



**UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES**

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Química Biológica

**Señalización a través de AMPc-EPAC y expresión de  
MCAM en la diferenciación de fibroblastos 3T3-L1 a  
adipocitos**

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos  
Aires en el área Química Biológica

**Matías Gabrielli**

**Director de tesis:** Dra. María del Carmen Vila

**Director asistente:** Dra. Claudia Noemí Martini

**Consejero de estudios:** Dr. Juan Carlos Calvo

Buenos Aires, 2017

## Señalización a través de AMPc-EPAC y expresión de MCAM en la diferenciación de fibroblastos 3T3-L1 a adipocitos

La obesidad se debe a un aumento en el número y tamaño de adipocitos. Dada su prevalencia en la población y la variedad de patologías asociadas a ella, este trabajo pretende contribuir a dilucidar los eventos moleculares que participan en la formación de nuevos adipocitos a partir de células precursoras. Se utilizó la línea celular de fibroblastos 3T3-L1, los cuales se diferencian a adipocitos por agregado de una mezcla que contiene insulina, dexametasona y metilisobutilxantina (MIX). MIX aumenta la concentración intracelular de AMPc. EPAC es una proteína activada por AMPc que hemos demostrado que está involucrada en este proceso de diferenciación. Continuando esta línea de investigación, en este trabajo se encontró que la señalización a través de AMPc-EPAC participa en la activación de genes importantes para la adipogénesis y asociados al fenotipo correspondiente al adipocito, como C/EBP $\beta$  y PPAR $\gamma$ . Por otro lado, mediante un análisis de *microarray* se identificaron varios genes cuya expresión varía durante este proceso, algunos de los cuales requieren la presencia de AMPc. A partir de este análisis, nos interesó identificar nuevos genes importantes en la adipogénesis y analizar su dependencia del aumento de AMPc. Se comenzó investigando un gen que aumentó su expresión durante este proceso: MCAM o CD146, que pertenece a la familia de moléculas de adhesión celular y que también ha sido relacionado con procesos de diferenciación de células precursoras mesenquimales. Hemos observado que los niveles del mRNA de MCAM aumentan durante el proceso de diferenciación de fibroblastos 3T3-L1. Este aumento es posterior al de PPAR $\gamma$  y se incrementa en presencia de pioglitazona, que es un activador de PPAR $\gamma$ . Por otro lado, el bloqueo de la expresión de MCAM por RNAi produjo una inhibición de la adipogénesis, asociada a una menor expresión de PPAR $\gamma$  y otros genes específicos del adipocito. Estos estudios nos han permitido evaluar la importancia de la señalización a través de EPAC y el requerimiento del aumento de MCAM en la diferenciación de fibroblastos 3T3-L1 a adipocitos. De este modo se pretende contribuir a comprender los mecanismos involucrados en la adipogénesis, lo que podría mejorar la capacidad de desarrollar nuevas terapias para el tratamiento de la obesidad.

