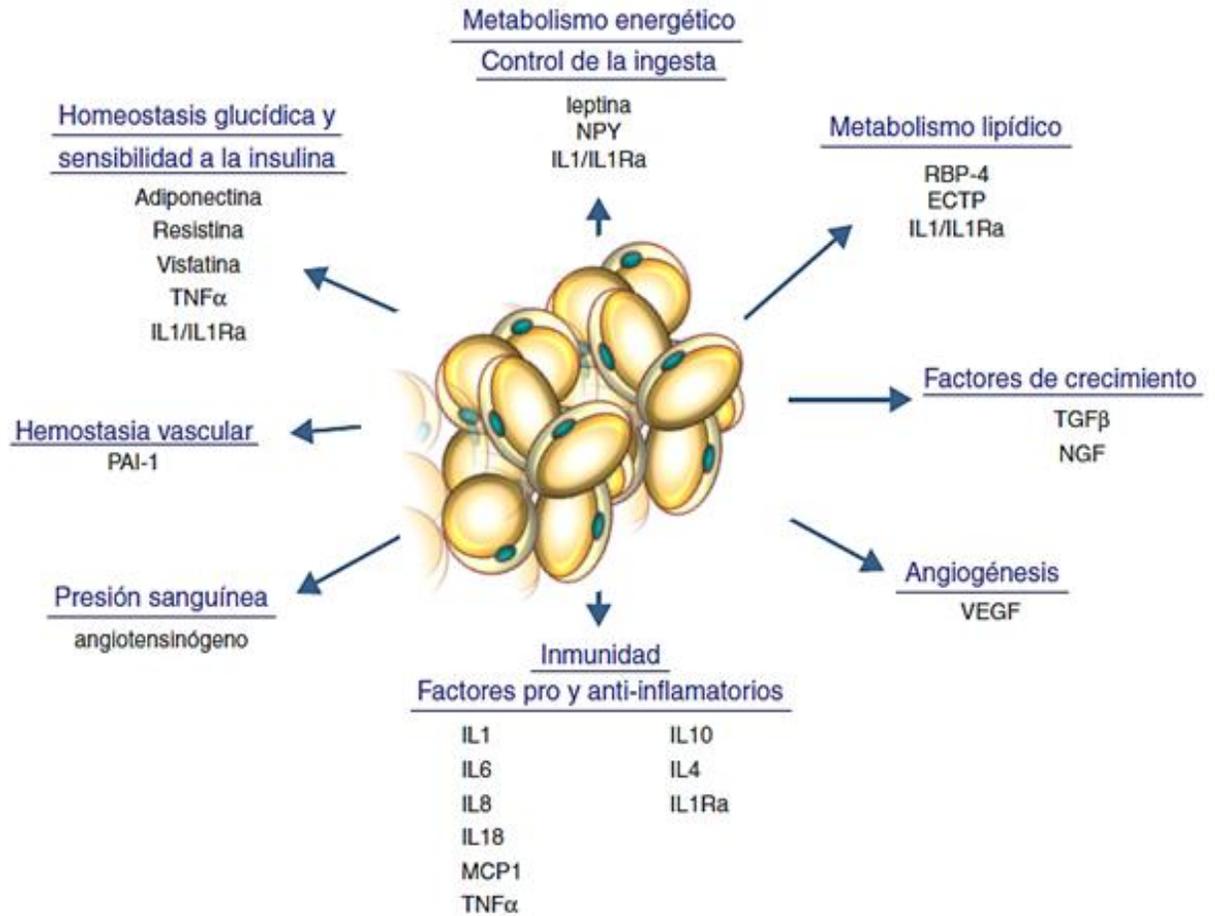


Figura 1. El adipocito como órgano endocrino. Procesos fisiológicos y metabólicos regulados por las proteínas que secreta el adipocito las cuales tienen injerencia en el metabolismo energético, metabolismo de lípidos, hemostasia vascular, presión sanguínea, angiogénesis y sistema inmunológico. Adaptado de Gesta S, et al. Cell. 2007;131:242-256

Otras moléculas comprometidas por el adipocito son las que intervienen en la regulación de la ingesta y del balance energético como la leptina, en la regulación de la presión sanguínea como el angiotensinógeno, en el incremento de la oxidación de grasa y la sensibilidad a la insulina como la adiponectina, en la homeostasis de glucosa como la resistina y la visfatina, en la angiogénesis como VEGF, algunas como adiposina, LPL y HSL que interviene en el metabolismo lipídico, incluso el adipocito secreta algunos factores de crecimiento dentro de los que se destaca IGF1 (4, 54). Todo este conjunto, llevan a involucrar al adipocito con la función de otros órganos, por tal motivo el desarrollo de obesidad genera alteración en la producción de estas adipocitoquinas lo que finalmente se traduce en enfermedad cardiovascular, aterosclerosis, diabetes tipo 2 y cáncer (56, 57).

Otro hecho que ha llamado la atención, es lo que corresponde con la distribución de la grasa en el organismo. En humanos, el tejido adiposo blanco se encuentra disperso en todo el organismo. A nivel intra-abdominal encontramos los mayores depósitos alrededor del omento (omental), del intestino (mesentérico) y de las áreas peri-renales (retroperitoneal). A nivel subcutáneo la grasa se localiza sobre todo a nivel de las caderas, los muslos y el abdomen. Pero además de estos depósitos mayoritarios existen otras áreas en el organismo donde encontramos adipocitos blancos, distinguiendo depósitos a nivel pericardial, perivascular o periarterial, periarticular, retro-orbital, intramuscular, médula ósea y cara (51). Cabe señalar que los diferentes depósitos de grasa tiene características metabólicas distintas, dando lugar a diferencias fisiopatológicas entre individuos obesos a nivel de riesgo

cardiometabólico (58). De este modo, se ha sugerido que la expansión de depósitos de grasa visceral lidera la distribución de cantidades considerables de ácidos grasos libres no esterificados al hígado lo que contribuye a la síntesis de VLDLs, ricas en triglicéridos que posteriormente serán hidrolizadas por la LPL para generar LDL, lipoproteínas más pequeñas y densas que tienen alta susceptibilidad a la oxidación y poseen la habilidad de penetrar en la pared vascular, esta situación genera la liberación de sustancias proinflamatorias por los adipocitos intra-abdominales, que unido a la secreción reducida de proteínas como la adiponectina incrementa el riesgo de sufrir enfermedad cardiovascular y diabetes (59).

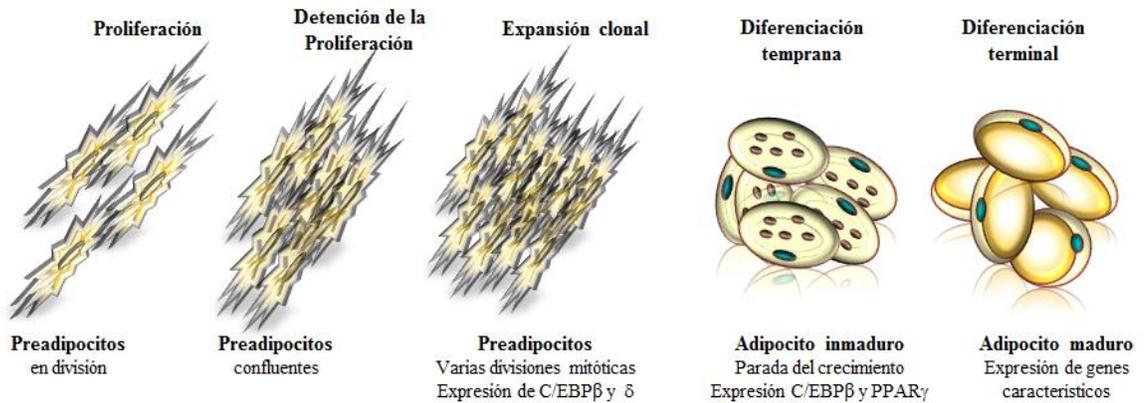
1.3.2 Regulación transcripcional de los adipocitos blancos

La adipogénesis es un proceso complejo que incluye dos pasos importantes: el primero la determinación de células madre hacia un linaje preadipocítico y la diferenciación terminal de los preadipocitos en adipocitos maduros, siendo esta última la mejor caracterizada. La coordinación de este proceso se encuentra bajo el control de importantes factores de la transcripción como PPAR γ 2 pues su sobreexpresión en fibroblastos es suficiente para inducir la diferenciación adipogénica y su silenciamiento induce pérdida del fenotipo adipocítico maduro (60-62). PPAR γ controla la expresión de varios genes necesarios en la fisiología del adipocito, como aP2/FABP4, LPL, FAS, PEPCCK (8). Todas ellas implicadas en la coordinación de la captación y almacenamiento de ácidos grasos. Adicionalmente una familia de factores de transcripción C/EBP en sus distintas isoformas, presenta una expresión secuencial

durante la diferenciación adipogénica siendo C/EBP α requerido para la adipogénesis junto con PPAR γ , pese a que este último es dominante en el proceso (9). A nivel estructural PPAR γ posee un dominio AF1 cuya función es independiente de ligando, el dominio DBD que reconoce el elemento de respuesta en el DNA y forma dímero con RXR y el dominio AF2 de asociación a ligando y activación transcripcional. Por tanto establecida la unión de PPAR γ con el ligando se producen cambios en su configuración que permiten la aglutinación de otros cofactores que en forma secuencial producen activación de la transcripción. Así la modulación de la cromatina es ejercida por proteínas con actividad acetilasa de histona como la familia p160 y CBP/p300 lo que disminuye su interacción con el DNA, con lo cual facilitan el acceso de la maquinaria de la transcripción (63-65). De este modo, PPAR γ controla la expresión de varios genes involucrados en la función de los adipocitos como transporte y metabolismo de lípidos, señalización de insulina y producción de adipocitoquinas (66). De hecho un mecanismo que relaciona a PPAR γ con la sensibilidad a la insulina es a través de la activación de la expresión de adiponectina, la cual es incrementada en los adipocitos tras la estimulación con ligandos sintéticos de PPAR γ , lo que a su vez reduce los niveles de resistina y TNF (67). En este punto toma gran importancia el papel de cada uno de estos coreguladores pues se ha observado que cada uno de ellos puede representar un “role” diferente, pues por un lado agonistas capaces de modular selectivamente a PPAR γ generan afinidad del receptor por ciertos coactivadores, lo que se traduce en una activación parcial que permitiría a nivel fisiológico conservar efectos benéficos a nivel de sensibilidad a la insulina, removiendo los efectos

deletéreos causados por el agonismo total (68, 69). Por otro lado estos coactivadores pueden determinar características específicas entre adipocitos blancos vs pardos como se mencionará más adelante.

A.



B.

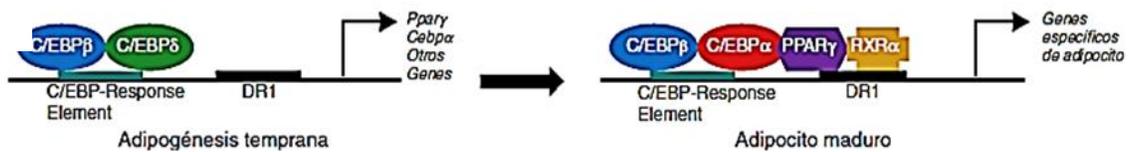


Figura 2. Diferenciación de células adiposas. A. Cambio fenotípico de preadipocito a adipocito maduro por efecto de expresión de proteínas que se expresan en diferenciación temprana como de C/EBP β y δ , estas moléculas conducen a la posterior activación de C/EBP β y PPAR γ para activar genes específicos del fenotipo adipocítico maduro. B. Modelo secuencial de activación transcripcional durante la adipogénesis. Adaptado de Esteve M. *Endocrinol Nutr.* En prensa

1.4 TEJIDO ADIPOSO PARDO

Este tejido fue descrito en principio en pequeños mamíferos e infantes, como un mecanismo de adaptación en respuesta al frío, por ello era conocido como un órgano de hibernación debido a su función de mantener la temperatura corporal en animales hibernantes (43). A nivel anatómico, los adipocitos pardos son multiloculares para facilitar la oxidación de los ácidos grasos, ricos en mitocondrias para hacer más eficiente la producción de calor y altamente vascularizado para una activación rápida del tejido (70). En cuanto a la vía que elicitla la producción de calor, está controlada por el sistema nervioso simpático y mediada por la activación de UCP1, de este modo, cuando el cerebro detecta una reducción en la temperatura, el sistema nervioso libera norepinefrina al tejido pardo que es detectada por los receptores β -adrenergicos e induce activación de proteínas G, proteínas quinasa A y HSL, para promover la oxidación de los ácidos grasos y glucosa en la mitocondria. En este organelo celular, los adipocitos pardos al activar UCP1, disipan el gradiente electroquímico de protones generado durante la respiración mitocondrial y la energía liberada se pierde en forma de calor (71).

En las últimas décadas, el tejido adiposo pardo a abierto un amplio campo de estudio ya que hasta hace poco su existencia en humanos adultos era controversial, hoy en día es reconocida su activación por exposición al frío de individuos delgados, mediante la obtención de biopsias se confirma la presencia de UCP1 y la morfología multivacuolar distintiva del tejido adiposo pardo (72). Se observa además que estas áreas se encuentran altamente inervadas por el sistema nervioso simpático, a

diferencia de las áreas de tejido adiposo blanco adyacentes. De la misma manera, su papel en el metabolismo energético resulta relevante, pues la actividad del tejido adiposo pardo está inversamente relacionada con el IMC y se encuentra reducida en adultos jóvenes con sobre-peso u obesos (42). Los resultados reportados mediante FDG-PET, indicaron que el tejido adiposo pardo se encuentra en el cuello, en la zona interescapular, paraventral y supraclavicular siendo este último el depósito más común (42, 72). Virtanen et al, encontraron que el frío induce unas 15 veces la absorción de glucosa captada en las zonas que activan adipocitos pardos en comparación con tejido adiposo blanco, que incrementa solo 4 veces la captación de glucosa por exposición al frío (42). Otro dato interesante de activación de tejido adiposo pardo, incluye a pacientes con feocromocitoma quienes tienden a incrementar los niveles de catecolaminas, activando adipocitos pardos en condiciones termoneutrales. Este efecto podría estar inversamente relacionado con la adiposidad central (73, 74).

1.4.1 Activación de tejido adiposo pardo y beige

Los adipocitos pardos son derivados del mesodermo, en la actualidad se distinguen dos tipos de adipocitos termogénicos, el clásico tejido ubicado en la región interescapular y el inducible que se encuentra inmerso entre el tejido adiposo blanco, además se ha encontrado que dos tipos de progenitores podrían estar involucrados en la adquisición del fenotipo pardo. El primero derivado del dermomioblasto central que expresa el factor Myf 5 característico de miocitos, con lo cual células musculares y adipocitos pardos podrían compartir el mismo origen (75). El segundo tipo de células

progenitoras está presente en el tejido adiposo blanco y músculo esquelético las cuales no expresan Myf5 pero muestran una alta expresión de UCP1 y son estimuladas por el sistema nervioso central como respuesta a prolongada exposición al frío (76). Estos adipocitos pardos no clásicos son reconocidos con diferentes nombres como “brite cells” y “beige cells”. Esta clase de células termogénicas pueden aparecer especialmente en tejido adiposo subcutáneo, que en estado basal son similares a los adipocitos blancos uniloculares y pueden almacenar triglicéridos, pero al ser estimuladas adquieren un fenotipo adipocítico pardo expresando UCP1 (18, 76). Es importante resaltar que mientras los adipocitos pardos clásicos han sido aislados, immortalizados y estudiados por años, hasta muy recientemente los adipocitos beige no habían sido aislados y clonados. Solo hasta mediados del 2012, a partir de cultivos primarios de muestras de tejido adiposo subcutáneo de ratón, fue obtenido un subgrupo celular con características similares al clásico tejido adiposo pardo que realmente mostró características beige, pues presentaron un bajo nivel de UCP1 pero respondieron positivamente ante la estimulación del programa termogénico a niveles similares que el clásico tejido pardo (18, 76). Estas células adiposas beige presentan un perfil específico de genes que no comparte con los adipocitos pardos ni blancos como el marcador de membrana CD137, CITED1 y TMEM26 (18, 77). Resultó sorprendente encontrar que biopsias de tejido interescapular humano presentaron perfil de adipocitos beige con expresión de CD137 y que a pesar de ser UCP1⁺ no fue detectada presencia de marcadores específicos del clásico adipocito pardo interescapular estudiado en ratón (18, 78).

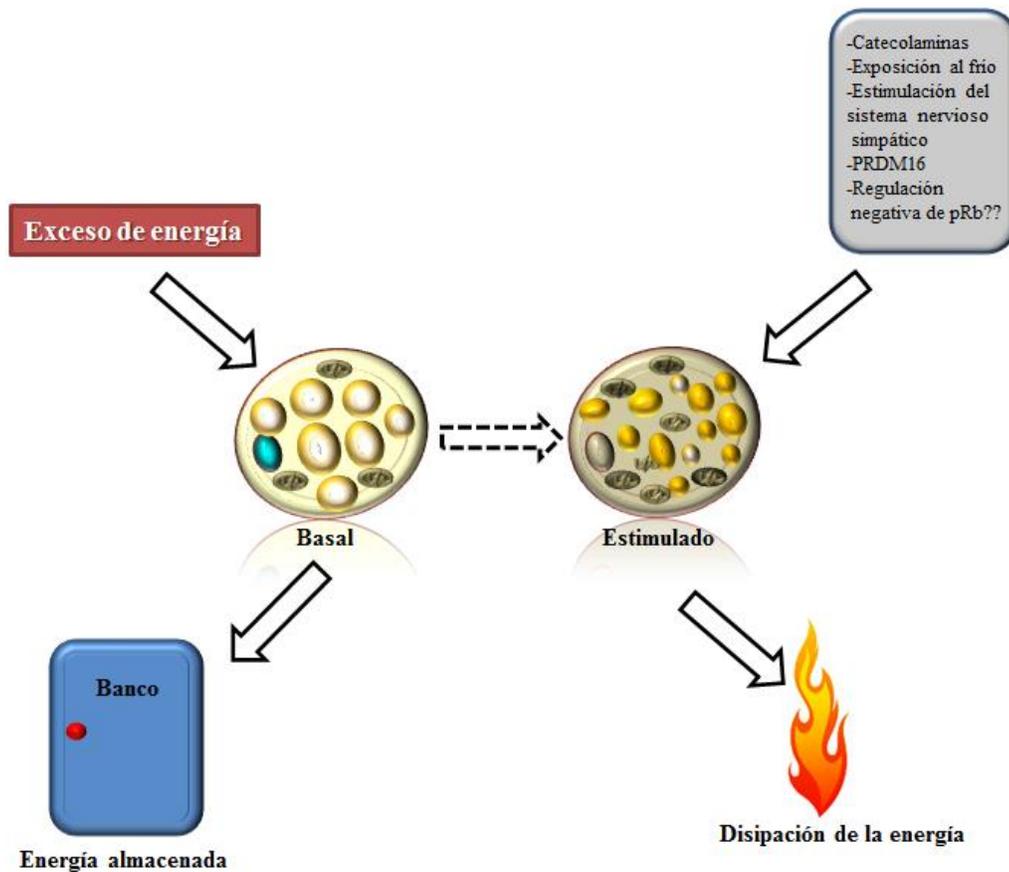


Figura 3. *Papel dual de las células adiposas beige. Las células beige expresan muy bajos niveles de UCPI, pero pueden activar el programa termogénico en respuesta a cAMP a niveles similares que las células adiposas pardas. El exceso de energía puede ser almacenado en forma de lípidos en los adipocitos beige, en estas condiciones su morfología es similar a la de los adipocitos blancos. Varias estímulos como las catecolaminas, exposición al frío, PRDM16 y posiblemente el bloqueo de pRb pueden activar adipocitos pardos e incrementar la disipación de la energía. Adaptado de Wu J, et al. Genes Dev.2013;27:234-250*

1.4.2 Regulación transcripcional en adipocitos pardos

Entre los adipocitos blancos y pardos existen marcadas diferencias fisiológicas, sin embargo ambos tipos de grasa tienen componentes moleculares comunes como PPAR γ y C/EBPs, estas son proteínas reguladoras de los genes que codifican para las funciones comunes de los dos tipos de adipocitos, estas incluyen el metabolismo de lípidos y glucosa, biogénesis mitocondrial y la producción de citoquinas (79). Sin embargo, un número de coreguladores parece jugar un papel importante en las características de cada fenotipo. Por ejemplo, p300/CBP acetila el nucleosoma para permitir el acceso de la maquinaria transcripcional, además se ha visto que ambas proteínas son indispensables para la diferenciación de preadipocitos 3T3-L1 (80, 81). No obstante ratones CBP $^{+/-}$ presentan acumulación reducida de triglicéridos pero no fenotipo característico de grasa parda, lo cual indica un importante papel en el fenotipo adipocítico blanco (82). Mientras que el papel de p300 en ratones $^{-/-}$ o $^{+/-}$ no ha sido vislumbrado por el efecto letal durante el desarrollo embrionario (83).

Otro de los coreguladores involucrados en la diferenciación de los adipocitos incluye a SRC1 el papel metabólico de esta familia de proteínas proviene de estudios que demuestran que SRC1 promueve el gasto calórico vía oxidación de ácidos grasos en grasa parda, mientras que SRC2 reprime este proceso por incrementar la acumulación de triglicéridos y activar a PPAR γ en grasa blanca (84).

Las bases moleculares de un programa adipogénico específico para grasa parda fue desconocido hasta la identificación de PGC-1 α , cuya expresión es activada mediante

la vía PKA-CREB, corriente debajo de la unión de catecolaminas al receptor b-adrenérgico en los adipocitos pardos (85). Esta proteína es reguladora de la biogénesis mitocondrial y el metabolismo oxidativo. Además regula la termogénesis por inducir la expresión de UCP1 y enzimas importantes de la cadena transportadora de electrones (86). Ratones con una delección en PGC-1 α , tiene afectada la termogénesis inducida por exposición al frío pero sorprendentemente son delgados y presentan resistencia a la obesidad inducida por dieta, lo cual indica que no es determinante en la identidad del tejido pardo per se (87).

Otras moléculas importantes dentro del fenotipo pardo es PRDM16, está altamente expresada en adipocitos pardos, se une y coactiva a PPAR γ y a PGC-1 α , está altamente expresada en adipocitos pardos y blancos de origen subcutáneo. La sobre expresión de esta molécula en mioblastos primarios genera la acumulación de lípidos y el fenotipo adipocítico pardo (88, 89). Como también en tejido graso subcutáneo, la sobre-expresión de PRDM16 activa células UCP1⁺ tras el tratamiento con catecolaminas (90). Dada la importancia de la activación de la grasa parda como un futuro tratamiento de la obesidad, se han reportado varios mecanismos como potenciales para generar fenotipo beige o brite. En el tejido adiposo ha sido hallado desde hace décadas células UCP1⁺ que no son de origen adipocítico pardo puro, gracias al avance en el entendimiento de estos mecanismos, se conoce que en la células mesenquimales que se encuentran en el tejido adiposo existen precursores de fenotipo blanco y aquellas que pueden expresar UCP1 es decir, precursores de adipocitos beige. Es este el punto que brinda la oportunidad a esta investigación de

caracterizar una nueva vía que permite generar activación de células UCP1⁺ tras el bloqueo de un regulador negativo de proteínas involucradas en la termogénesis y el gasto calórico, precisamente en una fuente importante como lo son las ADMSCs. A nivel de reguladores negativos de la adipogénesis parda se encuentra pRb, pues se ha puesto de manifiesto su función no solo a nivel de ciclo celular sino su acción en la determinación del linaje adipocítico pardo vs blanco (20).

1.5 pRB Y ADIPOGÉNESIS

El papel de pRb en la proliferación es bien conocido, su acción depende del estado de fosforilación para permitir la progresión del ciclo celular liberando a E2F y permitiendo la división de la célula. Adicionalmente pRb se requiere para promover y mantener la diferenciación y lo hace deteniendo el ciclo celular para promover la diferenciación terminal y uniéndose posteriormente a factores de transcripción específicos de tejido para inducir o reprimir la diferenciación (19). Durante la adipogénesis, pRb tiene un papel dual, primero en los preadipocitos confluentes el complejo represivo que forman E2F4/pRb inhiben la transcripción de genes reguladores de la adipogénesis como PPAR γ a través del reclutamiento de histonas deacetilasas 3 a sus promotores, reprimiendo de este modo los genes requeridos para adipogénesis (91). Posteriormente, la fosforilación de pRb resulta en la activación de PPAR γ y el fenotipo característico de los adipocitos blancos (91). Cuando células preadipocíticas primarias de ratón no modificadas y knock-out para pRb son inducidas a diferenciación, la expresión de UCP1 es observada solo en ausencia de

pRb además de activar alta expresión de PGC-1 α (20, 92). Otro de los modelos utilizados para estudiar el proceso adipogénico son los MEF, que al ser diferenciados hacia adipocitos muestran características de adipocitos pardos en ausencia de pRb y observaciones en microscopía electrónica revelan mayor cantidad de mitocondrias que las muestras control (93). Estudios posteriores in vivo hallaron en modelos murinos que la inactivación de pRb en tejido adiposo dispara la actividad mitocondrial y genera resistencia a la obesidad (21). Posteriormente, los mismos resultados fueron obtenidos mediante la haploinsuficiencia de pRb, realizado en ratones (94). Otro interesante estudio analizó los efectos de pRb a nivel transcripcional en células MEF y MEF pRb^{-/-} y se encontró que efectivamente las últimas expresan altos niveles de UCP1 y PGC-1 α (93). Todos estos hallazgos son consistentes con experimentos in-vitro que señalan que pRb se une a los promotores de PGC-1 α y reprime su expresión (22). En otro escenario que involucra a pRb, se reportó recientemente en experimentos in-vivo que la prolactina por un efecto pleiotrópico a nivel de metabolismo, genera activación de grasa beige en animales “knock-out” para PRLR. Estos hallazgos fueron debidos a la reducción de la expresión de pRb en los ratones PRLR^{-/-} (95). No obstante, a esta amplia documentación que involucra a pRb en la adquisición del fenotipo adipocítico pardo, se ha encontrado que está implicada en la diferenciación de las células precursoras mesenquimales comprometiendo el linaje osteogénico y adipogénico, a este nivel la presencia de pRb fortalece la diferenciación de estas células hacia osteoblastos, mientras que su ausencia dirige hacia el linaje de preadipocitos, en este punto los preadipocitos

pueden dirigirse hacia adipocitos pardos si la expresión de pRb es bloqueada, pero si es inducida posteriormente, las células adquirirán características adipocíticas blancas (96). Adicionalmente células progenitoras obtenidas de embriones de ratón negativas para pRb muestran capacidad adipogénica luego de la inducción a diferenciación y coherente con los demás resultados activa la expresión de PGC-1 α incluso sin inducir a diferenciación. Estos datos respaldan ampliamente los objetivos desarrollados en esta tesis, puesto que el destino de las ADMSCs aisladas de tejido subcutáneo humano, tras el tratamiento con EID1 como antagonista de pRb, mostró activación de proteínas termogénicas.

1.6 EID1

El control de la proliferación y diferenciación por parte de pRb depende en parte de su interacción con otras proteínas claves para desarrollar los procesos. Esfuerzos por lograr comprender y caracterizar estas moléculas llevaron al descubrimiento de EID1 como una molécula de unión a pRb (23, 24). Esta molécula está conformada por 187 aminoácidos y posee una marcada expresión en tejido cardiaco y músculo esquelético. Se une a pRb a través del dominio C terminal conformado por la secuencia LXCXE (leucina, cisteína y ácido glutámico, X corresponde a cualquier aminoácido) (23, 97). Para encontrar una relación funcional entre pRb y EID1 se estudió en células SAOS2, que carecen de pRb el posible efecto de EID1 en proliferación y diferenciación. Se encontró que SAOS2 en proliferación a las cuales se les sobre-expresó pRb, detuvieron su proliferación como era de esperarse, por el

efecto supresor de tumores ejercido por pRb (23). Interesantemente, al tratar estas células con EID1 no presentaron ningún efecto sobre la proliferación. Para estudiar el papel en diferenciación, estas células SAOS2 fueron transfectadas establemente con pRb, en presencia de EID1, las células control tomaron un aspecto de células “flat” con características de osteoblasto, por el contrario, las células tratadas con EID1 lideraron un 80% la reducción del número de células flat (23). En cuanto a la miogénesis, proceso en el que pRb cumple también un papel importante, se encontró que mioblastos C2C12 tratados con EID1, redujeron la formación de miotúbulos tras ser inducidos a diferenciación (24). Estudios funcionales corroboraron estos datos fenotípicos, puesto que EID1 redujo la actividad de MyOD en transfecciones transitorias. Igualmente han reportado que EID1 reduce la actividad de GR, TR y AR (23, 98, 99). Además EID1 y pRb tienen un efecto antagónico mutuo que fue descrito en experimentos de transfecciones, donde usaron el elemento de respuesta para GR asociado a luciferasa, con concentraciones constantes de EID1. La co-expresión de pRb en incrementadas concentraciones, condujo a la disminución del efecto represivo ejercido por EID1 sobre el promotor (23). No obstante a estos interesantes resultados que asocian a pRb con EID1 como una vía para regular la diferenciación, es importante mencionar que según la estructura de EID1, posee dos dominios ácidos los cuales se encuentran entre los aminoácidos 53 a 62 y 92 a 115. Estas regiones están comprometidas en la unión con coreguladores que tienen actividad acetilasa como p300, esta molécula es importante para activar marcadores miogénicos, así se encontró que EID1 es un inhibidor de la actividad acetilasa de

p300, por tanto no se descarta la posibilidad que el efecto inhibitorio de EID1 involucre tanto a pRb como a p300 (100).

Todos estos datos y la poca información de la acción de este inhibidor de diferenciación a nivel de adipogénesis, marcan un punto importante para el estudio presentado en esta investigación ya que si partimos de la función molecular de EID1 en los reguladores de la adipogénesis, se halló que disminuye la transactivación de PPAR γ en estudios funcionales posiblemente a través de la modulación de p300. Lo cual se presentará en capítulos posteriores.

1.7 MODELOS DE ESTUDIO DE ADIPOGÉNESIS

1.7.1 Línea celular 3T3-L1

Para lograr entender las vías que regulan la adipogénesis es necesario contar con modelos que permitan el entendimiento de este proceso. En este sentido, la diferenciación de preadipocitos hacia adipocitos se ha estudiado ampliamente en diversos modelos celulares de preadipocitos blancos de ratón Swiss 3T3-L1, línea inmortal derivada de células embrionarias de ratón (101). Así, en el proceso de transición de preadipocito a adipocito maduro se realiza en 4 estadios. En primer lugar se da una parada de la proliferación inducida mediante inhibición por contacto, indicando que se ha llegado a la confluencia, ya a partir de este momento el preadipocito está comprometido a diferenciarse en adipocito. En segundo lugar, continua una expansión clonal que se induce por señales hormonales y que está representada

por 2 divisiones mitóticas. En esta etapa al parecer el DNA es más accesible para la activación de transcripcional de genes necesaria para dar continuidad a la diferenciación. Luego se describe un estadio de diferenciación temprana, donde la división celular se detiene y se empiezan expresar genes característicos de adipocito, iniciándose la acumulación de lípidos (102, 103). Finalmente, la morfología típica de adipocito se alcanza con la fase de diferenciación terminal, induciéndose la transcripción de genes típicos de adipocitos maduros, por efecto de los altos niveles de PPAR γ y C/EBP α que son los responsables de inducir la activación de genes implicados en el metabolismo de ácidos grasos (103-105).

1.7.2 Células madre mesenquimales derivadas del tejido adiposo

El tejido adiposo no está compuesto solo de células adiposas, este tejido posee un compartimento denominado estroma vascular. Entre las células que componen el estroma vascular se encuentran preadipocitos, macrófagos, células endoteliales y células madre mesenquimales. Estas últimas tiene la capacidad de diferenciarse hacia distintos linajes como: miocitos, osteocitos, cartílago y adipocitos (106). Esta capacidad provee una importante plataforma de estudio para entender los mecanismos moleculares que regulan la adipogénesis en células humanas. En cuanto a las proteínas implicadas en la adquisición del fenotipo adipocítico no está tan bien caracterizado como los preadipocitos 3T3-L1, sin embargo comparten varias proteínas como C/EBP δ y C/EBP β en la fase temprana y PPAR γ junto con C/EBP α son catalogados los reguladores centrales del fenotipo maduro (107). La presencia de

células madre en el tejido adiposo blanco adulto pone en evidencia que persiste la capacidad para generar nuevos adipocitos, hecho que constituye otro enfoque de estudio en torno a la homeostasis energética y obesidad.

Tanto los preadipocitos 3T3-L1 como las ADMSCs aisladas de tejido graso subcutáneo humano, hacen parte de los modelos utilizados en esta investigación, pues el uso tanto de líneas celulares como de cultivos primarios da relevancia y profundiza en la comprensión de la función de la vía estudiada capaz de modificar el fenotipo adipocítico blanco por un adipocito más eficiente al aumentar el gasto calórico.

Todo este marco de referencia pretende enfocar la investigación, con conocimientos actuales que permiten abordar el tema de la obesidad y una posible perspectiva terapéutica que implica estudios de tipo molecular, funcional y fenotípico que dan cuenta de interesantes resultados descritos en los posteriores capítulos, y en qué punto podría estar actuando EID1 para generar la modulación adipogénica en los modelos estudiados.

1.8 BIBLIOGRAFÍA

1. Swinburn BA, Sacks G, Hall KD, McPherson K, Finegood DT, Moodie ML, et al. The global obesity pandemic: shaped by global drivers and local environments. *Lancet*. 2011;378(9793):804-14.
2. Swinburn B, Sacks G, Ravussin E. Increased food energy supply is more than sufficient to explain the US epidemic of obesity. *Am J Clin Nutr*. 2009;90(6):1453-6.
3. Keith SW, Redden DT, Katzmarzyk PT, Boggiano MM, Hanlon EC, Benca RM, et al. Putative contributors to the secular increase in obesity: exploring the roads less traveled. *Int J Obes (Lond)*. 2006;30(11):1585-94.
4. Frühbeck G, Gómez-Ambrosi J, Muruzábal FJ, Burrell MA. The adipocyte: a model for integration of endocrine and metabolic signaling in energy metabolism regulation. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2001;280(6):E827-47.
5. Rosen ED, Spiegelman BM. Adipocytes as regulators of energy balance and glucose homeostasis. *Nature*. 2006;444(7121):847-53.
6. Nolte RT, Wisely GB, Westin S, Cobb JE, Lambert MH, Kurokawa R, et al. Ligand binding and co-activator assembly of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. *Nature*. 1998;395(6698):137-43.
7. Gelman L, Feige JN, Desvergne B. Molecular basis of selective PPARgamma modulation for the treatment of Type 2 diabetes. *Biochim Biophys Acta*. 2007;1771(8):1094-107.
8. Evans RM, Barish GD, Wang YX. PPARs and the complex journey to obesity. *Nat Med*. 2004;10(4):355-61.

9. White UA, Stephens JM. Transcriptional factors that promote formation of white adipose tissue. *Mol Cell Endocrinol*. 2010;318(1-2):10-4.
10. Seale P. Transcriptional control of brown adipocyte development and thermogenesis. *Int J Obes (Lond)*. 2010;34 Suppl 1:S17-22.
11. Christian M, Parker M. The Engineering of Brown Fat. *Journal of molecular cell biology*. 2010;2(1):3.
12. Feng B, Zhang T, Xu H. Human adipose dynamics and metabolic health. *Ann N Y Acad Sci*. 2013;1281:160-77.
13. Gunawardana SC. Therapeutic value of brown adipose tissue: Correcting metabolic disease through generating healthy fat. *Adipocyte*. 2012;1(4):250-5.
14. Kozak LP. The genetics of brown adipocyte induction in white fat depots. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2011;2:64.
15. Whittle A, Vidal-Puig A. When BAT is lacking, WAT steps up. *Cell Res*. 2013.
16. Flachs P, Rossmeisl M, Kuda O, Kopecky J. Stimulation of mitochondrial oxidative capacity in white fat independent of UCP1: a key to lean phenotype. *Biochim Biophys Acta*. 2013;1831(5):986-1003.
17. Rosenwald M, Perdikari A, Rüllicke T, Wolfrum C. Bi-directional interconversion of brite and white adipocytes. *Nat Cell Biol*. 2013;15(6):659-67.
18. Wu J, Boström P, Sparks LM, Ye L, Choi JH, Giang AH, et al. Beige adipocytes are a distinct type of thermogenic fat cell in mouse and human. *Cell*. 2012;150(2):366-76.

19. Hallenborg P, Feddersen S, Madsen L, Kristiansen K. The tumor suppressors pRB and p53 as regulators of adipocyte differentiation and function. *Expert Opin Ther Targets*. 2009;13(2):235-46.
20. Hansen JB, te Riele H, Kristiansen K. Novel function of the retinoblastoma protein in fat: regulation of white versus brown adipocyte differentiation. *Cell Cycle*. 2004;3(6):774-8.
21. Dali-Youcef N, Matakı C, Coste A, Messaddeq N, Giroud S, Blanc S, et al. Adipose tissue-specific inactivation of the retinoblastoma protein protects against diabetes because of increased energy expenditure. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(25):10703-8.
22. Scimè A, Grenier G, Huh MS, Gillespie MA, Bevilacqua L, Harper ME, et al. Rb and p107 regulate preadipocyte differentiation into white versus brown fat through repression of PGC-1alpha. *Cell Metab*. 2005;2(5):283-95.
23. Miyake S, Sellers WR, Safran M, Li X, Zhao W, Grossman SR, et al. Cells degrade a novel inhibitor of differentiation with E1A-like properties upon exiting the cell cycle. *Mol Cell Biol*. 2000;20(23):8889-902.
24. MacLellan WR, Xiao G, Abdellatif M, Schneider MD. A novel Rb- and p300-binding protein inhibits transactivation by MyoD. *Mol Cell Biol*. 2000;20(23):8903-15.
25. Li Z, Bowerman S, Heber D. Health ramifications of the obesity epidemic. *Surg Clin North Am*. 2005;85(4):681-701, v.
26. Bouchard C. The biological predisposition to obesity: beyond the thrifty genotype scenario. *Int J Obes (Lond)*. 2007;31(9):1337-9.

27. Yamada Y, Kato K, Kameyama T, Yokoi K, Matsuo H, Segawa T, et al. Genetic factors for obesity. *Int J Mol Med*. 2006;18(5):843-51.
28. Ichihara S, Yamada Y. Genetic factors for human obesity. *Cell Mol Life Sci*. 2008;65(7-8):1086-98.
29. Bašić M, Butorac A, Landeka Jurčević I, Bačun-Družina V. Obesity: genome and environment interactions. *Arh Hig Rada Toksikol*. 2012;63(3):395-405.
30. Finucane MM, Stevens GA, Cowan MJ, Danaei G, Lin JK, Paciorek CJ, et al. National, regional, and global trends in body-mass index since 1980: systematic analysis of health examination surveys and epidemiological studies with 960 country-years and 9.1 million participants. *Lancet*. 2011;377(9765):557-67.
31. Cleland SJ. Cardiovascular risk in double diabetes mellitus--when two worlds collide. *Nat Rev Endocrinol*. 2012;8(8):476-85.
32. Ferguson RD, Gallagher EJ, Scheinman EJ, Damouni R, Leroith D. The epidemiology and molecular mechanisms linking obesity, diabetes, and cancer. *Vitam Horm*. 2013;93:51-98.
33. Curioni CC, Lourenço PM. Long-term weight loss after diet and exercise: a systematic review. *Int J Obes (Lond)*. 2005;29(10):1168-74.
34. Segaran E. Provision of nutritional support to those experiencing complications following bariatric surgery. *Proc Nutr Soc*. 2010;69(4):536-42.
35. Zalesin KC, Miller WM, Franklin B, Mudugal D, Rao Buragadda A, Boura J, et al. Vitamin a deficiency after gastric bypass surgery: an underreported postoperative complication. *J Obes*. 2011;2011.

36. Chakrabarti R. Pharmacotherapy of obesity: emerging drugs and targets. *Expert Opin Ther Targets*. 2009;13(2):195-207.
37. Holes-Lewis KA, Malcolm R, O'Neil PM. Pharmacotherapy of obesity: clinical treatments and considerations. *Am J Med Sci*. 2013;345(4):284-8.
38. Cannon B, Nedergaard J. Nonshivering thermogenesis and its adequate measurement in metabolic studies. *J Exp Biol*. 2011;214(Pt 2):242-53.
39. Boss O, Farmer SR. Recruitment of brown adipose tissue as a therapy for obesity-associated diseases. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2012;3:14.
40. Whittle A, Relat-Pardo J, Vidal-Puig A. Pharmacological strategies for targeting BAT thermogenesis. *Trends Pharmacol Sci*. 2013.
41. van Marken Lichtenbelt WD, Vanhommerig JW, Smulders NM, Drossaerts JM, Kemerink GJ, Bouvy ND, et al. Cold-activated brown adipose tissue in healthy men. *N Engl J Med*. 2009;360(15):1500-8.
42. Virtanen KA, Lidell ME, Orava J, Heglind M, Westergren R, Niemi T, et al. Functional brown adipose tissue in healthy adults. *N Engl J Med*. 2009;360(15):1518-25.
43. Cannon B, Nedergaard J. Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol Rev*. 2004;84(1):277-359.
44. Dulloo AG. The search for compounds that stimulate thermogenesis in obesity management: from pharmaceuticals to functional food ingredients. *Obes Rev*. 2011;12(10):866-83.

45. Torp-Pedersen C, Caterson I, Coutinho W, Finer N, Van Gaal L, Maggioni A, et al. Cardiovascular responses to weight management and sibutramine in high-risk subjects: an analysis from the SCOUT trial. *Eur Heart J*. 2007;28(23):2915-23.
46. Seals DR, Dinunno FA. Collateral damage: cardiovascular consequences of chronic sympathetic activation with human aging. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2004;287(5):H1895-905.
47. Rigamonti A, Brennand K, Lau F, Cowan CA. Rapid cellular turnover in adipose tissue. *PLoS One*. 2011;6(3):e17637.
48. Schipper HS, Prakken B, Kalkhoven E, Boes M. Adipose tissue-resident immune cells: key players in immunometabolism. *Trends Endocrinol Metab*. 2012;23(8):407-15.
49. Ailhaud G, Grimaldi P, Négrel R. Cellular and molecular aspects of adipose tissue development. *Annu Rev Nutr*. 1992;12:207-33.
50. Spalding KL, Arner E, Westermark PO, Bernard S, Buchholz BA, Bergmann O, et al. Dynamics of fat cell turnover in humans. *Nature*. 2008;453(7196):783-7.
51. Gesta S, Tseng YH, Kahn CR. Developmental origin of fat: tracking obesity to its source. *Cell*. 2007;131(2):242-56.
52. Zeve D, Tang W, Graff J. Fighting fat with fat: the expanding field of adipose stem cells. *Cell Stem Cell*. 2009;5(5):472-81.
53. Frayn KN, Karpe F, Fielding BA, Macdonald IA, Coppack SW. Integrative physiology of human adipose tissue. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 2003;27(8):875-88.

54. Calabro P, Yeh ET. Obesity, inflammation, and vascular disease: the role of the adipose tissue as an endocrine organ. *Subcell Biochem.* 2007;42:63-91.
55. Hotamisligil GS. Inflammation and metabolic disorders. *Nature.* 2006;444(7121):860-7.
56. Saltiel AR. Insulin resistance in the defense against obesity. *Cell Metab.* 2012;15(6):798-804.
57. Hursting SD. Minireview: the year in obesity and cancer. *Mol Endocrinol.* 2012;26(12):1961-6.
58. Burke LE, Thompson DR, Roos S, van Rijssen A, Verdouw HC, Troe E. Global cardiovascular disease prevention: a call to action for nursing: multilevel policies. *J Cardiovasc Nurs.* 2011;26(4 Suppl):S15-21.
59. Mathieu P, Poirier P, Pibarot P, Lemieux I, Després JP. Visceral obesity: the link among inflammation, hypertension, and cardiovascular disease. *Hypertension.* 2009;53(4):577-84.
60. Spiegelman BM. PPAR-gamma: adipogenic regulator and thiazolidinedione receptor. *Diabetes.* 1998;47(4):507-14.
61. Lehrke M, Lazar MA. The many faces of PPARgamma. *Cell.* 2005;123(6):993-9.
62. Yamauchi T, Kamon J, Waki H, Murakami K, Motojima K, Komeda K, et al. The mechanisms by which both heterozygous peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) deficiency and PPARgamma agonist improve insulin resistance. *J Biol Chem.* 2001;276(44):41245-54.

63. Fève B. Adipogenesis: cellular and molecular aspects. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2005;19(4):483-99.
64. Louet JF, O'Malley BW. Coregulators in adipogenesis: what could we learn from the SRC (p160) coactivator family? *Cell Cycle.* 2007;6(20):2448-52.
65. Koppen A, Kalkhoven E. Brown vs white adipocytes: the PPAR γ coregulator story. *FEBS Lett.* 2010;584(15):3250-9.
66. Brun RP, Kim JB, Hu E, Spiegelman BM. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma and the control of adipogenesis. *Curr Opin Lipidol.* 1997;8(4):212-8.
67. Monsalve FA, Pyarasani RD, Delgado-Lopez F, Moore-Carrasco R. Peroxisome proliferator-activated receptor targets for the treatment of metabolic diseases. *Mediators Inflamm.* 2013;2013:549627.
68. Schupp M, Clemenz M, Gineste R, Witt H, Janke J, Helleboid S, et al. Molecular characterization of new selective peroxisome proliferator-activated receptor gamma modulators with angiotensin receptor blocking activity. *Diabetes.* 2005;54(12):3442-52.
69. Abbas A, Blandon J, Rude J, Elfar A, Mukherjee D. PPAR- γ agonist in treatment of diabetes: cardiovascular safety considerations. *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem.* 2012;10(2):124-34.
70. van Marken Lichtenbelt W. Brown adipose tissue and the regulation of nonshivering thermogenesis. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2012;15(6):547-52.
71. Fedorenko A, Lishko PV, Kirichok Y. Mechanism of fatty-acid-dependent UCP1 uncoupling in brown fat mitochondria. *Cell.* 2012;151(2):400-13.

72. Cypess AM, Lehman S, Williams G, Tal I, Rodman D, Goldfine AB, et al. Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans. *N Engl J Med*. 2009;360(15):1509-17.
73. Wang Q, Zhang M, Ning G, Gu W, Su T, Xu M, et al. Brown adipose tissue in humans is activated by elevated plasma catecholamines levels and is inversely related to central obesity. *PLoS One*. 2011;6(6):e21006.
74. Frontini A, Vitali A, Perugini J, Murano I, Romiti C, Ricquier D, et al. White-to-brown transdifferentiation of omental adipocytes in patients affected by pheochromocytoma. *Biochim Biophys Acta*. 2013;1831(5):950-9.
75. Timmons JA, Wennmalm K, Larsson O, Walden TB, Lassmann T, Petrovic N, et al. Myogenic gene expression signature establishes that brown and white adipocytes originate from distinct cell lineages. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(11):4401-6.
76. Wu J, Cohen P, Spiegelman BM. Adaptive thermogenesis in adipocytes: is beige the new brown? *Genes Dev*. 2013;27(3):234-50.
77. Sharp LZ, Shinoda K, Ohno H, Scheel DW, Tomoda E, Ruiz L, et al. Human BAT possesses molecular signatures that resemble beige/brite cells. *PLoS One*. 2012;7(11):e49452.
78. Vosselman MJ, van Marken Lichtenbelt WD, Schrauwen P. Energy dissipation in brown adipose tissue: From mice to men. *Mol Cell Endocrinol*. 2013.
79. Farmer SR. Transcriptional control of adipocyte formation. *Cell Metab*. 2006;4(4):263-73.

80. Erickson RL, Hemati N, Ross SE, MacDougald OA. p300 coactivates the adipogenic transcription factor CCAAT/enhancer-binding protein alpha. *J Biol Chem.* 2001;276(19):16348-55.
81. Takahashi N, Kawada T, Yamamoto T, Goto T, Taimatsu A, Aoki N, et al. Overexpression and ribozyme-mediated targeting of transcriptional coactivators CREB-binding protein and p300 revealed their indispensable roles in adipocyte differentiation through the regulation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *J Biol Chem.* 2002;277(19):16906-12.
82. Yamauchi T, Oike Y, Kamon J, Waki H, Komeda K, Tsuchida A, et al. Increased insulin sensitivity despite lipodystrophy in Crebbp heterozygous mice. *Nat Genet.* 2002;30(2):221-6.
83. Yao TP, Oh SP, Fuchs M, Zhou ND, Ch'ng LE, Newsome D, et al. Gene dosage-dependent embryonic development and proliferation defects in mice lacking the transcriptional integrator p300. *Cell.* 1998;93(3):361-72.
84. Duteil D, Chambon C, Ali F, Malivindi R, Zoll J, Kato S, et al. The transcriptional coregulators TIF2 and SRC-1 regulate energy homeostasis by modulating mitochondrial respiration in skeletal muscles. *Cell Metab.* 2010;12(5):496-508.
85. Puigserver P. Tissue-specific regulation of metabolic pathways through the transcriptional coactivator PGC1-alpha. *Int J Obes (Lond).* 2005;29 Suppl 1:S5-9.
86. Handschin C, Spiegelman BM. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 coactivators, energy homeostasis, and metabolism. *Endocr Rev.* 2006;27(7):728-35.