**Palabras clave:** adipogénesis, EPAC, AMPc, MCAM, fibroblastos 3T3-L1

## **Signaling through cAMP-EPAC and expression of MCAM in the differentiation of 3T3-L1 fibroblasts to adipocytes**

Obesity is a complex disease characterized by an increase in the number and size of adipocytes. Due to its prevalence in the population and the variety of associated pathologies, the aim of the present study is to contribute to elucidate the molecular events that participate in the formation of new adipocytes from precursor cells. We used the 3T3-L1 fibroblasts cell line model, which is induced to differentiate to adipocytes by the addition of a mixture containing insulin, dexamethasone and methylisobutylxanthine (MIX). MIX increases the intracellular concentration of cAMP and EPAC is a protein activated by cAMP. We have previously demonstrated that EPAC is involved in the differentiation of 3T3-L1 fibroblasts. In keeping with this, in the present investigation, we found that cAMP-EPAC signaling is involved in the activation of genes important for adipogenesis and associated to the adipocyte phenotype, like C/EBP $\beta$  and PPAR $\gamma$ . In addition, many genes whose expression changes during this process were identified by microarray analysis, some of them require the presence of cAMP. We are interested in the identification of novel genes important for adipogenesis and in the analysis of their dependence on the increase of cAMP. We started studying a gene upregulated during adipogenesis: MCAM/CD146, which belongs to the family of cell adhesion molecules and has been shown to be involved in differentiation processes of mesenchymal precursor cells. We observed that MCAM mRNA levels increased during the differentiation of 3T3-L1 fibroblasts. This increase was preceded by PPAR $\gamma$  upregulation and was enhanced by pioglitazone, which is an activator of PPAR $\gamma$ . On the other hand, MCAM knockdown by RNAi inhibited adipogenesis and impaired the expression of PPAR $\gamma$  and other adipocyte-related genes. Our results highlight the importance of EPAC signaling and the requirement of MCAM expression in the differentiation of 3T3-L1 fibroblasts to adipocytes. This further contributes to understand the mechanisms involved in adipogenesis, which may improve our ability to develop new therapies for the treatment of obesity.

**Key words:** adipogenesis, EPAC, cAMP, MCAM, 3T3-L1 fibroblasts

*« ¿No es, acaso, lo menos que podemos hacer  
en servicio de algo, comprenderlo? »*

José Ortega y Gasset  
*Meditaciones del Quijote (1914)*

## Agradecimientos

Si este trabajo puede reflejar esfuerzo y dedicación, debo confesar que no fueron sólo míos, sino también de todas las personas que me guiaron y me apoyaron durante su realización.

En primer lugar agradezco a mi directora, María del Carmen, no sólo por dedicarse a formarme, sino también por su excelente calidad humana y sus valores. Gracias por guiarme, por tenerme paciencia (mucho) y sobre todo por confiar en mí y siempre animarme a lograr más. Deberían darte un título honorífico por el solo hecho de haber sabido llevarme durante estos años. Gracias por darme la oportunidad de viajar para formarme, aun cuando aun cuando fueron más las dificultades y requirió un gran esfuerzo económico.

También le agradezco a Claudia, mi directora asistente, quien durante estos años contribuyó a mi formación y siempre estuvo a mano para ayudarme.

Muchas gracias a Juan Carlos, mi consejero de estudios por sus recomendaciones y su siempre excelente predisposición para todo. También muchas gracias por permitirnos usar su laboratorio para realizar experimentos.

Gracias a Damián, que durante 3 meses además de abrirme las puertas de su laboratorio me abrió las puertas de su casa. Agradezco la oportunidad que tuve de hacer el viaje y de poder conocer y aprender cosas nuevas. Muchas gracias por estar siempre a mano para ayudarnos con cualquier consulta.

Gracias a Eva, mi “otra jefa”, quien se convirtió en una gran amiga. Gracias por haberme dado un lugar mientras esperaba la beca. Pero sobre todo, gracias por ser “el pilar”, por tu actitud positiva y constante buen ánimo, por preocuparte y siempre alentarme a no bajar los brazos. Gracias por las charlas largas, aunque al final eran monólogos míos.

Agradezco a Gustavo Yannarelli y a Diego Santa Cruz por su ayuda con los experimentos.

Gracias a todas las personas que tuve la suerte de conocer en el departamento. A Javi y Magui, quienes supieron ser excelentes compañeros de laboratorio. A “los bedeles” por recibirme siempre con los brazos abiertos, con una sonrisa y un mate. A Aye, a Juli a Male y Rodri por soportar durante muchos años mis “preguntas”, y más gracias por su buena onda. A Romi por las charlas compartidas y tu paciente ayuda con el inglés.

Gracias a Lucía por ayudarme a usar nuevas técnicas, y a Amparo por dedicar valioso tiempo suyo a darme una mano con la microscopía.

Muchas gracias a Liliana y a Vanina por sus consejos y su ayuda cuando los necesité.

Gracias al Dr. Federico Coluccio, al Dr. Eduardo Cánepa y la Dra. Cybele García que nos permitieron utilizar algunos de sus equipos para llevar a cabo experimentos importantes. Gracias a todos los grupos y personas que nos prestaron un reactivo o nos ayudaron a realizar nuestros experimentos.