87. Uldry M, Yang W, St-Pierre J, Lin J, Seale P, Spiegelman BM. Complementary action of the PGC-1 coactivators in mitochondrial biogenesis and brown fat differentiation. *Cell Metab.* 2006;3(5):333-41.
88. Seale P, Kajimura S, Yang W, Chin S, Rohas LM, Uldry M, et al. Transcriptional control of brown fat determination by PRDM16. *Cell Metab.* 2007;6(1):38-54.
89. Seale P, Bjork B, Yang W, Kajimura S, Chin S, Kuang S, et al. PRDM16 controls a brown fat/skeletal muscle switch. *Nature.* 2008;454(7207):961-7.
90. Seale P, Conroe HM, Estall J, Kajimura S, Frontini A, Ishibashi J, et al. Prdm16 determines the thermogenic program of subcutaneous white adipose tissue in mice. *J Clin Invest.* 2011;121(1):96-105.
91. Fajas L, Egler V, Reiter R, Hansen J, Kristiansen K, Debril MB, et al. The retinoblastoma-histone deacetylase 3 complex inhibits PPARgamma and adipocyte differentiation. *Dev Cell.* 2002;3(6):903-10.
92. Hansen JB, Jørgensen C, Petersen RK, Hallenborg P, De Matteis R, Bøye HA, et al. Retinoblastoma protein functions as a molecular switch determining white versus brown adipocyte differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101(12):4112-7.
93. Hakim-Weber R, Krogsdam AM, Jørgensen C, Fischer M, Prokesch A, Bogner-Strauss JG, et al. Transcriptional regulatory program in wild-type and retinoblastoma gene-deficient mouse embryonic fibroblasts during adipocyte differentiation. *BMC Res Notes.* 2011;4:157.

94. Mercader J, Ribot J, Murano I, Feddersen S, Cinti S, Madsen L, et al. Haploinsufficiency of the retinoblastoma protein gene reduces diet-induced obesity, insulin resistance, and hepatosteatosis in mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2009;297(1):E184-93.
95. Auffret J, Viengchareun S, Carré N, Denis RG, Magnan C, Marie PY, et al. Beige differentiation of adipose depots in mice lacking prolactin receptor protects against high-fat-diet-induced obesity. *FASEB J.* 2012.
96. Calo E, Quintero-Estades JA, Danielian PS, Nedelcu S, Berman SD, Lees JA. Rb regulates fate choice and lineage commitment in vivo. *Nature.* 2010;466(7310):1110-4.
97. Båvner A, Johansson L, Toresson G, Gustafsson JA, Treuter E. A transcriptional inhibitor targeted by the atypical orphan nuclear receptor SHP. *EMBO Rep.* 2002;3(5):478-84.
98. Park YY, Park KC, Shong M, Lee SJ, Lee YH, Choi HS. EID-1 interacts with orphan nuclear receptor SF-1 and represses its transactivation. *Mol Cells.* 2007;24(3):372-7.
99. Diana V, Luis C, Carolina R, Fernando L. Modulation of thyroid hormone receptor transactivation by the early region 1A (E1A)-like inhibitor of differentiation 1 (EID1). *Genetics and Molecular Biology.* 2008;31(2):409-15.
100. Båvner A, Matthews J, Sanyal S, Gustafsson JA, Treuter E. EID3 is a novel EID family member and an inhibitor of CBP-dependent co-activation. *Nucleic Acids Res.* 2005;33(11):3561-9.

101. Fu M, Sun T, Bookout AL, Downes M, Yu RT, Evans RM, et al. A Nuclear Receptor Atlas: 3T3-L1 adipogenesis. *Mol Endocrinol.* 2005;19(10):2437-50.
102. Tontonoz P, Hu E, Graves RA, Budavari AI, Spiegelman BM. mPPAR gamma 2: tissue-specific regulator of an adipocyte enhancer. *Genes Dev.* 1994;8(10):1224-34.
103. Tzamelis I, Fang H, Ollero M, Shi H, Hamm JK, Kievit P, et al. Regulated production of a peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ligand during an early phase of adipocyte differentiation in 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem.* 2004;279(34):36093-102.
104. Hamm JK, Park BH, Farmer SR. A role for C/EBPbeta in regulating peroxisome proliferator-activated receptor gamma activity during adipogenesis in 3T3-L1 preadipocytes. *J Biol Chem.* 2001;276(21):18464-71.
105. Tamori Y, Masugi J, Nishino N, Kasuga M. Role of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma in maintenance of the characteristics of mature 3T3-L1 adipocytes. *Diabetes.* 2002;51(7):2045-55.
106. Strem BM, Hicok KC, Zhu M, Wulur I, Alfonso Z, Schreiber RE, et al. Multipotential differentiation of adipose tissue-derived stem cells. *Keio J Med.* 2005;54(3):132-41.
107. Tang QQ, Lane MD. Adipogenesis: from stem cell to adipocyte. *Annu Rev Biochem.* 2012;81:715-36.

CAPITULO 2

EL AGONISMO DIFERENCIAL DEL RECEPTOR NUCLEAR PPAR γ GENERA LA INCORPORACIÓN DE DISTINTOS COACTIVADORES

2.1 RESUMEN

El receptor nuclear PPAR γ regula la expresión de genes implicados en el metabolismo de lípidos y carbohidratos con algunos efectos protectores en pacientes con diabetes tipo 2. Sin embargo, el valor terapéutico de la activación funcional de PPAR γ es limitado a causa de los efectos secundarios observados en algunos ligandos sintéticos de este receptor nuclear. La función de PPAR γ como regulador de la expresión de genes está determinado por la unión de cofactores que median cambios conformacional inducidos por el ligando de PPAR γ . En el actual trabajo se evaluó el efecto diferencial de algunos ligandos sobre la unión de cofactores que se asocian a PPAR γ . Los ligandos utilizados fueron rosiglitazona prescrito originalmente para el tratamiento de la diabetes tipo 2 y telmisartán medicamento suministrado para el tratamiento de la hipertensión arterial. Mediante la evaluación de eventos moleculares y fenotípicos en preadipocitos 3T3-L1 además de ensayos funcionales de transfecciones transitorias en células U2OS, observamos la influencia que ejercen varias familias de cofactores sobre la activación de PPAR γ y su acción en la adipogénesis. Los resultados confirman que telmisartán tiene un efecto modulador parcial de la actividad PPAR γ en comparación a rosiglitazona. Del mismo modo, los cofactores SRC1 y GRIP1 median la actividad tanto de telmisartán como rosiglitazona y determinan parcialmente la diferencia en sus efectos. El estudio de la actividad moduladora de estos cofactores puede proporcionar perspectivas interesantes para el desarrollo de nuevos enfoques terapéuticos para ciertas enfermedades metabólicas.

2.2 INTRODUCCIÓN

PPAR γ es un factor de transcripción, miembro de la familia de receptores nucleares dependientes de ligando, el cual regula la expresión de genes mediante unión a sitios concretos en el DNA llamados PPREs. La función de este receptor incluye tanto el control del metabolismo de carbohidratos, como el de lípidos y la diferenciación celular (1-3). A nivel estructural PPAR γ posee varios dominios funcionales. El dominio LBD, localizado en la región C-terminal que modula la estructura conformacional del receptor, permitiendo la captura de coactivadores que se unen para inducir la transcripción de genes específicos (4, 5). Estos coactivadores tienen actividad acetilasa de histona que es requerida para remodelar la estructura de la cromatina. Entre estas proteínas se encuentra la familia SRC (p160 family of steroid receptor) y p300/CBP (5, 6). PPAR γ es un regulador clave de la diferenciación de células adiposas, por lo cual la modulación de la expresión de genes mediados por ligandos sintéticos de este receptor, puede incrementar la sensibilidad a la insulina vía retención de ácidos grasos en el tejido adiposo reduciendo así la producción de citoquinas pro-inflamatorias (7, 8). Sin embargo, pese a estos efectos benéficos, su potencial farmacológico es encubierto por efectos adversos que incluye ganancia de peso, retención de fluidos e incremento en las concentraciones de lipoproteínas (9-11). Estos datos sugieren que la activación parcial de PPAR γ puede ser un abordaje interesante de tal modo que se mantengan sus beneficios metabólicos, excluyendo los efectos secundarios. Esto podría ser alcanzado a través del uso de componentes con agonismo parcial conocidos SPPARMs que significa moduladores selectivos de

PPAR γ (12). Telmisartán un receptor bloqueador de angiotensina (ARBs), ha sido caracterizado como un posible SPPARM que podría mantener la eficacia de la activación de PPAR γ con efectos secundarios reducidos (13). Sin embargo datos concernientes al reclutamiento de co-reguladores por parte de los SPPARMs aún son insuficientes.

En este estudio se evaluó la activación de PPAR γ en presencia de rosiglitazona y telmisartán y su capacidad de modular la expresión de genes específicos de adipocitos, a nivel fenotípico se observó que telmisartán reduce la acumulación de lípidos en preadipocitos 3T3-L1 y que estos hallazgos son probablemente debidos a una diferencia en cuanto al reclutamiento de coactivadores por parte de los agonistas estudiados.

2.3 MATERIALES Y MÉTODOS

2.3.1 Plásmidos

La secuencia que codifica para PPAR γ fue clonada en el sitio *SalI* del vector pSV.SPORT1(14), los plásmidos Gal4-PPAR γ LBD y PPRE-Luc fueron provistos por el Dr. Bruce Spiegelman de Dana Farber Cancer Center, Boston, MA. En cuanto a los co-activadores, el inserto que codifica para p300 se encuentra en los sitios *NotI* y *HindIII* del vector CMV-NHA. La construcción de SRC1, GRP1 y PRIP han sido previamente descritos (15-17). VP16-SRC1 fue construido por inserción del fragmento amplificado del gen por reacción en cadena de la polimerasa, en el sitio *EcoRI* del dominio de activación de VP16 (residuos 409-490). En cuanto al reportero 5XUAS fue clonado en los sitios de restricción *BamHI* y *HindIII* del vector pT109, el cual posee el promotor TK acoplado a luciferasa. (18).

2.3.2 Transfecciones transitorias y doble híbrido

Las líneas celulares U2OS y 3T3-L1 fueron obtenidas de ATCC (American Type Culture Collection) y crecidas en medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's) suplementado con 10% de FBS (fetal bivone serum) y 1% de penicilina/estreptomicina a 37°C y una atmósfera de 5% de CO₂. Cuando las células alcanzaron el 70% de confluencia, fueron transfectadas transitoriamente con lipofectamina 2000 (Invitrogen) en cajas de cultivo de 12 pozos con 0.85ug de PPRE-Luc como plásmido reportero, 0.5 μ g de CMVB-Gal como plásmido control, 0.2 μ g de PPAR γ y 0.1 μ g de cada uno de los co-activadores, p300, SRC1 GRIP1 y PRIP.

La cantidad de DNA total transfectado fue normalizado con el vector pcDNA3.1 que no posee inserto. Pasadas 24 horas, el medio fue reemplazado por DMEM con 10% de suero bovino fetal tratado con una resina para eliminar ligandos endógenos del mismo y 1 μ M o 10 μ M de ligandos (rosiglitazona o telmisartán). DMSO (Dimetilsulfoxido) fue usado como vehículo a una concentración máxima de 0.2%. Luego de 24 horas más de incubación las células fueron lavadas y lisadas con buffer Triton X-100 y la actividad tanto de luciferasa como de β -Galactosidasa fue cuantificada.

En cuanto a los estudios de doble híbrido, células U2OS fueron transfectadas mediante la técnica anteriormente descrita con 0.85 μ g del reportero 5XUAS-TK-Luc, 0.1 μ g de Gal4PPAR μ y 0.35 μ g de VP16-SRC1 o CMV β -Galactosidasa utilizado como control interno. Igual procedimiento fue descrito en el anterior experimento. Los cambios en la actividad de luciferasa o expresión de β -galactosidasa en las células transfectadas con los vectores de estudio, fueron calculados en relación a la actividad de vector de control pcDNA 3.1. Los datos fueron realizados por triplicado en 3 experimentos independientes y las gráficas muestran el error estándar de la media.

2.3.3 Ensayo de diferenciación de células adiposas

Los preadipocitos 3T3-L1 fueron mantenidos en medio DMEM suplementado con 10% de Suero bovino fetal y 1% de antibióticos. 48 horas después de la confluencia las células fueron inducidas a diferenciación en medio con 1 μ M de dexametasona,

0.5mM de IBMX (3-isobutil-1-metilxantina) y 1 μ M ó 10 μ M de telmisartán o 1 μ M de rosiglitazona o la combinación de ambos ligandos según se indica en los resultados. 48 horas después el medio fue cambiado y únicamente los ligandos fueron adicionados, cada 2 días el medio fue retirado hasta completar 8 días de tratamiento. Luego las células diferenciadas fueron lavadas y fijadas con 10% de formaldehído y teñidas con 0.6% aceite rojo en 60% de isopropanol durante 2 horas a temperatura ambiente. Para la cuantificación, la monocapa teñida fue extensamente lavada para retirar restos de colorante y 1mL de alcohol isopropílico se adicionó para desteñir los discos y luego de 5 minutos la absorbancia de las muestras se midió a 510 nanómetros mediante espectrofotometría.

2.3.4 Análisis de Western Blot.

Las células 3T3-L1 fueron lisadas en buffer RIPA (1X PBS, 1% Nonidet P-40, 0.1% SDS e inhibidores de proteasas (Roche) las muestras fueron tomadas a los 0, 4 y 8 días pos-diferenciación. Después de la centrifugación, 200 μ g de proteínas totales fueron mezcladas con igual volumen de buffer de muestra, desnaturalizadas a 95°C por 3 minutos y corrida la electroforesis a través de gel SDS de poliacrilamida, transferida luego a una membrana de nitrocelulosa. Posteriormente la membrana fue incubada en 5% de leche en polvo descremada en PBS-T (0.1% v/v de Tween-20 en PBS) durante 1 hora a 4°C para bloquear uniones inespecíficas. Después, la membrana fue incubada con anticuerpos contra Fabp4/aP2 (ABCAM, Cambridge MA, USA) 1:1000. Posteriormente la membrana fue lavada y se incubó con anticuerpo HRP goat anti-rabbit (1:2000) (ABCAM, Cambridge MA, USA) durante 1 hora. La membrana

fue expuesta a solución ECL (Amersham Pharmacia Biotech) para revelar y visualizar a través de autoradiografía. El análisis cuantitativo fue realizado mediante análisis de densitometría. Los resultados muestran el error estándar de la muestra

2.3.5 Análisis estadístico

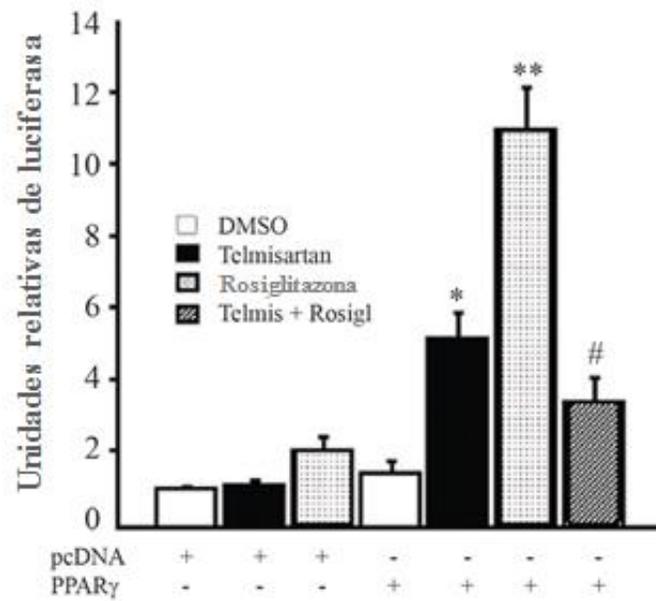
El test de análisis de varianza (ANOVA) se realizó usando el programa *Stat-View*. Se consideraron diferencias estadísticamente significativas con valor de $p < 0.05$. En los estudios de transfección, la cotransfección con β -galactosidasa fue realizada para normalizar los datos y evitar la dispersión de resultados. La β -galactosidasa tiene un promotor diferente, lo cual no interfiere en los resultados. El test t-student se usó para comparar los dos tratamientos.

2.4 RESULTADOS

Con el objeto de determinar la activación transcripcional de PPAR γ mediada por telmisartan o rosiglitazona, células U2OS fueron transfectadas transitoriamente con un plásmido codificando PPAR γ y un vector reportero conteniendo un PPRE natural. El tratamiento con los ligandos a las células transfectadas significativamente aumentó la activación de luciferasa. Sin embargo, dosis altas de telmisartán 10 μ M no indujeron un aumento de la activación de PPAR γ de similar magnitud a lo observado con rosiglitazona. Posteriormente, se analizó un posible efecto sinérgico de los dos ligandos sobre la transactivación de PPAR γ . El tratamiento de telmisartán junto a rosiglitazona a las células transfectadas, generó una significativa reducción de la activación de PPAR γ comparado con solo rosiglitazona (Figura 1A).

Para observar concordancia entre los datos arrojados en los estudios funcionales, se analizó el efecto de los agonistas en la diferenciación de preadipocitos 3T3-L1. Teniendo en cuenta que PPAR γ juega un papel fundamental en la adquisición del fenotipo del adipocito. Se halló que rosiglitazona induce una mayor acumulación de triglicéridos lo que indirectamente demuestra un elevado nivel de diferenciación comparado con dosis altas de telmisartán. Cuando dosis de telmisartán de 1 y 10 μ M fueron adicionados al medio de diferenciación en presencia de rosiglitazona, se observó una reducción en la diferenciación de los preadipocitos. (Figura 1B).

A



B

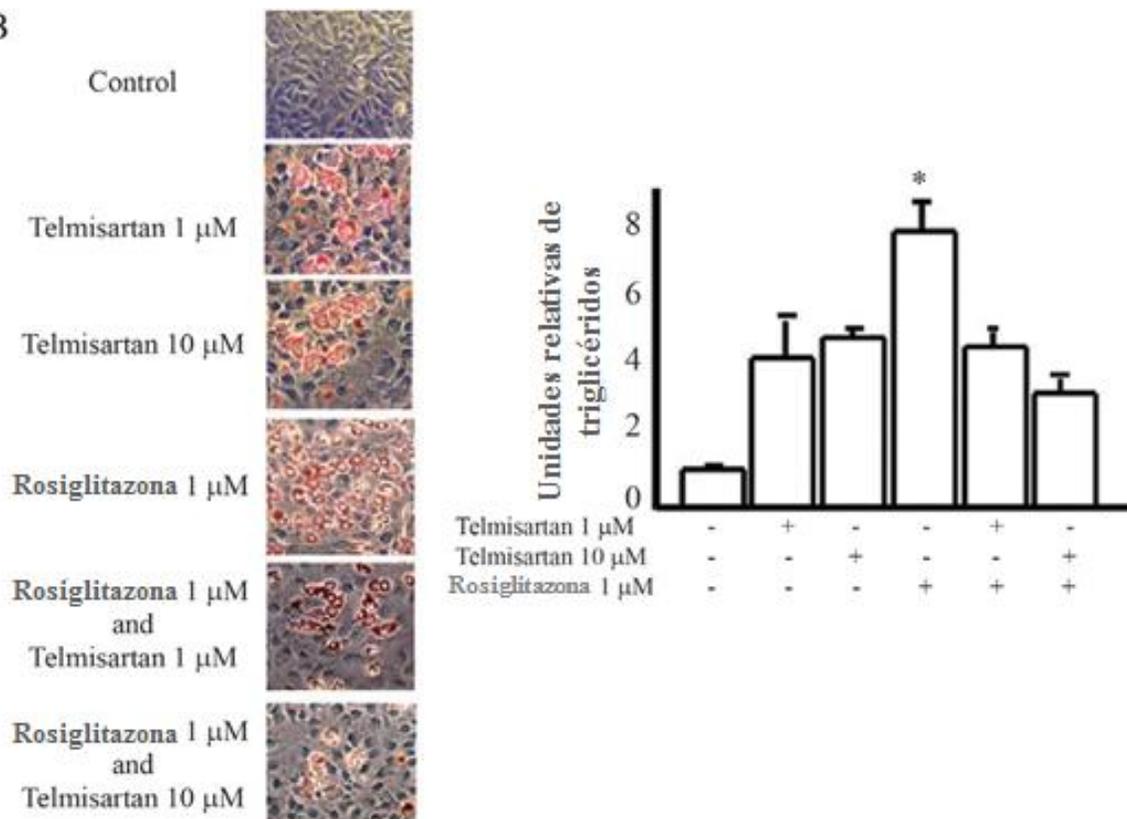


Figura 1. Telmisartán y rosiglitazona inducen la activación transcripcional de PPAR γ y la diferenciación de células adiposas. A. Células U2OS fueron transitoriamente transfectadas con un plásmido reportero unido a luciferasa PPRE-Luc y un vector con PPAR γ , posteriormente las células fueron tratadas a parte o en combinación con 10 μ M de telmisartán o 1 μ M de Rosiglitazona. La actividad de luciferasa fue normalizada con β -galactosidasa y los datos fueron calculados mediante tres ensayos independientes por triplicado. B. Los preadipocitos 3T3-L1 fueron inducidos a diferenciación con una mezcla de 1 μ M de dexametasona, 0.5mM de 3-isobutil-1-metilxantina y 1 μ M o 10 μ M de telmisartán o 1 μ M de Rosiglitazona. La acumulación de triglicéridos fue cuantificada como se menciona en materiales y métodos. Los datos muestran la desviación estándar y representan un mínimo de tres experimentos independientes. El análisis estadístico fue realizado por análisis de varianza ANOVA, para A: * cambios en la actividad de luciferasa relativo únicamente al vector de expresión usado como control, con un valor significativo de $p < 0.05$; ** cambios en la actividad de luciferasa relativo únicamente al vector de expresión usado como control, con un valor significativo de $p < 0.01$; # cambios en la actividad de luciferasa relativo la activación ejercida en presencia de rosiglitazona sobre el vector que contenía a PPAR γ , con un valor significativo de $p < 0.01$. En cuanto a B: *El tratamiento de rosiglitazona vs telmisartán sobre la adipogénesis de las 3T3-L1 arrojaron un valor de significancia de $p < 0.05$

Posteriormente, el efecto de estos agonistas fue evaluado en su capacidad de modular la expresión de Fabp4/aP2, que es regulado por PPAR γ , efectivamente se encontró que niveles altos fueron detectados mediante western blot tras el tratamiento con rosiglitazona a diferencia de lo encontrado con telmisartán (Figura 2).

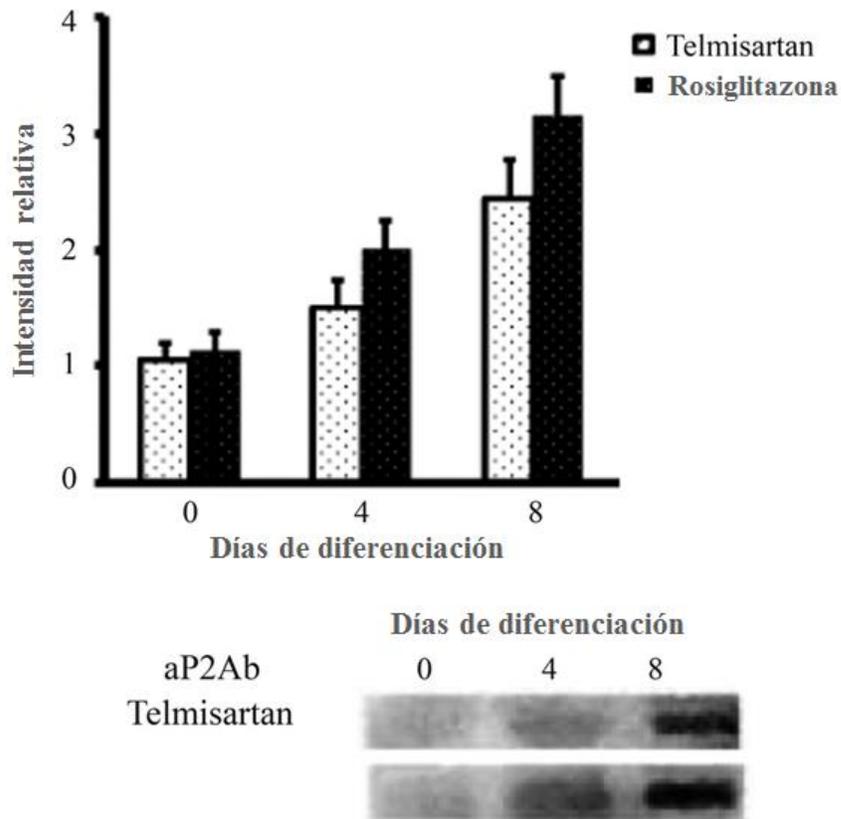


Figura 2. Telmisartán y rosiglitazona inducen la activación transcripcional de $PPAR\gamma$ y la diferenciación de células adiposas.. Los preadipocitos 3T3-L1 fueron inducidos a diferenciación en presencia de telmisartán o rosiglitazona. Los niveles de expresión de aP2 fueron analizados durante los días señalados (día 0 se definió a las 48 pos-confluencia, momento en el que se indujo la diferenciación) mediante western blotting. El estudio cuantitativo de los western blot se realizó mediante análisis de densitometría en tres experimentos diferentes.

Debido a que una probable diferencia en la incorporación de coactivadores por parte de los agonistas empleados podría explicar los efectos observados en los estudios anteriores, se evaluó si la incorporación de diferentes cofactores podría influir en la distinta actividad del receptor nuclear PPAR γ . La cotransfección de p300 y PRIP incrementó significativamente la activación de ambos agonistas, mientras que el grupo de coactivadores de la familia p160 (SRC1 y GRIP) no demostraron un incremento significativo de PPAR γ tras la adición de telmisartán (Figura 3).

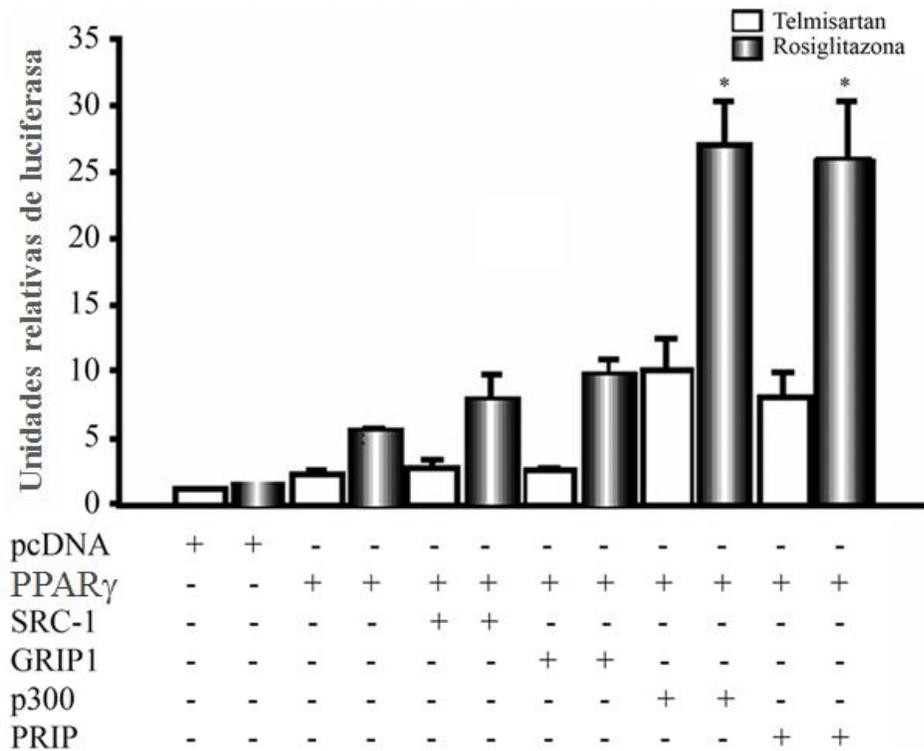
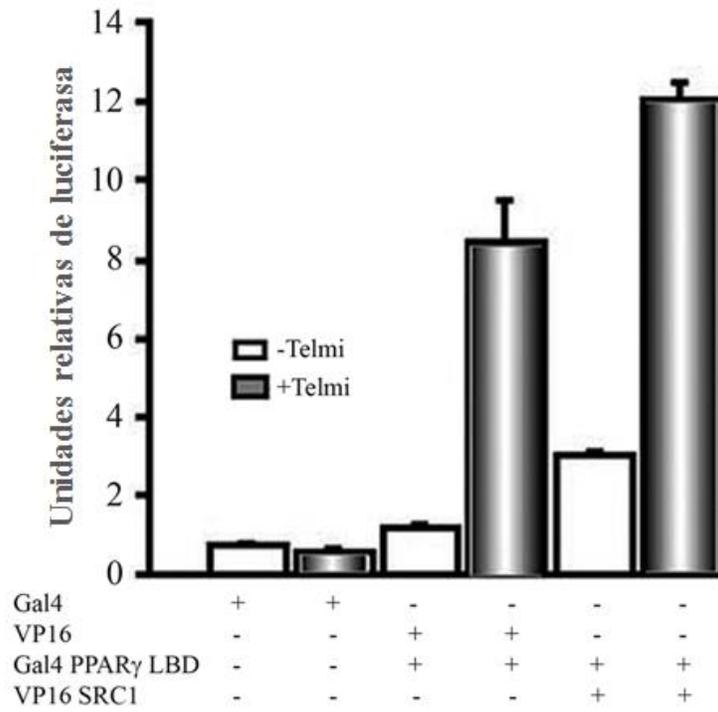


Figura 3. Activación de PPAR γ en presencia de diferentes coactivadores tras el tratamiento con telmisartán y rosiglitazona. Células U2OS fueron cotransfectadas como en la figura 1, los coactivadores estudiados (SRC-1, GRIP1, p300 y PRIP) fueron cotransfectados en presencia de telmisartán o rosiglitazona. La evaluación estadística se basó en 3 experimentos diferentes. La prueba de ANOVA fue aplicada y se consideraron diferencias estadísticamente significativas con un valor de $p \leq 0.005$.

Con el fin de evaluar una posible interacción proteína-proteína entre PPAR γ y SRC1 en presencia de telmisartán y rosiglitazona, se realizó un ensayo de doble híbrido en células de mamífero. Cuando telmisartán fue evaluado, la actividad de luciferasa incrementó 9 veces aproximadamente comparado con los niveles basales (Figura 4A). Al determinar la interacción Gal4-PPAR γ LBD junto con VP16-SRC1 se observó un leve aumento de la actividad de luciferasa (Figura 4B).

Estos datos son contrastantes a los resultados obtenidos en presencia de rosiglitazona, donde un aumento de luciferasa alcanzó casi 40 veces comparado con los niveles basales (Figura 4A), y la unión entre SRC1 y Gal4- PPAR γ LBD incrementó en más del 100% la actividad de luciferasa comparado con solo Gal4- PPAR γ LBD (Figura 4B).

A



B

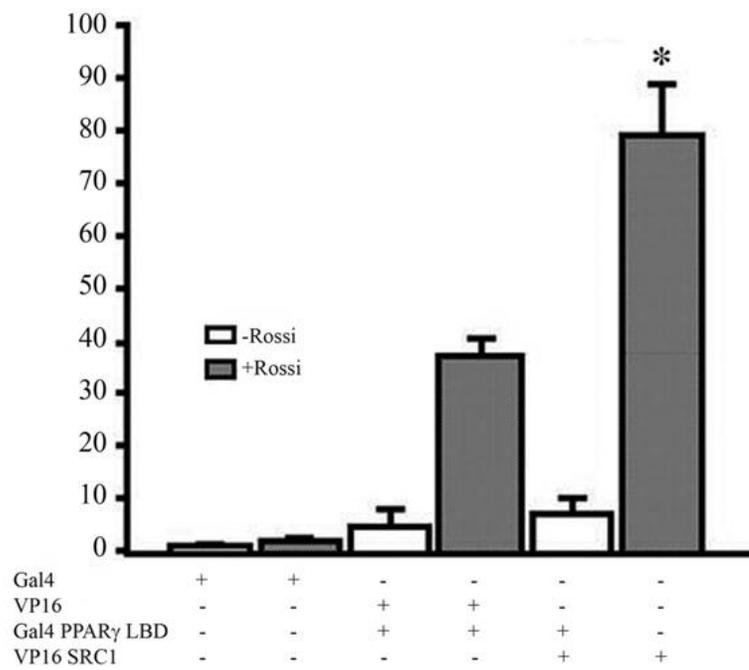


Figura 4. Evaluación de la interacción del coactivador SRC1 con PPAR γ en presencia de telmisartán o rosiglitazona. Células U2OS fueron cotransfectadas mediante la técnica de doble híbrido y la unión entre SRC1 y PPAR γ fue evaluada después del tratamiento con telmisartán o rosiglitazona. Los datos muestran el valor estándar de la media que representa 3 experimentos independientes por triplicado. Se realizó la prueba de análisis de varianza (ANOVA) y las diferencias fueron consideradas estadísticamente significativas cuando el valor de la media con error estándar fue de $p < 0.05$. Dado que en los estudios de transfección se realizó un cotransfección con β -galactosidasa, permite normalizar los datos y evita la dispersión de los resultados.

2.5 DISCUSIÓN

El uso de agonistas totales de PPAR γ como tratamiento para la obesidad y la diabetes tipo 2 generan sensibilidad a la insulina y reducción de adipocitoquinas pro-inflamatorias. Sin embargo, efectos adversos como acumulación líquida y leve aumento de peso entre otros, son desencadenados por el uso de este tipo de ligandos (9, 10). Estudios de expresión de PPAR γ tanto en modelos murinos como humanos, han sugerido que ni un agonismo ni antagonismo total de PPAR γ ofrece un óptimo tratamiento para los desórdenes metabólicos (19, 20). No obstante, la identificación de moléculas que en forma moderada activen a PPAR γ son hoy en día un importante objeto de investigación.

Los SPPARMs son un nuevo grupo de ligandos que interactúan selectivamente con cofactores, generando la activación parcial de PPAR γ y teóricamente evitando los efectos adversos asociados a los agonistas totales (21).

En estudios previos se ha demostrado que telmisartán, un antagonista específico y selectivo de los receptores de la angiotensina II (AT II), actúa como un SPPARM, permitiendo la diferenciación de las células adiposas vía parcial activación de PPAR γ (22, 23). En este estudio se muestra que telmisartán puede estimular la diferenciación de preadipocitos 3T3-L1 generando cambios tanto fenotípicos como moleculares (Fig. 2). Estos resultados sugieren además que un acoplamiento diferencial de los coactivadores podría explicar la reducción de la activación de PPAR γ mediada por este fármaco (Fig. 4).

En esta investigación, además se encontró que p300 juega un importante papel tanto en la co-activación mediada por telmisartán como por rosiglitazona. Sin embargo, en presencia de telmisartán los cofactores de la familia p160 (SRC1, GRIP1) no inducen una activación significativa de PPAR γ (Fig. 3). Es probable que estos cofactores no se acoplen a este complejo transcripcional en presencia de telmisartán. Con el objeto de profundizar en esta posibilidad se realizó un estudio de doble híbrido que permitió valorar la interacción entre estas proteínas. En este experimento se encontró un incremento del 40% de la actividad de luciferasa en relación a los niveles basales, cuando Gal4-PPAR γ -LBD y SRC1-VP16 fueron cotransfectados en presencia de telmisartán. No obstante, este mismo estudio en presencia de rosiglitazona mostró un incremento de más del 100% de la actividad de luciferasa (Fig. 4B).

Estudios estructurales han mostrado una unión menos estable de telmisartán con la hélice 12 de PPAR γ . Lo que puede ser la causa de la unión reducida de coactivadores (24). Por tal motivo, se podría proponer una interacción reducida de SRC1 a la maquinaria transcripcional, en presencia de telmisartán en contraste al tratamiento con el agonista total. Tagami et al., 2009 encontraron un reducido reclutamiento de SRC1 por PPAR γ en ensayos de doble híbrido, tras el tratamiento con telmisartán (25). Sin embargo como ellos encontraron un incremento en la transactivación de PPAR γ en presencia de GRIP1, se puede argumentar que el uso de un promotor diferente podría ser la causa de las diferencias observadas. En línea con los datos funcionales arrojados en esta investigación, se encontró que preadipocitos 3T3-L1 tratados con telmisartán muestran niveles reducidos en la acumulación de lípidos comparado con

el tratamiento con rosiglitazona que presenta alta concentración de triglicéridos, lo cual es concordante con los datos de expresión de la proteína Fabp4/aP2 cuyos niveles son reducidos por el bajo efecto de diferenciación alcanzado tras el tratamiento con telmisartán (Fig. 1B y 2).

En conclusión, el presente estudio compara los efectos funcionales y moleculares de telmisartán y rosiglitazona sobre el receptor nuclear PPAR γ . Se encontró que un reclutamiento selectivo de cofactores podría ser la explicación para la activación moderada de PPAR γ , expresión de genes y modesta acumulación de triglicéridos por parte de telmisartán. De capital importancia resulta la caracterización de sustancias que actúen como SPPARMs, puesto que de esta manera se podrían reducir los efectos de la activación total de PPAR γ y en paralelo mantener la eficacia metabólica con una moderada acción de este receptor nuclear.

2.6 BIBLIOGRAFÍA

1. Ferré P. The biology of peroxisome proliferator-activated receptors: relationship with lipid metabolism and insulin sensitivity. *Diabetes*. 2004;53 Suppl 1:S43-50.
2. Lehrke M, Lazar MA. The many faces of PPARgamma. *Cell*. 2005;123(6):993-9.
3. Shulman AI, Mangelsdorf DJ. Retinoid x receptor heterodimers in the metabolic syndrome. *N Engl J Med*. 2005;353(6):604-15.
4. Nolte RT, Wisely GB, Westin S, Cobb JE, Lambert MH, Kurokawa R, et al. Ligand binding and co-activator assembly of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. *Nature*. 1998;395(6698):137-43.
5. Bähr IN, Tretter P, Krüger J, Stark RG, Schimkus J, Unger T, et al. High-dose treatment with telmisartan induces monocytic peroxisome proliferator-activated receptor- γ target genes in patients with the metabolic syndrome. *Hypertension*. 2011;58(4):725-32.
6. Aoyagi S, Archer TK. Dynamics of coactivator recruitment and chromatin modifications during nuclear receptor mediated transcription. *Mol Cell Endocrinol*. 2008;280(1-2):1-5.
7. Rosenfeld MG, Glass CK. Coregulator codes of transcriptional regulation by nuclear receptors. *J Biol Chem*. 2001;276(40):36865-8.
8. Staels B, Fruchart JC. Therapeutic roles of peroxisome proliferator-activated receptor agonists. *Diabetes*. 2005;54(8):2460-70.

9. Guan Y, Hao C, Cha DR, Rao R, Lu W, Kohan DE, et al. Thiazolidinediones expand body fluid volume through PPAR γ stimulation of ENaC-mediated renal salt absorption. *Nat Med.* 2005;11(8):861-6.
10. Lago RM, Singh PP, Nesto RW. Congestive heart failure and cardiovascular death in patients with prediabetes and type 2 diabetes given thiazolidinediones: a meta-analysis of randomised clinical trials. *Lancet.* 2007;370(9593):1129-36.
11. Nissen SE, Wolski K. Effect of rosiglitazone on the risk of myocardial infarction and death from cardiovascular causes. *N Engl J Med.* 2007;356(24):2457-71.
12. Toyama K, Nakamura T, Kataoka K, Yasuda O, Fukuda M, Tokutomi Y, et al. Telmisartan protects against diabetic vascular complications in a mouse model of obesity and type 2 diabetes, partially through peroxisome proliferator activated receptor- γ -dependent activity. *Biochem Biophys Res Commun.* 2011;410(3):508-13.
13. Schupp M, Clemenz M, Gineste R, Witt H, Janke J, Helleboid S, et al. Molecular characterization of new selective peroxisome proliferator-activated receptor gamma modulators with angiotensin receptor blocking activity. *Diabetes.* 2005;54(12):3442-52.
14. Tontonoz P, Hu E, Graves RA, Budavari AI, Spiegelman BM. mPPAR gamma 2: tissue-specific regulator of an adipocyte enhancer. *Genes Dev.* 1994;8(10):1224-34.
15. Oñate SA, Tsai SY, Tsai MJ, O'Malley BW. Sequence and characterization of a coactivator for the steroid hormone receptor superfamily. *Science.* 1995;270(5240):1354-7.

16. Hong H, Kohli K, Trivedi A, Johnson DL, Stallcup MR. GRIP1, a novel mouse protein that serves as a transcriptional coactivator in yeast for the hormone binding domains of steroid receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93(10):4948-52.
17. Zhu Y, Kan L, Qi C, Kanwar YS, Yeldandi AV, Rao MS, et al. Isolation and characterization of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) interacting protein (PRIP) as a coactivator for PPAR. *J Biol Chem*. 2000;275(18):13510-6.
18. Takeshita A, Yen PM, Ikeda M, Cardona GR, Liu Y, Koibuchi N, et al. Thyroid hormone response elements differentially modulate the interactions of thyroid hormone receptors with two receptor binding domains in the steroid receptor coactivator-1. *J Biol Chem*. 1998;273(34):21554-62.
19. Barroso I, Gurnell M, Crowley VE, Agostini M, Schwabe JW, Soos MA, et al. Dominant negative mutations in human PPARgamma associated with severe insulin resistance, diabetes mellitus and hypertension. *Nature*. 1999;402(6764):880-3.
20. Kintscher U. And in the end--Telmisartan directly binds to PPAR γ . *Hypertens Res*. 2012;35(7):704-5.
21. Yamauchi T, Kamon J, Waki H, Murakami K, Motojima K, Komeda K, et al. The mechanisms by which both heterozygous peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) deficiency and PPARgamma agonist improve insulin resistance. *J Biol Chem*. 2001;276(44):41245-54.
22. Gelman L, Feige JN, Desvergne B. Molecular basis of selective PPARgamma modulation for the treatment of Type 2 diabetes. *Biochim Biophys Acta*. 2007;1771(8):1094-107.

23. Destro M, Cagnoni F, Dognini GP, Galimberti V, Taietti C, Cavalleri C, et al. Telmisartan: just an antihypertensive agent? A literature review. *Expert Opin Pharmacother.* 2011;12(17):2719-35.
24. Amano Y, Yamaguchi T, Ohno K, Niimi T, Orita M, Sakashita H, et al. Structural basis for telmisartan-mediated partial activation of PPAR gamma. *Hypertens Res.* 2012;35(7):715-9.
25. Tagami T, Yamamoto H, Moriyama K, Sawai K, Usui T, Shimatsu A, et al. A selective peroxisome proliferator-activated receptor-gamma modulator, telmisartan, binds to the receptor in a different fashion from thiazolidinediones. *Endocrinology.* 2009;150(2):862-70.

CAPITULO 3

EID1 INDUCE CARACTERÍSTICAS DE ADIPOCITOS “BROWN LIKE” EN PREADIPOCITOS 3T3-L1

3.1 RESUMEN

PPAR γ y pRb cumplen un papel fundamental en el desarrollo de la célula adiposa, de hecho, modificaciones funcionales de estas proteínas pueden generar cambios benéficos en la fisiología del adipocito. En este estudio se muestra que la proteína EID1 descrita en principio como un inhibidor de la diferenciación de células musculares, reduce la transactivación de PPAR γ en presencia de ligando y disminuye la acumulación de triglicéridos en preadipocitos 3T3-L1, cuando es sobre-expresada. Adicionalmente, se encontró que EID1 se asocia a pRb y reduce los niveles de esta proteína. La sobre-producción de EID1 en las células 3T3-L1 genera incremento en la expresión de las proteínas UCP1 y PGC-1 α , las cuales están involucradas en el gasto calórico y la termogénesis en el adipocito pardo. Estos datos sugieren que EID1 es capaz de reducir la acumulación de grasa en la célula adiposa y a su vez induce genes de grasa parda en preadipocitos 3T3-L1, que proviene de un linaje adipocito blanco. La reducción funcional que EID1 ejerce sobre pRb y PPAR γ en la célula adiposa, podría cumplir una función importante en la resistencia a la insulina y el síndrome metabólico.

3.2 INTRODUCCIÓN

El adipocito produce moléculas que son importantes para el balance energético y el metabolismo. La alteración funcional de la célula adiposa por el incremento en la acumulación de lípidos afecta la producción de estas moléculas, lo cual puede contribuir a las complicaciones generadas en el síndrome metabólico (1-3). La modulación en la cantidad o funcionalidad del tejido adiposo blanco, acompañado de la activación de tejido adiposo pardo que en lugar de acumular la energía en forma de triglicéridos, produce calor, podría prevenir las complicaciones de la obesidad (4). Los niveles de adipocito pardo son altos en neonatos humanos, pero van disminuyendo progresivamente en el adulto. No obstante, estudios recientes han demostrado que adultos humanos tienen la capacidad de producir grasa energéticamente más activa cuando son sometidos a bajas temperaturas, fenómeno que puede liderar nuevos enfoques terapéuticos (5-7).

La determinación de la formación de estos dos tipos de grasa no ha sido aún dilucidado, aunque se conoce que PPAR γ , miembro de la familia de receptores nucleares, ejerce un papel fundamental en el programa adipogénico para grasa blanca y parda. La acción de PPAR γ es dependiente de ligando, circunstancia que genera cambios conformacionales que le permiten aglutinar proteínas coactivadoras que poseen actividad acetilasa de histona, incluyendo miembros de la familia SRC, p300/CBP y el complejo mediador (8, 9). PGC1 α , identificado en principio como un coactivador de PPAR γ , se ha caracterizado como un regulador dominante de la biogénesis mitocondrial y las rutas que regulan el metabolismo

oxidativo (10). La expresión ectópica de PGC-1 α en células adiposas blancas lidera la activación mitocondrial y expresión de proteínas termogénicas como UCP1 (11). Por otro lado se ha propuesto que algunos agonistas sintéticos de PPAR γ pueden actuar en parte fortaleciendo el fenotipo del adipocito Pardo en Blanco (12). Por el contrario, la expresión ectópica de PPAR γ en células madre mesenquimales, induce fenotipo de adipocito blanco no pardo, lo cual pone en evidencia el papel de los co-activadores al definir las características del tejido adiposo (13). Por otro lado, se mostró que la supresión de pRb en fibroblastos de ratón y en células madre embrionarias activan características de grasa ya que presentan aumento en el número de mitocondrias y expresión elevada de UCP1, PGC-1 α y algunos genes mitocondriales (14). Consistente con estos datos, pRb muestra una unión directa a los promotores de PGC-1 α , reprimiendo su transcripción (15).

El estudio de nuevas moléculas que modulen la actividad transcripcional de PPAR γ y supriman la función de pRb, pueden ayudar a combatir la obesidad. En el presente estudio, se encontró que EID1 (16, 17) reduce la adipogénesis. EID1 fue conocido previamente por inhibir la diferenciación de células musculares, mediante el bloqueo de la actividad acetilasa de histona de p300. Lo que lideró una reducción en la transcripción de MyoD. Esta investigación analiza por primera vez el efecto de EID1 en la célula adiposa. Los resultados mostraron que EID1 disminuye la transactivación de PPAR γ en presencia de rosiglitazona. EID1 se une a pRb y reduce su expresión. Por tanto se hipotiza que el incremento relativo de PGC-1 α y UCP1 observado tras el tratamiento de EID1 en las células 3T3-L1,

puede ser debido a una reducción en los niveles de pRb, generado por EID1. En conclusión, EID1 disminuye los niveles de triglicéridos e incrementa la expresión de genes que estimulan la termogénesis en adipocitos blancos. Estos hallazgos pueden contribuir al desarrollo de estrategias terapéuticas para combatir la obesidad.

3.3 METODOLOGÍA

3.3.1 Plásmidos

El gen que codifica para PPAR γ fue clonado en el vector pSV.SPORT1 en el sitio *Sall*. PPRE-LUC fue obtenido del Dr Bruce Spiegelman (Dana Farber Institute) (8). Los vectores de expresión con EID1, EID1 Δ C y EID1 Δ C Δ 53 Δ 92 fueron generados mediante clonación en el vector pcDNA3-T7 en los sitios de restricción *BamHI* y *EcoRI*. EID1 Δ C corresponde al gen de EID1 que carece del dominio C terminal (LxCxE) a través del cual interacciona con pRb. EID1 Δ C Δ 53 Δ 92 adicional a la delección del C terminal, carece de los residuos 53-63 y 92-115 los cuales comprometen dominios acídicos que facilitan la unión a p300. El plásmido denominado EID1 pcDNA3.1/V5 codifica al gen de EID1 fusionado al epítipo V5, fue generado mediante PCR usando los siguientes cebadores: Fw 5'-CAC CAT GTC GGA AAT GGC TGA GTT-3' and Rvs 3'-CGC AAG CTT CTC TCT ATC AAT AAT CTC ATC-5'. Los productos de PCR fueron purificados y clonados a través del método de TOPO (Invitrogen).

3.3.2 Transfecciones transitorias

Las líneas celulares U2OS y 293 fueron obtenidas de ATCC y crecidas en medio DMEM suplementado con 10% de FBS y 100U/mL de penicilina y 100 μ g/mL de streptomycin, a 37°C y 5% de CO₂. Las células fueron sembradas en cajas de 12 pozos y cuando llegaron a un 70% de confluencia, se realizó la transfección transitoria usando lipofectaminaTM 2000 (Invitrogen). Las concentraciones de DNA

fueron las siguientes: el plásmido reportero PPRE-Luc (0.085 μ g/pozo), el vector que contenía a PPAR γ (0.2 μ g/pozo) y cantidades indicadas de EID1 o EID1 Δ C. La cantidad de DNA adicionada a cada pozo fue constante y compensada con el vector vacío pcDNA3.1. Como control en los ensayos de luciferasa se usó 0.5 μ g de CMV- β Gal. 24 horas después de la transfección, el medio fue cambiado por medio DMEM suplementado con 10% de FBS libre de ligandos endógenos y se adicionó la rosiglitazona a una concentración de 1 μ M la cual fue disuelta en DMSO. Como control se utilizó DMSO a una concentración final de 0.2%. 24 horas después del tratamiento con rosiglitazona se procedió al ensayo de luciferasa y β -galactosidasa, para ello las células se lavaron con PBS y se lisaron en Triton X-100. Para evaluar el efecto de EID1 en la diferenciación adipogénica, los preadipocitos 3T3-L1 fueron transfectados al 90% de confluencia en platos de 12 pozos con 1.6 μ g de EID1 en 4 μ L de lipogectamina. 48 horas después las células fueron lisadas para obtener proteínas totales y realizar los ensayos moleculares o fue inducida la diferenciación para los ensayos fenotípicos.

3.3.4 Ensayos de diferenciación adipogénica y cuantificación de triglicéridos

La línea celular 3T3-L1 fue crecida en DMEM suplementado con 10% de FBS, 100U/mL de penicilina y 100 μ g/mL de Estreptomicina. 2 días después de que las células alcanzaron la confluencia, fueron tratadas con una mezcla de diferenciación que contenía 1 μ M de dexametasona, 0.5mM de IBMX y 1 μ M de rosiglitazona. 48 horas después fue cambiado el medio y se adicionó únicamente rosiglitazona, posteriormente se cambió el medio cada 2 días hasta el día 8. La diferenciación de

los adipocitos fue observada mediante la tinción con Oil-red O para lo cual las células diferenciadas fueron lavadas y fijadas con 10% de formaldehído durante 15 min y teñidas con 0.6% (peso/volumen) de aceite rojo en 60% de isopropanol durante 2 horas a temperatura ambiente. Para la cuantificación, la monocapa teñida fue extensamente lavada para remover el exceso de colorante y 1mL de alcohol isopropílico se adicionó para desteñir los discos y luego de 5 minutos la absorbancia de las muestras se midió a 510 nanómetros mediante espectrofotometría.

3.3.5 Análisis de western blot

Las células 3T3-L1 en cultivo fueron lisadas con 100uL/pozo de buffer RIPA en presencia de inhibidores de proteasas (Roche), La mezcál fue incubada durante 45 min en hielo y centrifugada a 16.000g durante 30min. Luego 100µg de proteínas se mezclaron con igual volumen de buffer de muestras y se sometió la mezcla a 95°C durante 3 min para desnaturalizar las proteínas. Posteriormente se realizó electroforesis en gel de poliacrilamida al 8% y se transfirió el producto de en una membrana de nitrocelulosa. Para evitar uniones inespecíficas se realizó un bloqueo a la membrana en 0.5% de leche en polvo descremada diluida PBS-T durante 1 hora a temperatura ambiente. Luego de los lavados, la membrana se incubó con el anticuerpo primario respectivo a cada experimento así: Anti EID-1 (SH-18) a una dilución de 1:5 v/v. Anti PGC-1α dilución 1:1000 (Millipore AB3242), anti-pRb dilución 1:1000 (Millipore AB MAB3186) y anti UCP1 dilución 1:1000 (Millipore AB 3036). Posterior a 4 lavados con PBS-T LA membrana fue incubada durante 1 hora con los anticuerpos secundarios correspondientes conjugados con HRP así:

anticuerpo contra mouse IgG para EID1 (1:5000) y pRb (1:2000) y anticuerpo contra rabbit para PGC-1 α (1:2000) y UCP1 (1:1000). La detección se realizó por autoradiografía acorde a las instrucciones del kit ECL Western blotting Amersham. El análisis cuantitativo se realizó por densitometría en 3 experimentos independientes. Los resultados se sometieron a la prueba de análisis de varianza (ANOVA) y las diferencias fueron consideradas estadísticamente significativas cuando el valor de la media con error estándar fue de $p < 0.05$.

3.3.6 RNA de interferencia

Los oligonucleótidos sintéticos de siRNA fueron diseñados y producidos por Invitrogen. 3 distintas secuencias fueron ensayadas y el western blot determinó cuál de los oligonucleótidos utilizados fue el más eficiente al bloquear la expresión de EID1. La secuencia más eficaz fue AGA GAG CAG UGA CCU GCA GAU GGA U 3'. Las células 3T3-L1 fueron transfectadas al 70% de confluencia con 30nM de siRNA en 1.2 μ L de lipofectaminaTM RNAi MAX en cajas de 24 pozos. 48 horas luego de la transfección, las células se indujeron a diferenciación. Pasados 6 días las células fueron teñidas y los niveles de triglicéridos se cuantificaron. Las células usadas como control se transfectaron únicamente con lipofectaminaTM RNAi MAX.

Coinmunoprecipitación

Las células 3T3-L1 fueron crecidas y transfectadas en cajas de 12 pozos con el vector TOPO-EID1-V5, a través de lipofectaminaTM 2000 (4 μ L/well). 48 horas después de la transfección las células fueron lisadas con 100 μ L/pozo de buffer RIPA en

presencia de inhibidores. Los extractos fueron pre-lavados con 30 μ L de 50% de proteína A sepharosa (Invitrogen) y sometidas a centrifugación. Posteriormente, se incubaron 5 μ g/mL de proteínas con el anticuerpo anti-V5 (1:2000) de Invitrogen, durante 2 horas. Luego fue adicionado 50 μ L de 50% Proteína A sepharosa y se continuó la incubación por otras 2 horas. Las muestras fueron luego lavadas 3 veces con buffer RIPA y centrifugadas nuevamente. El precipitado conteniendo las proteínas unidas a la sepharosa se combinó con igual volumen de buffer de muestra y se realizó la electroforesis SDS-PAGE para analizar las muestras mediante western blot. Para ello se realizó transferencia a membrana de nitrocelulosa y luego de los lavados, se incubó con el anticuerpo anti pRb (Millipore) a una dilución de 1:2000. A continuación de los lavados, se adicionó el anticuerpo secundario anti ratón IgG. El revelado del ensayo se realizó acorde al método ECL de Amersham y se visualizó por autoradiografía. Como control se usó el extracto de las células transfectadas con TOPO EID1 Δ C-V5, una variante de EID1 que pierde la capacidad de unión con pRb.

3.4 RESULTADOS

3.4.1 EID1 disminuye la transactivación mediada por PPAR γ

Se ha mostrado que EID1 interfiere con la transactivación inducida por ligando de algunos receptores nucleares como TR, ER, y RAR (18-20). Para evaluar si EID1 podría modular la actividad de PPAR γ , se transfectaron transitoriamente células U2OS y 293 con plásmidos que codifican para EID1 junto con PPAR γ y un vector reportero que contiene un PPRE. EID1 no afecta la transactivación de PPAR γ en ausencia de ligando. Sin embargo, la actividad transcripcional mediada por el ligando sintético utilizado (rosiglitazona), fue significativamente reducida tras la cotransfección de EID1 (Figura1). Para investigar si la reducción de la transactivación de PPAR γ generada por EID1 era una consecuencia de la inhibición del coactivador p300, las células fueron cotransfectadas con un mutante de EID1 (EID1 Δ C Δ 53 Δ 92) que carece de los dominios acídicos y no puede unirse a p300 (16). Los resultados muestran que la activación de PPAR γ inducido por rosiglitazona no fue afectada por la presencia de este mutante.

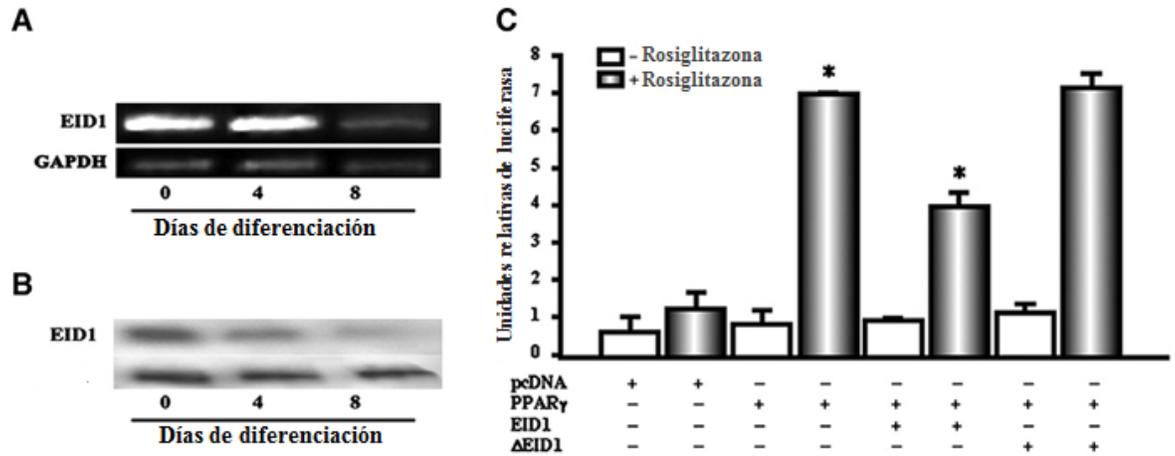


Figura 4. Evaluación de la interacción del coactivador SRC1 con PPAR γ en presencia de telmisartán o rosiglitazona. Preadipocitos 3T3-L1 fueron inducidos a diferenciación tras alcanzar el 100% de confluencia usando una mezcla de diferenciación con dexametasona, IBMX y rosiglitazona. A. Los niveles de RNA de EID1 fueron determinados mediante RT-PCR; expresión de GAPDH se usó como control; B. Estudios de western blot se utilizaron para detectar EID1 mediante un anticuerpo monoclonal contra la proteína de estudio y sus niveles se detectaron durante la adipogénesis. Niveles reducidos tanto del RNA como de la proteína se observaron a lo largo de la diferenciación (8^{vo} día); C. Se realizaron ensayos de transfecciones transitorias en las líneas celulares 293 y U2OS con un plásmido reportero PPRE que contiene elementos de respuesta para PPAR γ y vectores de expresión que codifican para PPAR γ , EID1 o los mutantes EID1 Δ C y EID1 Δ C Δ 53 Δ 92. Las células fueron lisadas 48 horas luego de la transfección y se detectaron los niveles de luciferasa y β -galactosidasa, mediante la lumiscencia

emitida por el gen reportero. Los niveles de luciferasa fueron normalizados con β -Galactosidasa. Los datos se expresan como la media \pm SE de tres experimentos independientes realizados por triplicado. El test t-Student se usó para indicar los niveles de significancia ($p < 0.05$) señalados por los asteriscos de actividad de PPAR γ en presencia de rosiglitazona en relación con PPAR γ en presencia de rosiglitazona tras la cotransfección de EID1.

3.4.2 Función de EID1 en la diferenciación de los preadipocitos 3T3-L1

Para indagar si EID1 podría tener una relevancia fisiológica en la diferenciación adipogénica, se determinó en principio, la expresión de EID1 durante la adipogénesis de los preadipocitos 3T3-L1. Luego que las células alcanzaron el 100% de confluencia, la diferenciación fue inducida como se indica en materiales y métodos, tanto pruebas de RT-PCR como análisis de western blot, mostraron que EID1 es altamente expresada al inicio de la diferenciación y su expresión va disminuyendo progresivamente a lo largo del tiempo (Fig. 1A y B).

Con estos datos se hipotiza que si EID1 afecta la transactivación de PPAR γ , este efecto puede también modificar la adipogénesis. Para comprobar esta hipótesis, se sobre-expresó EID1 en las células 3T3-L1 y 48 horas después se indujo la diferenciación, punto que se determinó como día 0. Se observó posteriormente, una reducción en los niveles de triglicéridos (Fig. 2A y B).

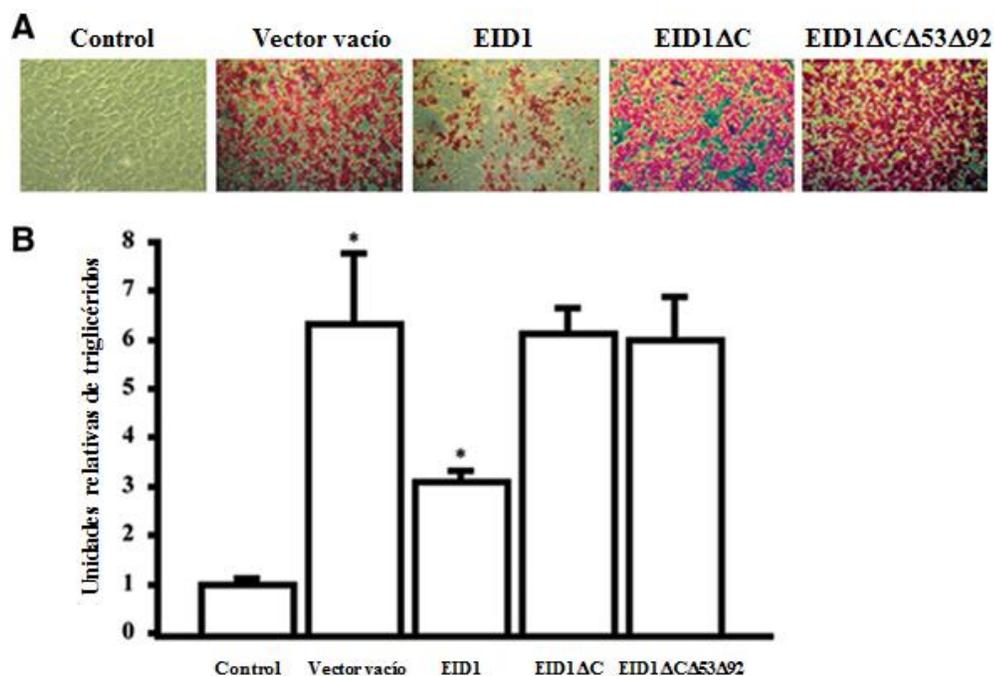


Figura 2. La sobre-expresión de *EID1* reduce la diferenciación adipogénica. Células 3T3-L1 confluentes, se transfectaron con los plásmidos que codifican para *EID1* o los mutantes *EID1ΔC* o *EID1ΔCΔ53Δ92*, usando lipofectaminaTM 2000. Luego de 48 horas, las células se indujeron a diferenciación. La tinción con el colorante Oil red-O se realizó 8 días luego de inducir la diferenciación. A. La fotografía señala la función de *EID1* en la adipogénesis. B. Los niveles intracelulares de triglicéridos se evaluaron mediante la remoción del colorante Oil red-O usando alcohol isopropílico. Las muestras fueron sometidas a análisis de espectrofotometría a una absorbancia de 510nm de longitud de onda. Los datos se expresan como la media \pm SE de tres experimentos independientes realizados por triplicado. La diferencia significativa fue de $p < 0.05$ señalado por los asteriscos de los niveles de triglicérido del vector vacío en relación al tratamiento con *EID1*.

Para investigar el papel específico de EID1 en la adipogénesis, se realizó un bloqueo de la expresión de EID1 mediante siRNA. Las células 3T3-L1 fueron transfectadas con oligonucleótidos sintéticos usando lipofectaminaTM RNAiMAX, luego de probar y escoger el oligo más eficiente en bloquear a EID1, se realizó nuevamente transfección en las 3T3-L1 y 48 horas después se indujo la diferenciación adipogénica. Los resultados mostraron que la interferencia de EID1 acelera la adipogénesis en comparación a las células utilizadas como control (Fig. 3A y B). Los niveles de triglicéridos fueron determinados mediante tinción con oil red-O (Fig. 3C).

Estos hallazgos demuestran que EID1 cumple un papel importante en la diferenciación adipogénica, ya que tanto la sobre-expresión como la inhibición de esta proteína genera un efecto contrario en la acumulación de lípidos en células 3T3-L1.

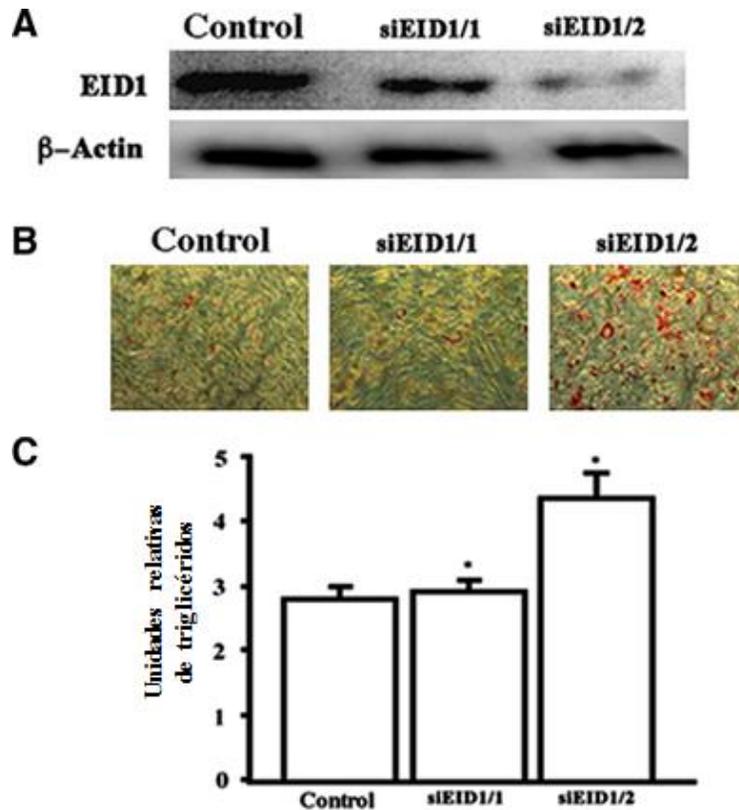


Figura 3. Bloqueo de EID1 mediante RNA de interferencia. La expresión endógena de EID1 fue inhibida mediante ensayos de transfección transitoria según las indicaciones del kit de lipofectamine™ RNAiMAX, usando 2 diferentes oligonucleótidos. A. LA reducción de la expresión de EID1 se confirmó a través de western blot. B. El efecto fenotípico del bloqueo de EID1 se evaluó 6 días luego de inducida la diferenciación adipogénica. C. los niveles de triglicéridos se cuantificaron usando tinción con Oil red-O como se describe en el experimento 2B. Los datos se expresan como la media \pm SE de tres experimentos independientes realizados por triplicado. La diferencia significativa fue de $p < 0.05$ señalado por los asteriscos de los niveles de triglicérido entre el siEID1/1 que no tiene efecto de bloqueo en comparación al siEID1/2.

3.4.3 EID1 se une a pRb y disminuye su expresión durante la diferenciación adipogénica

Resultados previos mostraron que EID1 se une a pRb en células musculares (16). Debido a que este anti-oncogén cumple igualmente una función importante en la diferenciación de los adipocitos, se analizó si EID1 podría afectar la actividad de pRb en células 3T3-L1. Para ello se sobre-expresó el vector TOPO pcDNA-EID1 unido al epítipo V5, en las células 3T3-L1 y se realizó la coimmunoprecipitación. A continuación el análisis del western blot usando un anticuerpo anti-pRb, desvelaron que EID1 y pRb se unen en el modelo utilizado. Esta interacción no se observó con las células tratadas con EID1 Δ C que carece del dominio LxCxE de unión al sitio “pocket” de pRb (Fig. 4A). Para evaluar si el efecto de unión entre pRb y EID1 afectaba los niveles de expresión de pRb durante la adipogénesis, se realizó sobre-expresión de EID1 en las células 3T3-L1 y posteriormente se aislaron las proteínas totales 48 horas pos-transfección correspondiente al día 0, luego día 2 y 4 pos-diferenciación. Los resultados arrojados presentan una significativa reducción en los niveles de pRb durante los días señalados (Fig. 4B).

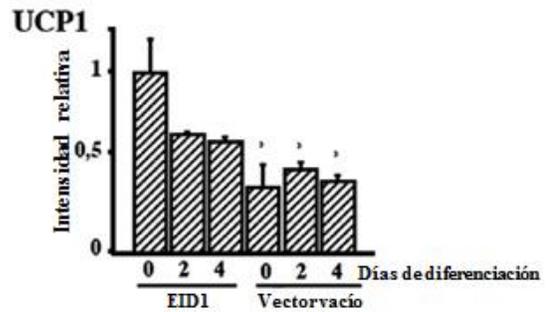
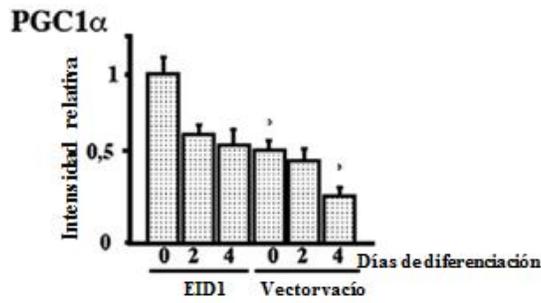
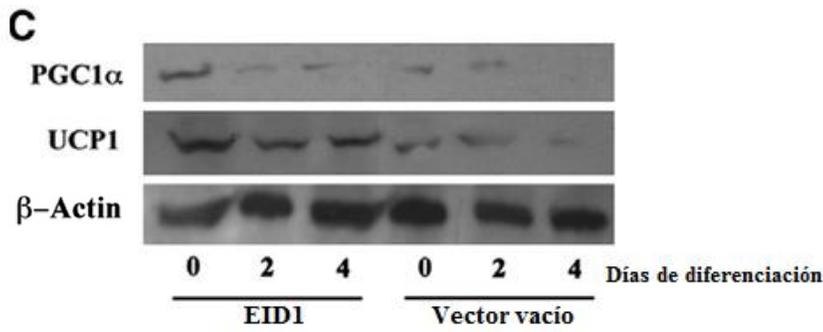
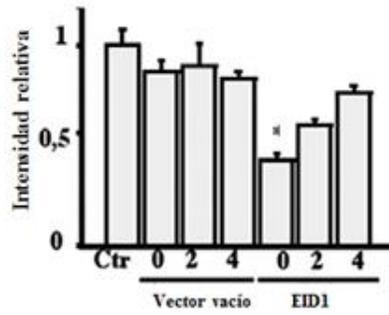
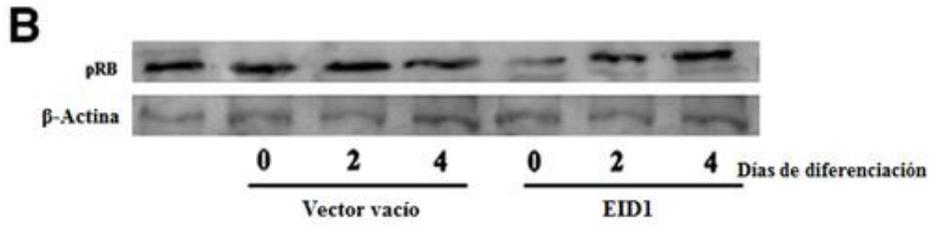
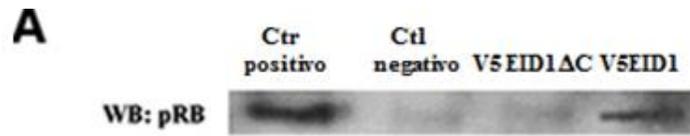


Figura 4. *EID1 se une a pRb, reduce sus niveles de expresión y a su vez activa proteínas termogénicas como PGC1 y UCP1 en las células 3T3-L1. A. Transfección de EID1 insertado en un vector de expresión unido a V5 (V5-EID1) o un vector carente del dominio C-terminal que no posee la secuencia LxCxE a través de la cual se une a pRb (V5-EID1ΔC), el ensayo se realizó mediante la técnica de lipofectaminaTM 2000. 48 horas luego de la transfección las células se lisaron, la coimmunoprecipitación se realizó con el anticuerpo anti V5 y el western blot detectó los niveles de pRb, con este ensayo se detectó la unión de EID1 con el pRb endógeno de las 3T3-L1. B. Las proteínas totales se aislaron en los días indicados (el día 0 corresponde a 48 horas luego de la transfección y a continuación se indujo la diferenciación adipogénica), El análisis cuantitativo se realizó por densitometría de las bandas detectadas por el western en 3 experimentos independientes. El control se tomó como punto de comparación que corresponde a los preadipocitos en proliferación. C. Los preadipocitos 3T3-L1 se transfectaron como se describe en la figura 2, los días indicados muestran la expresión de las proteínas UCP1 y PGC-1α (el día 0 corresponde a las 48 horas luego de realizada la transfección de EID1). El análisis cuantitativo se realizó por densitometría de las bandas detectadas en el western blot de tres experimentos independientes. Las comparaciones estadísticas se realizaron frente al día 0 transfectado con vector vacío tanto para PGC-1α como para UCP1. Los resultados se expresan como la media ± SE de tres experimentos independientes realizados por triplicado. Los*

valores de $p < 0.05$ indican diferencia significativa entre cada día señalado en presencia o ausencia de EID1.

3.4.4 EIDI induce precursores de grasa parda en preadipocitos blancos.

Existe una evidencia fuerte que implica a pRb y las proteínas “pocket” en el fenotipo adipogénico de células blancas y pardas (14). Este hecho llevó a valorar si una regulación negativa de pRb ejercida por EID1 podría inducir expresión de proteínas de grasa parda en preadipocitos 3T3-L1. Interesantemente, la sobre-expresión de EID1 generó un incremento significativo en los niveles de PGC-1 α y UCP1 durante la diferenciación temprana (día 0, 2 y 4 pos-inducción) (Fig. 4C). La transfección de EID1 se realizó justo antes de que las células alcanzaran el 100% de confluencia, el día 0 fue considerado como las 48 horas pos-transfección.

3.5 DISCUSIÓN

En este estudio, se describe por primera vez un nuevo mecanismo a través del cual la proteína EID1 podría modular el proceso adipogénico de preadipocitos blancos. EID1 reduce la acumulación de lípidos en células 3T3-L1 e incrementa la expresión de PGC-1 α y UCP1, proteínas que están implicadas en la termogénesis y se expresan en células adiposas pardas (21). EID1 reduce la diferenciación de la célula adiposa blanca, ya que disminuye la activación transcripcional del receptor nuclear PPAR γ y bloquea la actividad de pRb. Pese a que reportes previos señalan que EID1 puede regular la función de otros receptores nucleares TR, ER y GR (18, 19), su habilidad de modular la actividad de PPAR γ no había sido descrita hasta el momento. Algunos estudios indican que la represión transcripcional ejercida por EID1, está mediada por SHP (20, 22) Aunque en este estudio no se evaluó el papel de SHP sobre la acción represiva de EID1. Existen varias razones por las cuales a nivel de PPAR γ EID1 no actuaría a través de SHP. Primero aunque se ha reportado que SHP aumenta la transactivación de PPAR γ (23), un amplio estudio de expresión de genes durante la adipogénesis de preadipocitos 3T3-L1 reveló que SHP se halla entre los receptores muy poco expresados o indetectables durante este proceso en esta línea celular (24). Con esta investigación se propone que la inhibición de p300 ejercida por EID1 puede ser el efecto responsable de la reducción en la actividad de PPAR γ y por ende en la diferenciación de los preadipocitos 3T3-L1.

La expresión elevada de EID1 durante la diferenciación adipocítica temprana, indica que EID1 puede regular las fases iniciales de la adipogénesis. Investigaciones previas, han manifestado que pRb puede coordinar el destino de la célula adiposa precisamente al principio de este proceso (25). De hecho, estudios in-vitro demuestran que la inhibición de pRb en fibroblastos evita la adquisición del fenotipo adiposo. Estudios más específicos en modelos animales señalan que la deficiencia de pRb en el tejido adiposo genera características de adipocitos pardos y exhiben altos niveles de expresión de UCP1 (26). Consistente con estos reportes, células MEFs deficientes en pRb e inducidos a diferenciación en presencia de rosiglitazona pueden también expresar UCP1 a niveles similares que adipocitos pardos (25). Adicionalmente, ratones con haploinsuficiencia para pRb (RB+/-) presentan resistencia a la obesidad y hepatoesteatosis tras ser alimentados con dieta hipercalórica. De nuevo este efecto fue atribuido al incremento del metabolismo oxidativo, el cual fue causado probablemente por la inducción transcripcional de genes involucrados en el metabolismo energético semejantes a PGC-1 α , UCP1 y NRF1 (27). En el presente estudio se mostró que EID1 puede unirse y reducir los niveles de pRb durante los primeros estadios de diferenciación. EID1 contiene un dominio LxCxE en la región carboxi terminal, que le permite la unión al sitio “pocket” de pRb (16). En los experimentos realizados en este estudio, se mostró que la delección del C-terminal de EID1 (EID1 Δ C) que no se une a pRb, no afecta la adipogénesis.

En conclusión, EID1 reduce la actividad de PPAR γ a través de la reducción de la actividad de p300, alterando así el complejo coactivador. Debido a esta función, EID1 puede también cumplir un importante papel en la inhibición de la activación de PPAR γ mediada por ligandos. Adicionalmente EID1 reduce la actividad de pRb en estados tempranos de la diferenciación de adipocitos blancos e incrementa la expresión de genes que están presentes en adipocitos “brown-like”.

3.6 BIBLIOGRAFÍA

1. Spiegelman BM, Flier JS. Obesity and the regulation of energy balance. *Cell*. 2001;104(4):531-43.
2. Frühbeck G, Gómez-Ambrosi J, Muruzábal FJ, Burrell MA. The adipocyte: a model for integration of endocrine and metabolic signaling in energy metabolism regulation. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2001;280(6):E827-47.
3. Li Z, Bowerman S, Heber D. Health ramifications of the obesity epidemic. *Surg Clin North Am*. 2005;85(4):681-701, v.
4. Cannon B, Nedergaard J. Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol Rev*. 2004;84(1):277-359.
5. Cypess AM, Lehman S, Williams G, Tal I, Rodman D, Goldfine AB, et al. Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans. *N Engl J Med*. 2009;360(15):1509-17.
6. van Marken Lichtenbelt WD, Vanhommelrig JW, Smulders NM, Drossaerts JM, Kemerink GJ, Bouvy ND, et al. Cold-activated brown adipose tissue in healthy men. *N Engl J Med*. 2009;360(15):1500-8.
7. Virtanen KA, Lidell ME, Orava J, Heglind M, Westergren R, Niemi T, et al. Functional brown adipose tissue in healthy adults. *N Engl J Med*. 2009;360(15):1518-25.
8. Spiegelman BM. PPAR-gamma: adipogenic regulator and thiazolidinedione receptor. *Diabetes*. 1998;47(4):507-14.
9. Farmer SR. Transcriptional control of adipocyte formation. *Cell Metab*. 2006;4(4):263-73.

10. Puigserver P, Spiegelman BM. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1 alpha (PGC-1 alpha): transcriptional coactivator and metabolic regulator. *Endocr Rev.* 2003;24(1):78-90.
11. Handschin C, Spiegelman BM. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 coactivators, energy homeostasis, and metabolism. *Endocr Rev.* 2006;27(7):728-35.
12. Wilson-Fritch L, Nicoloso S, Chouinard M, Lazar MA, Chui PC, Leszyk J, et al. Mitochondrial remodeling in adipose tissue associated with obesity and treatment with rosiglitazone. *J Clin Invest.* 2004;114(9):1281-9.
13. Nielsen R, Pedersen TA, Hagenbeek D, Moulos P, Siersbaek R, Megens E, et al. Genome-wide profiling of PPARgamma:RXR and RNA polymerase II occupancy reveals temporal activation of distinct metabolic pathways and changes in RXR dimer composition during adipogenesis. *Genes Dev.* 2008;22(21):2953-67.
14. Hansen JB, Kristiansen K. Regulatory circuits controlling white versus brown adipocyte differentiation. *Biochem J.* 2006;398(2):153-68.
15. Scimè A, Grenier G, Huh MS, Gillespie MA, Bevilacqua L, Harper ME, et al. Rb and p107 regulate preadipocyte differentiation into white versus brown fat through repression of PGC-1alpha. *Cell Metab.* 2005;2(5):283-95.
16. Miyake S, Sellers WR, Safran M, Li X, Zhao W, Grossman SR, et al. Cells degrade a novel inhibitor of differentiation with E1A-like properties upon exiting the cell cycle. *Mol Cell Biol.* 2000;20(23):8889-902.

17. MacLellan WR, Xiao G, Abdellatif M, Schneider MD. A novel Rb- and p300-binding protein inhibits transactivation by MyoD. *Mol Cell Biol.* 2000;20(23):8903-15.
18. Båvner A, Johansson L, Toresson G, Gustafsson JA, Treuter E. A transcriptional inhibitor targeted by the atypical orphan nuclear receptor SHP. *EMBO Rep.* 2002;3(5):478-84.
19. Diana Vargas LC, Carolina Romero and Fernando Lizcano. Modulation of thyroid hormone receptor transactivation by the early region 1A (E1A)-like inhibitor of differentiation 1 *Genetics and Molecular Biology.* 2008;32(2):6.
20. Macchiarulo A, Rizzo G, Costantino G, Fiorucci S, Pellicciari R. Unveiling hidden features of orphan nuclear receptors: the case of the small heterodimer partner (SHP). *J Mol Graph Model.* 2006;24(5):362-72.
21. Farmer SR. Molecular determinants of brown adipocyte formation and function. *Genes Dev.* 2008;22(10):1269-75.
22. Hallenborg P, Feddersen S, Madsen L, Kristiansen K. The tumor suppressors pRB and p53 as regulators of adipocyte differentiation and function. *Expert Opin Ther Targets.* 2009;13(2):235-46.
23. Nishizawa H, Yamagata K, Shimomura I, Takahashi M, Kuriyama H, Kishida K, et al. Small heterodimer partner, an orphan nuclear receptor, augments peroxisome proliferator-activated receptor gamma transactivation. *J Biol Chem.* 2002;277(2):1586-92.
24. Fu M, Sun T, Bookout AL, Downes M, Yu RT, Evans RM, et al. A Nuclear Receptor Atlas: 3T3-L1 adipogenesis. *Mol Endocrinol.* 2005;19(10):2437-50.

25. Hansen JB, Jørgensen C, Petersen RK, Hallenborg P, De Matteis R, Bøye HA, et al. Retinoblastoma protein functions as a molecular switch determining white versus brown adipocyte differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(12):4112-7.
26. Dali-Youcef N, Matakı C, Coste A, Messaddeq N, Giroud S, Blanc S, et al. Adipose tissue-specific inactivation of the retinoblastoma protein protects against diabetes because of increased energy expenditure. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(25):10703-8.
27. Mercader J, Ribot J, Murano I, Feddersen S, Cinti S, Madsen L, et al. Haploinsufficiency of the retinoblastoma protein gene reduces diet-induced obesity, insulin resistance, and hepatosteatosis in mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2009;297(1):E184-93.

CAPITULO 4

EID1 ESTIMULA EL FENOTIPO ADIPOCÍTICO BEIGE EN ADMSCs

OBTENIDAS DE TEJIDO HUMANO

4.1 RESUMEN

El incremento de la acumulación de triglicéridos en tejido adiposo blanco, genera obesidad y aumenta el riesgo cardiovascular. No obstante, las células adiposas blancas podrían ser inducidas a mayor gasto calórico mediante el aumento de reguladores que actúan en la célula adiposa parda. El presente trabajo destaca el papel de EID1 en el proceso de diferenciación del adipocito en las células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo subcutáneo humano. La actividad de EID1 en parte reduce la activación del receptor nuclear PPAR γ por bloquear la acción del coactivador p300 y PRIP, así como la reducción del papel de pRB en la diferenciación celular. En las ADMSC se encontró que la sobre-expresión de EID1 disminuye la acumulación de lípidos luego de inducir diferenciación adipogénica, adicionalmente EID1 activa proteínas como UCP1, PGC-1 α y TFAM comprometidas en el gasto calórico, lo cual es característico de células “brown-like” (beige). EID1 se une e inhibe la proteína pRb, la cual cumple una función importante en el destino de la célula adiposa. En conclusión, EID1 reduce los niveles de triglicéridos en la diferenciación de las ADMSCs y genera características del fenotipo adipocítico beige. Por tanto la acción de EID1 en la adipogénesis podría ser un blanco terapéutico promisorio para el tratamiento de la obesidad.

4.2 INTRODUCCIÓN

En los últimos años el conocimiento de moléculas o compuestos que activen la pérdida de peso ha aumentado sustancialmente, debido precisamente al incremento acelerado de la obesidad y del riesgo de adquirir enfermedades crónicas como hipertensión arterial, diabetes y algunos tipos de cáncer (1-3). Desde el punto de vista terapéutico, las características funcionales de tejido adiposo pardo, el cual metaboliza los lípidos para producir calor a través de la expresión de UCP1, podría ser activado en tejido adiposo blanco (4) para aumentar el gasto calórico y por tanto generar reducción de peso (5, 6). Estudios recientes han mostrado que el clásico adipocito pardo proviene de precursores musculares Myf5 positivos (5). Sin embargo, el adipocito blanco puede ser inducido a una forma intermedia con morfología multilocular que expresa UCP1 pero que no deriva del linaje clásico de adipocito pardo, estos son conocidos como adipocitos “brown fat -like” o “beige” negativos para Myf5 (7, 8). Tanto PPAR γ como pRb tienen un papel clave en la diferenciación de la célula adiposa (9, 10). PPAR γ es un receptor nuclear que actúa como regulador central del fenotipo adipogénico. En presencia de ligando, PPAR γ captura proteínas coactivadoras con función acetilasa de histona los cuales incluyen a SRC1 y p300/CBP (11, 12). SRC1 promueve el gasto calórico por activar la oxidación de ácidos grasos, de hecho, ratones SRC1 $^{-/-}$ están predispuestos a obesidad por disminuir el gasto calórico y presentar baja expresión de UCP1 (13, 14). Por su parte, la inactivación de p300 /CBP, disminuye la adipogénesis por afectar la expresión de genes blanco de PPAR γ como aP2, indispensables en la adquisición del fenotipo

maduro del adipocito (15). Ratones CBP +/- presentan reducción del volumen de adipocito blanco, asociado a la poca acumulación de triglicéridos. Sin embargo, no presenta fenotipo de pardo (16). Así mismo, pRb es considerada como determinante en la adquisición del fenotipo del adipocito. La inhibición en la actividad de pRb incrementa la expresión de UCP1 y PGC-1 α (17, 18). Estudios en modelos murinos demostraron que la inactivación de pRb en tejido adiposo aumenta la actividad mitocondrial y genera resistencia a la obesidad (10). Adicionalmente, pRb está involucrado en la vía de diferenciación de osteoblastos y adipocitos en células madre mesenquimales (19). En este modelo, se describió que la ausencia de pRb dirige el linaje hacia preadipocitos, posterior a la sobre-expresión de pRb, las células pueden adquirir fenotipo de adipocitos blancos. En contraste, la continua ausencia de pRb resulta en el desarrollo de células “brown-like” (20).

En la búsqueda de moléculas que logran tener un efecto modulador del proceso adipogénico, en esta investigación se encontró que EID1 podría ser un candidato posible. Debido a su caracterización inicial en otros modelos de diferenciación (21, 22). Posteriormente, nuestro grupo de investigación caracterizó el papel de EID1 en preadipocitos 3T3-L1, encontrando que su sobre-expresión disminuye los niveles de pRb y a su vez activa la expresión de proteínas características de “brown-like” como UCP1 y PGC-1 α , en estas células de linaje adipocítico blanco (23). En el presente estudio se profundizó en el efecto de EID1 en células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo humano, obtenidas a partir de muestras de grasa subcutánea de mujeres sanas.

4.3 METODOLOGÍA

4.3.1 Muestras de tejido adiposo

Las muestras fueron obtenidas de 20 pacientes mujeres, con edad entre los 20 y 40 años, que se sometieron a abdominoplastia. Las pacientes presentaron un IMC entre 23 y 25kg/m². Adicionalmente las donantes no estaban bajo ningún tratamiento con fármacos durante los 3 meses anteriores a la toma de la muestra, por tanto no presentaron ningún tipo de enfermedad. El perfil lipídico y el metabolismo de carbohidratos, presentó valores normales. Las pacientes recibieron información detallada acerca del objetivo del estudio y firmaron el consentimiento informado. El proyecto fue aprobado por el comité de ética de la Universidad de La Sabana.

4.3.2 Plásmidos y transfecciones transitorias

PPAR γ fue clonado en el sitio *Sall* del vector pSV.SPORT1 y PPRE- Luc y Gal4-PPAR γ LBD fueron obtenidos de Bruce Spiegelman de Dana Farber Cancer Center, Boston (24). EID1 fue clonado en el vector de expresión pcDNA3-T7 en los sitios de restricción *BamHI* and *EcoRI*. EID1 Δ es un mutante que carece tanto del dominio C-terminal (LxCxE) que le permite unirse a pRb, como de los residuos ácidos 53-63 y 92-115 que facilitan la unión con p300 (21). En cuanto a los coactivadores, el inserto que codifica para p300 se encuentra en los sitios *NotI* y *HindIII* del vector CMV-NHA. En cuanto al reportero 5XUAS fue clonado en los sitios de restricción *BamHI* y *HindIII* del vector pT109, el cual posee el promotor TK acoplado a luciferasa (25).

La sobre-expresión de EID1 se realizó usando lipofectamina LTX (Invitrogen) acorde a las recomendaciones del fabricante en cajas de 24 pozos. 48 horas después de la transfección, fue inducida la diferenciación, contando como día 0. Los ensayos funcionales de actividad de luciferasa se realizaron en la línea celular U2OS. Las células se transfectaron al 80% de confluencia, mediante lipofectamina™ 2000 (Life Technologies, Carlsbad, CA) con 0.85µg de PPRE-Luc, 0.5µg de CMV-βGalactosidasa y 0.1µg de PPAR, 0.2µg de EID-1 y 0.1µg de cada uno de los co-activadores. 24 horas después de la transfección las células fueron tratadas con 1µM de rosiglitazona en DMSO como vehículo. Pasadas 24 horas, las células se lisaron y se midieron tanto la actividad de luciferasa como la β-Galactosidasa. Los resultados se calcularon acorde a los cambios en la activación de la luciferasa en comparación con el vector de expresión vacío que se utilizó como control. Los resultados expresan la SEM (standard error of the mean) y representan un mínimo de 3 experimentos independientes realizado por triplicado.

4.3.3 Cultivos celulares

Células U2OS se obtuvieron de ATCC, fueron crecidas en medio DMEM suplementado con FBS 10%, penicilina/estreptomina 1%, mantenidas a 37°C y 5% de CO₂. Los cultivos primarios fueron realizados a partir de 40g de tejido adiposo subcutáneo abdominal, obtenido durante la cirugía. Las muestras de grasa fueron lavadas con PBS y removido todo material fibroso y vasos sanguíneos visibles. Posteriormente fue digerida con 250 U/mL de colagenasa tipo I, 20 mg/mL de

albumina sérica bovina y 60ug/mL de gentamicina en PBS durante 90 minutos a 37°C en agitación. Después de la digestión las muestras fueron centrifugadas a 200g durante 10 minutos y el pellet se resuspendió en una solución de lisis de eritrocitos compuesta por 154mM (cloruro de amonio), 5.7mM (fosfato monobásico de potasio) y 0.1mM de EDTA pH 7.3 durante 10 min. Esta mezcla fue filtrada en una malla de nylon con poro de 150um, seguido de una centrifugación a 200g durante 10 min. Luego el sedimento celular fue resuspendido en medio de proliferación compuesto por DMEM/F12 más 10% de suero bovino fetal y gentamicina a una densidad de 10000 células/cm². Pasadas 24 horas, las células adheridas fueron lavadas y proliferadas en medio PM4 (DMEM/F12, 2.5% FBS, 1ng/mL de factor de crecimiento básico de fibroblastos, 10ng/mL de factor de crecimiento epidérmico, 8.7 uM de insulina) (26) hasta la confluencia para luego ser sometidas a diferenciación hacia adipocitos maduros.

4.3.4 Diferenciación y cuantificación de triglicéridos

Las células mesenquimales humanas se diferenciaron hacia adipocitos, utilizando una mezcla con 66nM de insulina, 1nM de triiodo-L-tironina 10ug/mL de transferrina, 0.5mM de IBMX, 100nM de dexametasona y 1uM de rosiglitazona en medio DMEM/F12 durante 72 horas. Posteriormente, el medio se cambió por medio basal de preadipocitos conteniendo iguales concentraciones de insulina, triiodo-L-tironina y transferrina únicamente durante 15 días, se realizó cambio de medio cada 3 días. La diferenciación de los adipocitos se observó mediante tinción con Oil red-O fijando

previamente las células maduras con formaldehído 10% en PBS durante 15 min a 37°C, luego se adicionó la solución de aceite rojo en isopropanol durante 2 horas a temperatura ambiente. Posteriormente se retiró y se lavó con abundante agua para eliminar residuos de colorante. Para cuantificar triglicéridos, se adicionó 1mL de isopropanol a los depósitos de grasa durante 5 min. La absorbancia fue medida a 510nm de longitud de onda y determinados los valores relativos de triglicéridos.

4.3.5 RNA de interferencia

Los oligonucleótidos sintéticos de siRNA fueron diseñados y producidos por Invitrogen. 3 distintas secuencias fueron ensayadas y el western blot determinó cuál de los oligonucleótidos utilizados fue el más eficiente al bloquear la expresión de EID1. La secuencia más eficaz fue AGA GAG CAG UGA CCU GCA GAU GGA U 3'. Las células primarias fueron transfectadas al 70% de confluencia con 30nM de siRNA en 1.2µL de lipofectaminaTM RNAi MAX en cajas de 24 pozos. 48 horas luego de la transfección, las células se indujeron a diferenciación. Pasados 6 días se aislaron las proteínas totales para someterlas a pruebas de western blot y detectar niveles de PGC-1α, TFAM y UCP1.

4.3.6 Análisis de western blot

La extracción de proteínas totales de las ADMSCs humanas en cultivo, se tomaron 48 horas después de la transfección de EID1 lo que corresponde al día 0. Posteriormente se obtuvieron extractos durante los días 3 y 6 después de la inducción de la diferenciación. La obtención de las proteínas totales se realizó con buffer RIPA en presencia de inhibidores de proteasas (Roche), luego se cuantificaron a través del método Bradford para trabajar con una concentración de 100ug de proteínas. Después se realizó la desnaturalización a 95°C para someter los extractos a electroforesis en gel de poliacrilamida. Posteriormente se realizó la transferencia del producto de electroforesis en una membrana de PVDF previamente tratada con 100% de metanol durante 2 min. Para el bloqueo, se usó PBS-T y leche descremada en polvo al 5%. Luego se incubó con los respectivos anticuerpos: conejo anti PGC-1 α , dilución 1:1000 (Millipore AB3242), rabbit anti TFAM dilution 1:1000 (Cell signaling 7495), goat anti UCP-1 dilución 1:2000 (Santacruz sc6529) y mouse anti pRb dilución 1:2000 (Millipore AB MAB3168). Anticuerpos secundarios contra rabbit IgG PGC-1 α y TFAM a una dilución de 1:2000 and 1:3000 respectivamente. Además, se adicionaron: goat IgG UCP1 y mouse pRb a una dilución de 1:2000. La detección se realizó por autoradiografía acorde a las instrucciones del kit ECL Western (Amersham). El análisis cuantitativo se realizó por densitometría en 3 experimentos independientes. Los resultados se sometieron a la prueba de análisis de varianza (ANOVA) y las diferencias fueron consideradas estadísticamente significativas cuando el valor de la media con error estándar fue de $p < 0.05$.

4.3.7 Citometría de flujo

5×10^5 células (ADMSCs) se transfectaron con los plásmidos indicados, posteriormente se incubaron con el anticuerpo anti-CD137-PE (1:100, clone4B4-1, BD Biosciences) o el anticuerpo monoclonal usada como isotipo control (mouse IgG1), durante 20 min en cuarto oscuro. Después de realizar 2 lavadas con PBS, las muestras fueron sometidas a lectura en citómetro de flujo FACSCanto y se analizaron con el programa FlowJo (Treestar).

4.4 RESULTADOS

4.4.1 EID1 disminuye la transactivación de PPAR γ a través de coactivadores

Estudios anteriores han reportado que EID1 modula la transactivación de varios receptores nucleares como PPAR γ , receptor tiroideo y receptor de estrógenos, entre otros (27, 28). Para determinar si EID1 podría ejercer esta acción represiva sobre PPAR γ , células U2OS fueron transitoriamente transfectadas con los plásmidos Gal4-PPAR γ -LBD que posee solo el dominio de unión al ligando, junto con EID1 y el gen reportero 5XUAS el cual posee los elementos de respuesta para Gal4 unidos a luciferasa. Tras el tratamiento con rosiglitazona, el reportero mostró una alta estimulación como era de esperarse (Figura 1A). La sobre-expresión de EID1 lideró una marcada disminución de la actividad del promotor en más de un 50% de ligando (Fig. 1A). Con el fin de comprobar la acción de EID1 sobre los coactivador, células U2OS fueron transfectadas en presencia de los coactivadores SRC-1, p300 y PRIP junto con PPAR γ y el promotor PPRE asociado a Luc. Se encontró que la actividad del luciferasa aumento 6 veces cuando PPAR γ fue cotransfectado en presencia del ligando. Además se observó que los diferentes coactivadores estudiados aumentaron aún más la actividad del promotor PPRE pero PRIP y p300 tienen un efecto superior a 20 veces la activación de PPAR γ en presencia de rosiglitazona (Fig. 1B). En forma interesante se observó que al sobre-expresar EID1 los coactivadores presentaron diferentes niveles de activación de luciferasa. Así, mientras SRC1 no fue afectado por la presencia de EID1, p300 y PRIP disminuyeron significativamente la actividad

del promotor regulado por PPAR γ , indicando un papel distinto de EID1 sobre los coactivadores estudiados.

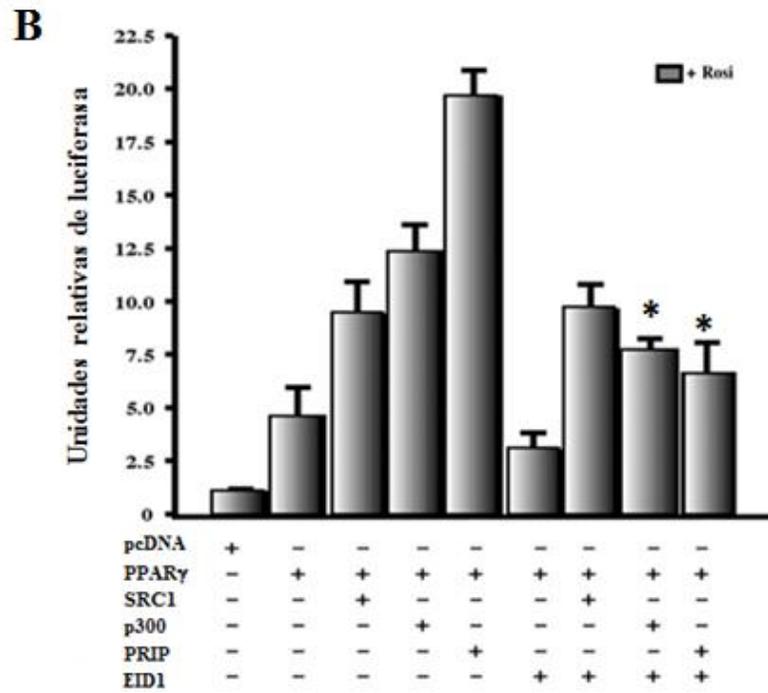
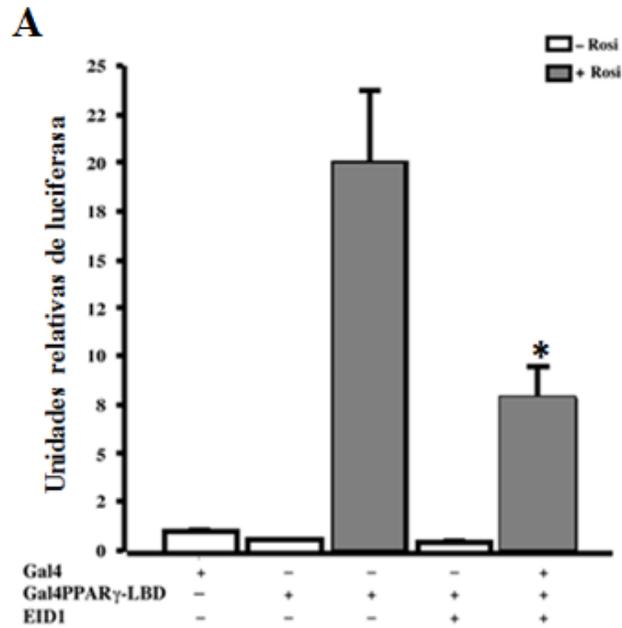


Figura 1. *EID1* reduce la transactivación de PPAR γ y modula la actividad de coactivadores. A. El plásmido que codifica para Gal4-PPAR γ -LBD (ligand binding domain) (0.1 μ g) fue cotransfectado con el plásmido que contiene el gen reportero 5X-UAS (0.85 μ g), *EID1* (0.2 μ g) y el plásmido control CMV- β galactosidasa (0.5 μ g). Las células fueron tratadas en presencia o ausencia de rosiglitazona en DMSO y luego de 24 horas se realizó lectura de la actividad de luciferasa. B. Las células U2OS fueron cotransfectadas con el plásmido de expresión que codifica para PPRE-Luc, *EID1* (0.2 μ g) y 0.1 μ g de cada coactivador. Las células fueron tratadas con 1 μ M de rosiglitazona y pasadas 24 horas se realizó la lectura de luciferasa. La luciferasa se normalizó con β -galactosidasa, la activación basal refleja una unidad de actividad de luciferasa, que se obtuvo mediante la transfección del vector vacío en presencia o ausencia de ligando. Cada barra representa tres experimentos independientes realizados por triplicado. El test-t de student se realizó para hallar las diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) como lo indican los asteriscos.

4.2 La sobre-expresión de EID1 modula la diferenciación adipogénica de las ADMSCs

En estudios iniciales, se reportó que EID1 disminuye la acumulación de triglicéridos en preadipocitos de ratón 3T3-L1 (23), para profundizar en el papel fisiológico de EID1 a nivel de adipogénesis, se valoró su acción en células ADMSCs aisladas de tejido adiposo de mujeres sometidas a abdominoplastia. EID1 fue sobre-expresada mediante transfección transitoria en las ADMSCs, 48 horas después se aislaron las proteínas totales correspondientes al día 0 y luego se indujo diferenciación para tomar muestra de los días 3 y 6 de diferenciación. Se observó una reducción significativa en los niveles de triglicéridos de las células tratadas con EID1, cuyos valores fueron de $P < 0.05$ (Figuras 2A y 2B).

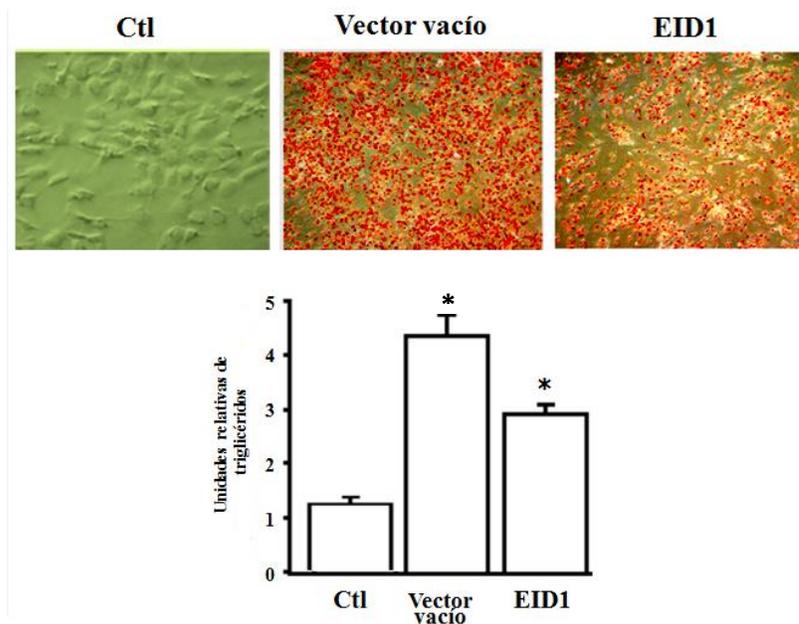


Figura 2. La sobre-expresión de EID1 reduce la acumulación de lípidos en ADMSCs. Las células obtenidas a partir de tejido adiposo subcutáneo humano, se transfectaron con 0.2ug de EID1 por pozo y 48 horas después de la transfección lo cual correspondiente al día 0, se indujo la diferenciación y 10 días después se realizó la tinción con oil red-O y la cuantificación de triglicéridos. Los datos expresan \pm SD (standard deviation) de 3 experimentos independientes realizado por triplicado El test-t de student se realizó para hallar las diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre los niveles de triglicéridos del vector vacío y EID1 como lo indican los asteriscos.

4.4.3 EID1 induce características de células “brown-like” en las ADMSC.

En vista de la amplia evidencia que demuestra que la regulación negativa de pRb en la adipogénesis activa genes involucrados en el gasto calórico (10, 29, 30), además de los hallazgos previos del grupo de investigación, donde se reportó que EID1 antagoniza a pRb durante la diferenciación de preadipocitos 3T3-L1, se valoró la posibilidad que la regulación negativa de EID1 sobre pRb en células ADMSCs podría inducir características de células “brown-like” luego de inducir la diferenciación diferenciadas (Fig. 3A). Para ello se realizó un procedimiento similar al realizado en células 3T3-L1 donde se sobre-expresó EID1 en estas células primarias y 48 horas después se indujo diferenciación. Se aislaron las proteínas totales de los días 0, 3 y 6. Los análisis de western blot, interesantemente mostraron que la sobre-expresión de EID1 lideró el aumento de UCP1, PGC-1 α y un marcador mitocondrial como lo es TFAM, proteínas características del fenotipo adipocítico pardo (Figura 3B). Además estas células tratadas con EID1 muestran en su membrana, expresan CD137 (Fig. 3C), recientemente identificado como un marcador de la identidad de los adipocitos beige (8).

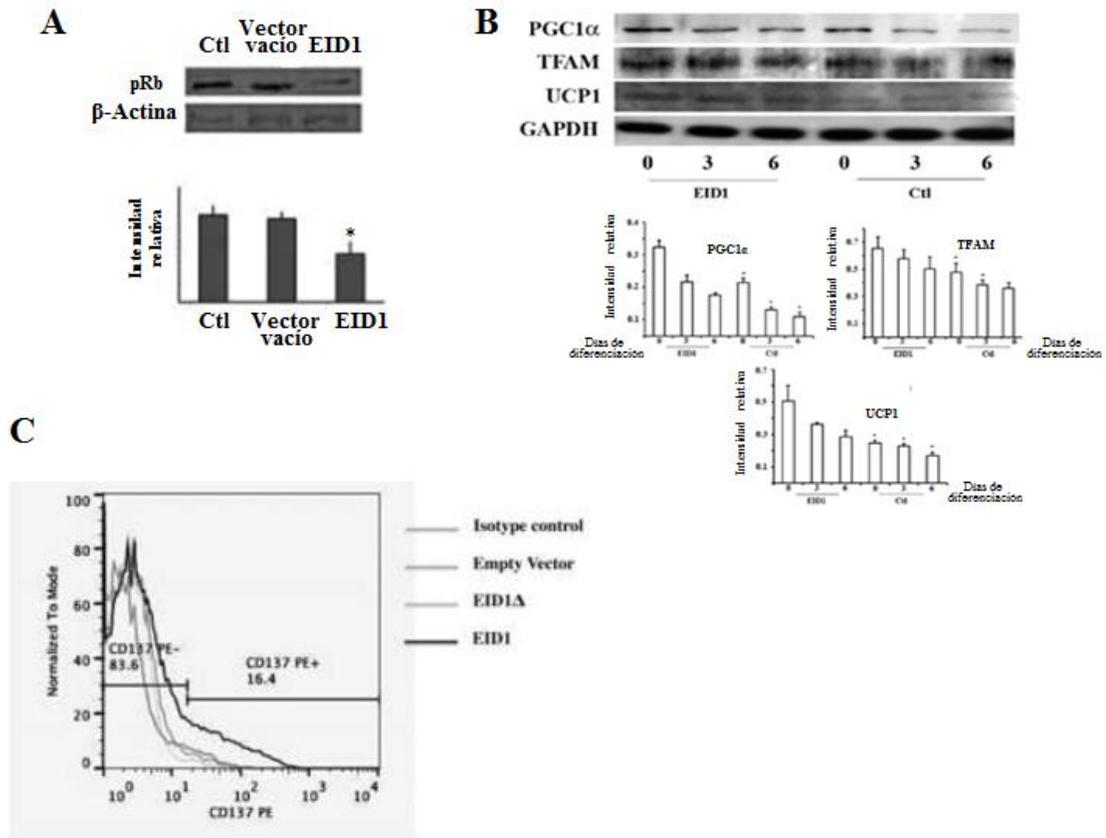


Figura 3. EID1 reduce la expresión de pRb e incrementa los niveles de proteínas termogénica en ADMSC. A. Se realizó sobre-expresión de EID1 en las ADMSCs, 48 horas después se aislaron las proteínas totales del día 0 y se midieron los niveles de pRb mediante western blot. Los análisis cuantitativos se realizaron por densitometría de las bandas, para los diferentes experimentos. El punto de comparación utilizado como control correspondió a preadipocitos antes de inducir la diferenciación. B. Las ADMSCs, se transfectaron como se indica en la figura 2 y se midieron los niveles de expresión de PGC-1 α , TFAM y UCP1 durante los días indicados (48 horas después de la transfección, momento en el cual se indujo la adipogénesis, se consideró día 0) mediante western blot. Los datos expresan \pm SD de 3 experimentos independientes

realizados por triplicado y los valores de $p < 0.05$ indican la diferencia significativa en relación a cada día y la presencia o ausencia de EID1 para las proteínas detectadas en el western (PGC-1 α , TFAM y UCPI). C. CD137 se expresa en las ADMSCs. Las células primarias se transfectaron con los plásmidos que codifican para para EID1 y EID1 Δ . El histograma muestra el porcentaje de células que expresan CD137 dado el tratamiento de EID1.

Para investigar el papel específico de EID1 en la adipogénesis de las ADMSCs, se realizó un bloqueo de la expresión de EID1 mediante siRNA. Las células primarias fueron transfectadas con los oligonucleótidos sintéticos de siRNA, usando lipofectaminaTM RNAiMAX, 48 horas después de la transfección se realizó el western blot para determinar si el bloqueo de EID1 podría modular la expresión de las proteínas termogénicas evaluadas. Se observó que la reducción de los niveles de EID1 estuvo acompañada de la disminución en la expresión de TFAM y PGC-1 α (Fig. 4).

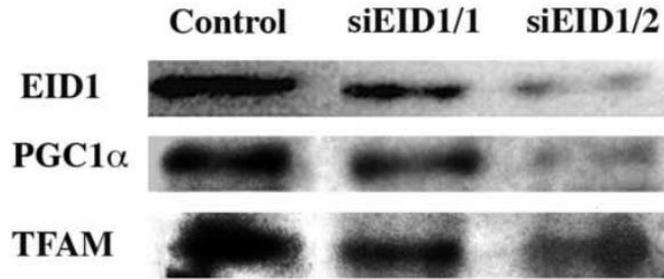


Figura 4. El bloqueo de EID1 mediante siRNA reduce la expresión de proteínas termogénicas. La expresión endógena de EID1 se inhibió a través de la transfección de un oligonucleótido de siRNA contra EID1, en las células ADMSCs usando lipofectaminaTM RNAiMAX. El efecto de la inhibición de EID1 fué evaluado 6 días luego de inducir la diferenciación, a través de análisis de western blot para detectar los niveles de PGC1a y TFAM.

4.5 DISCUSIÓN

En el presente trabajo se observó un efecto inhibitor de la adipogénesis mediado por EID1 sobre las células ADMSC, aisladas a partir de muestras de grasa subcutánea humana abdominal. Concomitante con la reducción del contenido de lípidos, se observó un aumento de la expresión de proteínas reguladoras de termogénesis UCP1, TFAM y PGC-1 α . EID1 fue descrito inicialmente como inhibidor de la diferenciación de células musculares (21) y recientemente nosotros describimos una acción similar en el proceso de adipogénesis en los preadipocitos 3T3-L1 (23). La reducción en el contenido de triglicéridos, junto con la expresión de proteínas características del linaje adipocítico pardo y la positiva detección del marcador CD137, detectado luego de la inducción de la adipogénesis, sugiere que las células moduladas con EID1 adquieren el fenotipo “brown-like”. Consistente con los estudios funcionales, se observó que EID1 disminuye la actividad de PPAR γ probablemente a través de la inhibición de p300 y del PRIP contrario a lo observado con SRC1 el cual no se ve modulado por la incorporación de EID1. El efecto diferencial de EID1 sobre SRC1 favorece un incremento en la actividad termogénica que puede aumentar la actividad de PGC-1 α (31). Por el contrario la inhibición de p300 podría tener un efecto importante en la función del adipocito observada en este estudio (32). El bloqueo de p300 genera supresión de marcadores adipogénicos como aP2 y LPL (15). Aunque p300 induce una reducción en el contenido de lípidos, esto no causa transdiferenciación hacia el linaje adipocítico pardo. Por tanto la diferenciación inducida por EID1 hacia el linaje beige podría implicar la inhibición de la actividad

de pRb, proteína que cumple un papel fundamental en el proceso de diferenciación de las células madre mesenquimales (20). Varios grupos han demostrado que la inhibición de pRb previene la obesidad e induce aumento en el gasto calórico. Nuestro grupo ha observado que EID1 se une e inhibe a pRb en células 3T3-L1 (23). Adicionalmente, un incremento en la acetilación de pRb mediada por p300, causa un aumento en la función de pRb en cuanto a la diferenciación del adipocito blanco (33). También es posible que el efecto de pRb podría estar relacionado con la modulación en la actividad de PGC-1 α , dado que pRb se une a los promotores de PGC-1 α e impide su expresión (34, 35). Aquí se hipotiza que la inhibición directa de la actividad de pRb generada por EID1, sumado al efecto indirecto a través de la inhibición de la actividad acetilasa que p300 ejerce sobre pRb, contribuye a reducir la función de pRb y desencadena la transdiferenciación hacia adipocito beige.

Cada vez es más claro que el tejido pardo clásico proviene del dermomiótoma, sin embargo existe un grupo de células denominadas “brown fat-like” que no emergen del linaje muscular y son positivas para UCP1 (35). Estos descubrimientos sugieren que puede haber otras células humanas que mediante la modulación de su fenotipo, induzcan características que generen un mayor gasto calórico (5, 7, 8), como es el caso de las células mesenquimales inmersas en tejido adiposo subcutáneo blanco (específicamente las ADMSCs). Debido al papel de pRb en la regulación entre el fenotipo osteogénico y adipogénico, puesto que una constante inactivación de esta proteína en células precursoras mesenquimales induce adipocitos pardos, con los datos señalados en este estudio se puede inferir que la inhibición de pRb tiene una

acción fundamental en el proceso de transdiferenciación (19, 30). No obstante, no se puede descartar que una variación en la actividad de los coactivadores, mediada por EID1 pueda estar también involucrada en este proceso.

En conclusión, se sugieren dos posibles vías de acción de EID1. El primer modelo implica la modulación de PPAR γ vía inhibición de p300 generando bloqueo de la diferenciación de la adipogénesis. El segundo modelo involucra la modulación de la diferenciación temprana de las ADMSCs vía inhibición de pRb, lo cual le permite adquirir fenotipo de células “brown-like” mediante la activación de proteínas involucradas en el gasto calórico. Por tanto el mecanismo fisiológico y molecular de EID1 puede servir como modelo para la generación de nuevos blancos terapéuticos en el tratamiento de la obesidad.

4.6 BIBLIOGRAFÍA

1. Cleland SJ. Cardiovascular risk in double diabetes mellitus--when two worlds collide. *Nat Rev Endocrinol.* 2012;8(8):476-85.
2. Hursting SD. Minireview: the year in obesity and cancer. *Mol Endocrinol.* 2012;26(12):1961-6.
3. Smith U. PTEN--linking metabolism, cell growth, and cancer. *N Engl J Med.* 2012;367(11):1061-3.
4. Teperino R, Amann S, Bayer M, McGee SL, Loipetzberger A, Connor T, et al. Hedgehog partial agonism drives Warburg-like metabolism in muscle and brown fat. *Cell.* 2012;151(2):414-26.
5. Enerbäck S. The origins of brown adipose tissue. *N Engl J Med.* 2009;360(19):2021-3.
6. Fedorenko A, Lishko PV, Kirichok Y. Mechanism of fatty-acid-dependent UCP1 uncoupling in brown fat mitochondria. *Cell.* 2012;151(2):400-13.
7. Ishibashi J, Seale P. Medicine. Beige can be slimming. *Science.* 2010;328(5982):1113-4.
8. Wu J, Boström P, Sparks LM, Ye L, Choi JH, Giang AH, et al. Beige adipocytes are a distinct type of thermogenic fat cell in mouse and human. *Cell.* 2012;150(2):366-76.
9. Billon N, Dani C. Developmental origins of the adipocyte lineage: new insights from genetics and genomics studies. *Stem Cell Rev.* 2012;8(1):55-66.

10. Dali-Youcef N, Mataki C, Coste A, Messaddeq N, Giroud S, Blanc S, et al. Adipose tissue-specific inactivation of the retinoblastoma protein protects against diabetes because of increased energy expenditure. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(25):10703-8.
11. Amano Y, Yamaguchi T, Ohno K, Niimi T, Orita M, Sakashita H, et al. Structural basis for telmisartan-mediated partial activation of PPAR gamma. *Hypertens Res*. 2012;35(7):715-9.
12. Tagami T, Yamamoto H, Moriyama K, Sawai K, Usui T, Shimatsu A, et al. A selective peroxisome proliferator-activated receptor-gamma modulator, telmisartan, binds to the receptor in a different fashion from thiazolidinediones. *Endocrinology*. 2009;150(2):862-70.
13. Duteil D, Chambon C, Ali F, Malivindi R, Zoll J, Kato S, et al. The transcriptional coregulators TIF2 and SRC-1 regulate energy homeostasis by modulating mitochondrial respiration in skeletal muscles. *Cell Metab*. 2010;12(5):496-508.
14. Picard F, Géhin M, Annicotte J, Rocchi S, Champy MF, O'Malley BW, et al. SRC-1 and TIF2 control energy balance between white and brown adipose tissues. *Cell*. 2002;111(7):931-41.
15. Takahashi N, Kawada T, Yamamoto T, Goto T, Taimatsu A, Aoki N, et al. Overexpression and ribozyme-mediated targeting of transcriptional coactivators CREB-binding protein and p300 revealed their indispensable roles in adipocyte differentiation through the regulation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *J Biol Chem*. 2002;277(19):16906-12.

16. Steger DJ, Grant GR, Schupp M, Tomaru T, Lefterova MI, Schug J, et al. Propagation of adipogenic signals through an epigenomic transition state. *Genes Dev.* 2010;24(10):1035-44.
17. Hallenborg P, Feddersen S, Madsen L, Kristiansen K. The tumor suppressors pRB and p53 as regulators of adipocyte differentiation and function. *Expert Opin Ther Targets.* 2009;13(2):235-46.
18. Mercader J, Ribot J, Murano I, Feddersen S, Cinti S, Madsen L, et al. Haploinsufficiency of the retinoblastoma protein gene reduces diet-induced obesity, insulin resistance, and hepatosteatosis in mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2009;297(1):E184-93.
19. Gündüz V, Kong E, Bryan CD, Hinds PW. Loss of the retinoblastoma tumor suppressor protein in murine calvaria facilitates immortalization of osteoblast-adipocyte bipotent progenitor cells characterized by low expression of N-cadherin. *Mol Cell Biol.* 2012;32(13):2561-9.
20. Calo E, Quintero-Estades JA, Danielian PS, Nedelcu S, Berman SD, Lees JA. Rb regulates fate choice and lineage commitment in vivo. *Nature.* 2010;466(7310):1110-4.
21. Miyake S, Sellers WR, Safran M, Li X, Zhao W, Grossman SR, et al. Cells degrade a novel inhibitor of differentiation with E1A-like properties upon exiting the cell cycle. *Mol Cell Biol.* 2000;20(23):8889-902.
22. MacLellan WR, Xiao G, Abdellatif M, Schneider MD. A novel Rb- and p300-binding protein inhibits transactivation by MyoD. *Mol Cell Biol.* 2000;20(23):8903-15.

23. Lizcano F, Vargas D. EID1-induces brown-like adipocyte traits in white 3T3-L1 pre-adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010;398(2):160-5.
24. Spiegelman BM. PPAR-gamma: adipogenic regulator and thiazolidinedione receptor. *Diabetes.* 1998;47(4):507-14.
25. Takeshita A, Cardona GR, Koibuchi N, Suen CS, Chin WW. TRAM-1, A novel 160-kDa thyroid hormone receptor activator molecule, exhibits distinct properties from steroid receptor coactivator-1. *J Biol Chem.* 1997;272(44):27629-34.
26. Skurk T, Ecklebe S, Hauner H. A novel technique to propagate primary human preadipocytes without loss of differentiation capacity. *Obesity (Silver Spring).* 2007;15(12):2925-31.
27. Macchiarulo A, Rizzo G, Costantino G, Fiorucci S, Pellicciari R. Unveiling hidden features of orphan nuclear receptors: the case of the small heterodimer partner (SHP). *J Mol Graph Model.* 2006;24(5):362-72.
28. Park YY, Park KC, Shong M, Lee SJ, Lee YH, Choi HS. EID-1 interacts with orphan nuclear receptor SF-1 and represses its transactivation. *Mol Cells.* 2007;24(3):372-7.
29. Hansen JB, Jørgensen C, Petersen RK, Hallenborg P, De Matteis R, Bøye HA, et al. Retinoblastoma protein functions as a molecular switch determining white versus brown adipocyte differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101(12):4112-7.
30. Khidr L, Chen PL. RB, the conductor that orchestrates life, death and differentiation. *Oncogene.* 2006;25(38):5210-9.

31. Louet JF, O'Malley BW. Coregulators in adipogenesis: what could we learn from the SRC (p160) coactivator family? *Cell Cycle*. 2007;6(20):2448-52.
32. Qi C, Surapureddi S, Zhu YJ, Yu S, Kashireddy P, Rao MS, et al. Transcriptional coactivator PRIP, the peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma)-interacting protein, is required for PPARgamma-mediated adipogenesis. *J Biol Chem*. 2003;278(28):25281-4.
33. Nguyen DX, Baglia LA, Huang SM, Baker CM, McCance DJ. Acetylation regulates the differentiation-specific functions of the retinoblastoma protein. *EMBO J*. 2004;23(7):1609-18.
34. Scimè A, Grenier G, Huh MS, Gillespie MA, Bevilacqua L, Harper ME, et al. Rb and p107 regulate preadipocyte differentiation into white versus brown fat through repression of PGC-1alpha. *Cell Metab*. 2005;2(5):283-95.
35. Wu J, Cohen P, Spiegelman BM. Adaptive thermogenesis in adipocytes: is beige the new brown? *Genes Dev*. 2013;27(3):234-50.

5. CONCLUSIONES

- La modulación de la actividad transcripcional de PPAR γ producida por diferentes ligandos puede promover un efecto diferencial en la inducción de la activación de algunos genes del adipocito.
- El efecto diferenciador de la activación transcripcional de PPAR γ ejercida por diferentes ligandos depende en parte de la acumulación diferencial de coactivadores probablemente por cambios conformacionales en la estructura de PPAR γ .
- La proteína EID1 modifica la expresión génica mediada por PPAR γ debido a una reducción de la actividad de cofactores transcripcionales especialmente el coactivador p300.
- EID1 afecta el fenotipo de las células adiposas provenientes de líneas celulares de ratón y preadipocitos originarios de células estaminales de tejido graso humano subcutáneo.
- La reducción de la acumulación de lípidos en los adipocitos tratados con EID1 puede ser consecuencia de una transdiferenciación de las células adiposas blancas.
- La reducción de la actividad de la proteína pRb efectuada por EID1 puede producir un aumento de la actividad termogénicas de las células 3T3-L1 y preadipocitos provenientes de grasa subcutánea de adultos sanos manifiesto por mayor expresión de proteínas UCP1, PGC-1 α y TFAM.

- EID1 puede producir células adipocíticas beige al ser sobre-expresada en las células subcutáneas de preadipocitos humanos identificados por marcadores de superficie.
- La acción de EID1 es un recurso prometedor para reducir la grasa en los adipocitos por su efecto en la regulación de la termogénesis y el gasto calórico.

6. PERSPECTIVAS

- Los experimentos in vitro demostraron un efecto regulador de la actividad de las células adiposas blancas ejercido por EID1 que tanto fenotípicamente como en la regulación molecular pueden ser de gran utilidad para la terapia de la obesidad.
- A pesar de los interesantes hallazgos descritos en los capítulos 3 y 4, la generación de un modelo in vivo mediante la realización de un transgén de EID1 que se exprese solo en tejido adiposo, puede ser un avance importante en los estudios preclínicos que determinarían el efecto fisiológico de EID1 en un entorno multiorgánico. La construcción del transgen constituido por el promotor del gen aP2, unido corriente abajo a EID1 y los ensayos de expresión de la molécula realizados en adipocitos maduros 3T3-L1, se constituye en un paso inicial para dar continuidad a este proyecto de investigación (Anexo 1).
- La producción de células beige a través de terapia génica con adenovirus que puedan incorporarse a la célula adiposa blanca y sólo expresen EID1 en el entorno de estas células es una consideración para el desarrollo de fármacos para obesidad.
- Estudios ulteriores deben valorar si al cambiar el fenotipo de las células adiposas blancas mediante EID1 puede permitir que estas células reduzcan la resistencia a la insulina y ser importante para la terapia de trastornos metabólicos como la diabetes tipo 2.

- Es importante estudiar la producción de adipocitoquinas con el cambio fenotípico inducido por EID1, debido a que muchas de las alteraciones de la obesidad son realizadas por el efecto que producen estas sustancias en el sistema cardiovascular, sistema nervioso central, el control de la saciedad y hambre en el hipotálamo e hipófisis y la producción hepática de lípidos y glucosa.

7. PRODUCCIÓN CIENTÍFICA

7.1 Publicaciones científicas

- Lizcano F, Vargas D. EID1-induces brown-like adipocyte traits in white 3T3-L1 pre-adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010;398(2):160-5.
- Lizcano F, Vargas D. Diverse coactivator recruitment through differential PPARnuclear receptor agonism *Genet. Mol. Biol.* 2013;36(1):134-9.
- Vargas D, Castellanos A, Martinez I, Rosales W, Lizcano F. EID1 stimulates the formation of human beige adipocytes from ADMSCs. (En evaluación).

7.2 Participaciones en congresos

- Vargas D, Lizcano F. "Moculación del adipocito como blanco terapéutico para la obesidad". VIII Congreso Colombiano de Obesidad. ". Octubre 26 y 27 de 2012. Bogotá-Colombia.
- Vargas D, Lizcano F. "EID1 estimula características de adipocitos beige en células mesenquimales aisladas de tejido adiposo humano". IX Congreso Colombiano de Obesidad. Agosto 8-10 de 2013. Bogotá-Colombia.
- Lizcano F, Vargas D. "Human Beige Adipocyte is stimulated by EID1 from ADMSC cells". ENDO 2013: The Endocrine Society 95th Annual Meeting. Junio 15-18 de 2013. San Francisco-USA.

ANEXO 1

**GENERACIÓN DEL TRANSGEN DE EID1 (aP2-EID1) PARA
DESARROLLO Y EVALUACIÓN FUTURA DE UN RATÓN TRANSGÉNICO
DE EID1**

INTRODUCCIÓN

Teniendo en cuenta los datos obtenidos anteriormente por el grupo, donde EID1 moduló la célula adipocítica blanca, se planteó un paso adicional en la profundización del conocimiento de la acción de EID1, con miras al futuro desarrollo de un ratón modificado genéticamente capaz de expresar EID1 específicamente en el tejido adiposo. Para ello, en primera instancia, se desarrolló una construcción transgénica que constó de dos componentes esenciales: el gen estructural (EID1) unido corriente arriba a un elemento regulador del gen aP2 que es estimulado específicamente en tejido adiposo. Luego de obtener el transgen, fue probada su expresión en células adiposas 3T3-L1, en este punto se tomaron los preadipocitos y fueron inducidos a diferenciación, posteriormente fue transfectado el transgen (aP2-EID1) de tal modo que las células maduras al expresar factores de transcripción específicos que estimularan el promotor aP2, indujeran como consecuencia la expresión de EID1

METODOLOGÍA

Este estudio involucró el desarrollo del transgen con herramientas de bioinformática e ingeniería genética, cultivo y diferenciación de células adiposas y expresión de proteínas.

Para el desarrollo del transgen, se obtuvo muestra de DNA genómico de ratón con el fin de amplificar y aislar el promotor de aP2 a partir de PCR (Figura 1), posteriormente, el producto fue purificado, clonado, transformado en E. Coli y enviado a secuenciación.

La secuencia WPRE que aumenta la eficiencia de expresión en la expresión de genes, se cortó e insertó en el vector pCX destinado para la generación del transgen (Figura 2A).

En cuanto a EID1, fue amplificado por PCR, luego fue purificado, clonado en el vector pCX, transformado en E.Coli y enviado a secuenciación (Figura 2B).

El último paso consistió en insertar el promotor aP2 corriente arriba de EID1, en el vector pCX (Figura 2C).

Cultivos celulares y diferenciación: Para determinar la funcionalidad del transgen, preadipocitos 3T3-L1 fueron inducidos a diferenciación y transfectados 3 días después con el transgen (aP2-EID1), utilizando lipofectamina (Figura 3A)

-Expresión del transgen: 48 horas después de la transfección del transgen, se aislaron proteínas totales y se detectó la expresión de EID1 a través de western blot.

Luego de comprobar la expresión de la proteína de estudio, el transgen fue enviado para microinyección de 200 oocitos y posterior obtención del modelo transgénico (Figura 3B).

RESULTADOS

El transgen realizado posee las secuencias específicas del promotor y de la molécula de estudio. Las Figuras 1, 2A, 2B y 2C muestran el producto del gen correspondiente a cada una de las etapas requeridas para obtener el transgen. Adicionalmente los resultados de western blot en las células 3T3-L1 diferenciadas (Figura 3A y 3B) muestran un incremento en la expresión de EID1 por estímulo del promotor aP2 en estas células diferenciadas, incluso a niveles similares de las células tratadas con el control positivo. Por último se cortó y purificó la secuencia completa (aP2-EID1) para ser enviada a la compañía que realizará la microinyección del gen en los oocitos fertilizados y posteriormente serán implantados en ratonas de la cepa C57BL/6, para la generación del ratón transgénico de EID1 con el promotor específico de aP2.

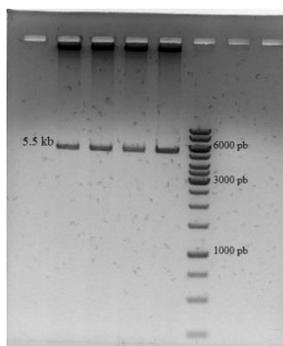


Figura 1. Obtención del DNA genómico de ratón a partir de tejido distal de la cola. Realización de la PCR con cebadores específicos para el promotor del gen *ap2* y producto amplificado que corresponde a 5,4kb del tamaño del promotor.

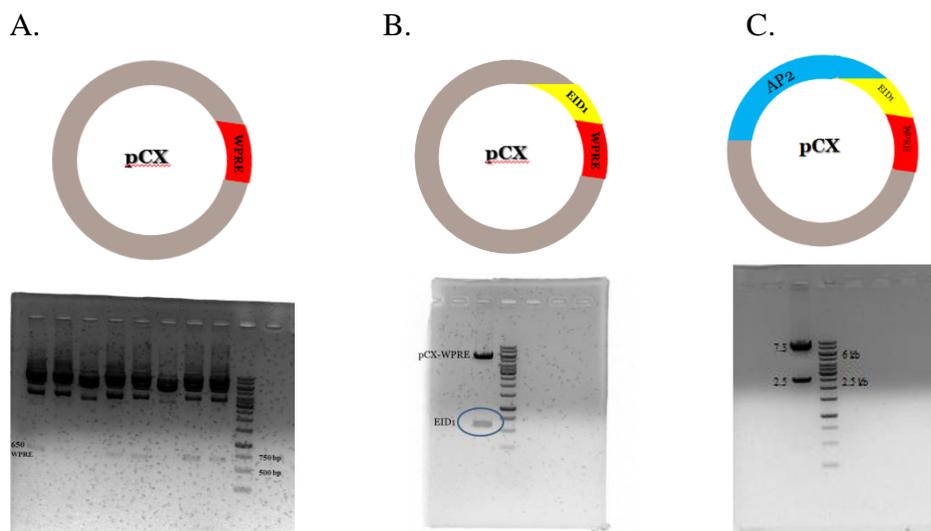


Figura 2. Ligación de cada uno de los segmentos que hacen parte de la construcción genética. A. Clonación de la secuencia WPRE en el vector pCX y producto obtenido luego del aislamiento de la secuencia WPRE (650pb). B. Clonación de la secuencia del gen *EID1* corriente arriba de WPRE en el vector pCX y producto amplificado de

EID1 (570pb), clonado en pCX y digerido con enzimas de restricción para comprobar su adecuada inserción en el vector. C. Clonación del promotor del gen *aP2* corriente arriba de *EID1* y producto correspondiente a la digestión con enzimas de restricción del transgen completo (7300pb) y el vector pCX (2500pb).

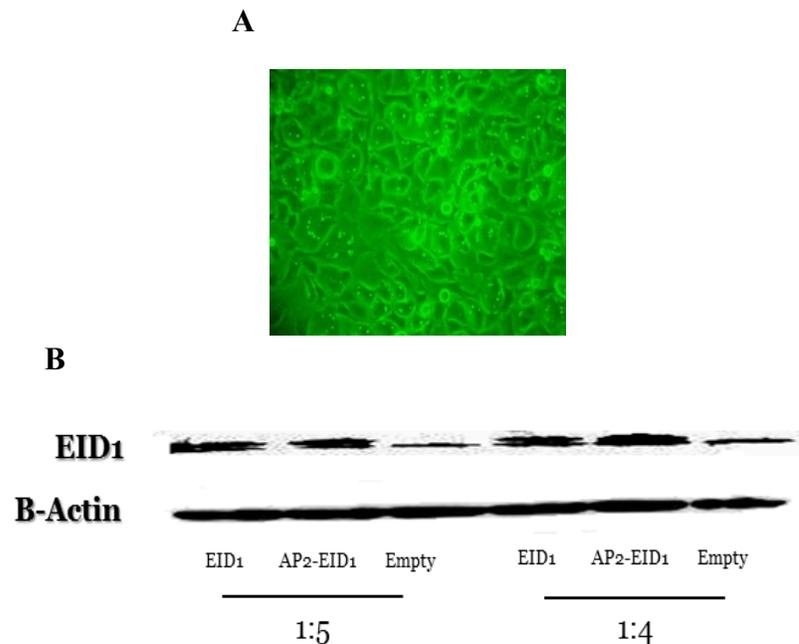


Figura 3. Expresión de *EID1* por estimulación del promotor *aP2* en adipocitos maduros 3T3-L1. A. Células 3T3-L1 fueron inducidas a diferenciación y cuando presentaron gotas de lípidos como señal de maduración, se transfectaron con el transgen. B. 48 horas después de la transfección, fueron aisladas las proteínas totales y se midieron los niveles de *EID1* por western blot. Como control positivo se sobre-expresó un vector con *EID1* y para medir los niveles endógenos se realizó transfección con un vector vacío. Se utilizaron 2 relaciones de vector lipofectamina 1:5 y 1:4

CONCLUSIONES

El efecto de EID1 en la adipogénesis de células de ratón y humanas, nos ha permitido profundizar en la investigación de moléculas capaces de activar el gasto calórico. En este sentido, el desarrollo de investigaciones que generen conocimiento a partir del uso de animales transgénicos, se convierte en un paso imprescindible para avances en investigación traslacional. Por tal motivo, el hecho que el transgen generado sea capaz de expresar EID1 por activación de un promotor específico de tejido adiposo, es un importante logro inicial en el entendimiento y posible función de esta molécula en el modelo animal, y un acercamiento en el desarrollo de nuevas terapias para combatir la obesidad.

ANEXO 2
PRODUCCIÓN CIENTÍFICA



Contents lists available at ScienceDirect

Biochemical and Biophysical Research Communications

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ybbrc

EID1-induces brown-like adipocyte traits in white 3T3-L1 pre-adipocytes

Fernando Lizcano *, Diana Vargas

Center of Biomedical Research (CIBUS), School of Medicine, La Sabana University, Chía, Colombia

ARTICLE INFO

Article history:

Received 31 May 2010

Available online 10 June 2010

Keywords:

Adipocyte

EID1

PPAR γ

pRB

Differentiation

UCP1

ABSTRACT

PPAR γ and pRB play an important role in the development of adipose cells, and functional modification of these proteins may lead to beneficial changes in adipose cell physiology. In the present work, we show that over-expression of EID1 (E1A-like inhibitor of differentiation), an inhibitor of muscle cell differentiation, reduces PPAR γ ligand-dependent transactivation and decreases triglyceride stores in pre-adipocytes (3T3-L1 cells). Additionally, we found that EID1 binds to pRB at the onset of adipocyte differentiation and may act to reduce pRB levels. Over-expression of EID1 in 3T3-L1 cells leads to increased expression of UCP1 and PGC-1 α , both of which are involved in caloric dissipation and thermogenesis, in brown adipose tissue. These results indicate that EID1 is able to reduce fat accumulation in adipose cells and induce expression of brown fat genes in pre-adipocytes (3T3-L1 cells) normally destined to become white fat cells. The functional reduction of PPAR γ and pRB mediated by EID1 in adipose cells may play an important role in insulin resistance and the metabolic syndrome.

© 2010 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Adipocytes contribute to complications that arise from the metabolic syndrome by releasing various substances that are involved in insulin resistance and atherosclerosis [1–3]. A reduction in the amount or function of WAT (white adipose tissue) along with greater proliferation of BAT (brown adipose tissue), which increases caloric production, might preclude some of the complications induced by obesity [4]. BAT levels are high in human neonates but progressively decrease in adults. However, recent work has shown that BAT is expressed in adults in a temperature-sensitive manner, a phenomenon that may lead to novel therapeutic applications [5–7].

PPAR γ (peroxisome proliferator-activated receptor-gamma), a member of the nuclear hormone receptor superfamily, plays a central role in the differentiation of both WAT and BAT. Binding of ligands to PPAR γ triggers conformational changes that allow it to interact with transcriptional co-activators, including members of the p160 steroid receptor co-activator (SRC) family, the p300/CBP complex and the Mediator complex [8,9]. PGC-1 α (PPAR γ co-activator 1 alpha), identified originally as PPAR γ co-activator [10], has emerged as a dominant regulator of mitochondrial biogenesis and oxidative metabolic pathways in many cell types by virtue of its function as a co-activator of various transcription

factors. Ectopic expression of PGC-1 α in white fat cells leads to the induction of mitochondrial and thermogenic genes including UCP1 (uncoupling protein 1) [11]. Some PPAR γ agonists are thought to function, at least in part, by enhancing a brown adipose phenotype in WAT [12]. However, ectopic expression of PPAR γ in mesenchymal cells induces white, not brown, fat cells, providing evidence for the role of co-activators in defining adipocyte traits [13]. Adipocytes from retinoblastoma protein (pRB)-deficient fibroblasts or embryonic stem cells exhibit a brown fat phenotype with high mitochondrial content and elevated expression of UCP1, PGC-1 α and mitochondrial genes [14]. Interestingly, pRB has been shown to directly bind the PGC-1 α promoter and repress its transcription [15].

New compounds that modulate PPAR γ transcriptional activity and suppress pRB function may help prevent obesity; in the present study, we found that EID1 [16,17] reduces adipogenesis. EID1 was previously known to inhibit muscle cell differentiation by blocking the histone acetylase activity of p300, leading to a reduction in MyoD transcription. In the present study, we analyzed for the first time the effect of EID1 on adipose cells. We observed that EID1 decreases rosiglitazone-stimulated transactivation by PPAR γ . EID1 also binds to pRB at the onset of adipocyte differentiation, thereby reducing pRB levels. We argue that the relative abundance of PGC-1 α and UCP1 observed when EID1 is over-expressed in 3T3-L1 cells may be due to a reduction in the level of pRB. In conclusion, EID1 reduces accumulation of triglycerides and increases expression of genes that stimulate caloric production in WAT. These findings may aid in the development of potential therapeutic strategies to counter obesity.

* Corresponding author. Address: Center of Biomedical Research (CIBUS), School of Medicine, Campus del Puente del Común de la Universidad de La Sabana, La Sabana University, Chía, Colombia. Fax: +57 1 861 5555x2623.

E-mail address: fernando.lizcano@unisabana.edu.co (F. Lizcano).



Diverse coactivator recruitment through differential PPAR γ nuclear receptor agonism

Fernando Lizcano and Diana Vargas

Biomedical Research Center, Universidad de La Sabana, Chía, Colombia.

Abstract

The PPAR γ nuclear receptor regulates the expression of genes involved in lipid and carbohydrate metabolism, and it has protective effects in some patients with type 2 diabetes. Nevertheless, the therapeutic value of the PPAR γ nuclear receptor protein is limited due to the secondary effects of some PPAR γ ligands. Because the downstream effects of PPAR γ are determined by the binding of specific cofactors that are mediated by ligand-induced conformational changes, we evaluated the differential effects of various ligands on the binding of certain cofactors associated with PPAR γ . The ligands used were rosiglitazone for treating type 2 diabetes and telmisartan for treating arterial hypertension. Functional, phenotypic, and molecular studies were conducted on pre-adipocyte 3T3-L1 and functional studies in U2OS cells. The moderating influence of various cofactor families was evaluated using transient transfection assays. Our findings confirm that telmisartan has a partial modulating effect on PPAR γ activity compared to rosiglitazone. The cofactors SRC1 and GRIP1 mediate the activity of telmisartan and rosiglitazone and partially determine the difference in their effects. Studying the modulating activity of these cofactors can provide interesting insights for developing new therapeutic approaches for certain metabolic diseases.

Keywords: DNA binding proteins co-activator, gene expression, transcription, telmisartan.

Received: June 26, 2012; Accepted: October 4, 2012.

Introduction

PPAR γ (peroxisome proliferator-activated receptor-gamma) is a transcription factor and a member of the nuclear receptor protein family, which regulates gene expression via binding at concrete DNA sites known as PPAR γ response elements (PPREs). The role of PPAR γ includes regulating carbohydrate and lipid metabolism and cellular differentiation processes (Ferre 2004; Lehrke and Lazar, 2005; Shulman and Mangelsdorf, 2005). At the structural level, PPAR γ has several functional domains. The ligand binding domain (LBD) at the C-terminus modulates the receptor's structural conformation, thus permitting the capture of transcriptional cofactors that assist in reactions required to induce greater transcription of specific genes (Nolte *et al.*, 1998; Bähr *et al.*, 2011). These cofactors may act through direct changes in the structural conformation of chromatin, as is the case with the p160 family of steroid receptors (SRC) and the p300 (E1A-associated 300-kDa binding protein)/CBP (cyclic AMP response element-binding protein) complex (Aoyagi and Archer, 2008; Bähr *et al.*, 2011).

PPAR γ is a key regulator in the differentiation of adipose cells. Gene expression resulting from complete activation of PPAR γ by certain synthetic ligands can increase insulin sensitivity (Rosenfeld and Glass, 2001; Staels and Fruchart, 2005). Notwithstanding these beneficial effects, the pharmacological potential of these ligands is limited by adverse effects, including weight gain, water retention and increased concentrations of lipoproteins (Guan *et al.*, 2005; Lago *et al.*, 2007; Nissen and Wolski, 2007). A partial activation of PPAR γ remains an interesting theoretical approach if the metabolic benefits can be maintained and the secondary effects be eliminated. This could be achieved through the use of partial agonists, known as selective PPAR γ modulators (SPPARMs) (Toyoma *et al.*, 2011). Telmisartan, an angiotensin receptor blocker (ARB), was characterized as a potential partial modulator of PPAR γ , although data on telmisartan's effects are not entirely conclusive (Schupp *et al.*, 2005).

In this study, we evaluate the activation of PPAR γ in the presence of rosiglitazone and telmisartan, and further investigate PPAR γ 's ability to incorporate specific cofactors in pre-adipocyte cells. We find that both rosiglitazone and telmisartan differentially reduce triglyceride accumulation in 3T3-L1 pre-adipocyte cells, and show that the magnitude of the effect is dependent on the presence of certain cofactors. These findings are likely

EID1 STIMULATES THE FORMATION OF HUMAN BEIGE ADIPOCYTES FROM ADMSCs

Diana Vargas¹, Angela Castellanos¹, Ivan Martinez², Wendy Rosales¹, Fernando Lizcano¹

¹Center of Biological Research (CIBUS), Universidad de La Sabana. Chia, Colombia.

²Hospital Pablo Tobon, Medellin, Colombia.

Corresponding author: Fernando Lizcano Universidad de La Sabana. Campus del Puente del
Comun. Km. 7 Autopista Norte de Bogota. Chia. CU. Colombia. Phone: 57-18615555 ext.
23328. fernando.lizcano@unisabana.edu.co

ABSTRACT

The increase in lipid accumulation in white adipose tissue enhances cardiovascular risk. However, white adipose cells can be stimulated to increase their caloric expenditure by expressing specific factors. This study highlights the role of EID1 (E1A-like inhibitor of differentiation) in the adipogenic process in human adipose-derived mesenchymal stem cells. EID1 reduced the activation of the nuclear receptor PPAR γ by blocking the co-activators p300 and PRIP. We determined that in human ADMSCs, EID1 overexpression reduced lipid accumulation. Furthermore, EID1 activated proteins that are involved in caloric expenditure, such as UCP1, PGC1 α , and TFAM, which are characteristic of brown-like (beige) cells. EID1 bound and inhibited the retinoblastoma protein (pRB), which plays an important role in the fate of adipose cells. In conclusion, EID1 reduces lipid accumulation in ADMSCs and mediate the acquisition of a beige adipose cell phenotype. Therefore, the role of EID1 in adipogenesis could serve as a promising therapeutic target for obesity treatment.

Keywords: Retinoblastoma – Differentiation – Beige – Adipocyte – EID1– PPAR γ

¹*Abbreviations*

¹EID1 (E1A-like inhibitor of differentiation); ADMSC (adipose-derived mesenchymal stem cells); PPAR γ (peroxisome proliferator-activated receptor-gamma); PRIP (peroxisome proliferator-activated receptor interacting protein); SRC1 (steroid receptor coactivators 1); UCP1 (uncoupling protein 1); PGC1 α (peroxisome proliferator-activated receptor coactivator-1); TFAM (mitochondrial transcription factor A); p300 (the early region 1A (E1A)-associated 300-kDa binding protein); (pRB (retinoblastoma protein); aP2 (fatty acid-binding protein)