Gracias a todos los miembros del Departamento de Química Biológica, becarios, investigadores, técnicos, docentes, secretarios, personal de maestría.

Gracias la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, por formarme bajo un paradigma de excelencia.

Gracias a la ANPCyT y al CONICET que han financiado las becas con las cuales pude dedicarme a este trabajo. También gracias a la dirección del Departamento de Química Biológica que me dieron la oportunidad de tener trabajo durante el tiempo que estuve sin beca.

Gracias a mis amigos, a Todos (con mayúscula pues son palabras mayores). Gracias por ser mi segunda familia. Me hubiera sido imposible llegar hasta aquí sin su estoica compañía ni su aliento constante. Gracias por todas las tardes, noches, viajes y momentos compartidos.

Gracias a mi familia, mis padres y mis hermanos, por su apoyo incondicional y constante. Por creer en mi y en el camino que elegí, por motivarme y ayudarme en todo lo que necesito. Mil gracias a mi abuelo Adolfo, te llevo presente siempre. A ustedes esta dedicado este trabajo.

Los resultados presentados en la primera parte de esta tesis doctoral se encuentran publicados en el siguiente artículo:

**Exchange protein activated by cyclic AMP is involved in the regulation of adipogenic genes during 3T3-L1 fibroblasts differentiation.** Gabrielli M, Martini CN, Brandani JN, Lustman LJ, Romero DG, Vila MC. *Development Growth and Differentiation*. 2014;56(2):143-51.

Además, los resultados de la segunda parte están incluidos en el siguiente manuscrito que será enviado a la revista *Molecular and Cellular Endocrinology*:

**MCAM knockdown impairs PPAR $\gamma$  expression and 3T3-L1 fibroblasts differentiation to adipocytes.** Gabrielli M, Romero DG, Martini CN, Lustman LJ, Vila MC.

## Glosario de abreviaturas

ATP: adenosina trifosfato  
BSA: albúmina sérica bovina  
cAMP o AMPc: adenosina monofosfato-3',5' cíclico  
cDNA: DNA complementario  
CDS: secuencia codificante  
ChIP: inmunoprecipitación de la cromatina  
ChIP-seq: inmunoprecipitación de la cromatina seguida de secuenciación  
ddH<sub>2</sub>O: agua bidestilada  
DE: desvío estándar  
DMEM: *Dulbecco's Modified Eagle Medium*  
DMSO: dimetilsulfóxido  
DNA: ácido desoxirribonucleico  
DNasa: desoxirribonucleasa  
dNTPs: desoxirribonucleósidos trifosfato (dATP, dCTP, dTTP, dGTP)  
EDTA: ácido etilendiaminotetraacético  
ERK: quinasa regulada por señales extracelulares  
GTP: guanosina trifosfato  
MAPK: proteína quinasa activada por mitógenos  
mRNA: RNA mensajero  
nt: nucleótidos  
pb: pares de bases  
PBS: *buffer* fosfato salino  
PCR: reacción en cadena de la polimerasa  
PI3K: fosfatidilinositol 3'-quinasa  
PKA, PKB y PKC: proteínas quinasas A, B y C  
qPCR: PCR cuantitativa  
RNA: ácido ribonucleico  
RNAi: interferencia de RNA  
RNAsa: ribonucleasa  
RT: retrotranscripción  
RT-qPCR: retrotranscripción seguida de PCR cuantitativa  
SDS: dodecilsulfato de Sodio  
SFB: suero fetal bovino  
TNF $\alpha$ : factor de necrosis tumoral alfa  
UTR: región no traducida



# Índice General

<b>Resumen</b> .....	<b>i</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>ii</b>
<b>Agradecimientos</b> .....	<b>iv</b>
<b>Publicaciones</b> .....	<b>vi</b>
<b>Glosario de abreviaturas</b> .....	<b>vii</b>

<b>Introducción</b> .....	<b>1</b>
Obesidad .....	2
El tejido adiposo .....	4
Tipos de tejido adiposo .....	4
<i>Tejido adiposo blanco</i> .....	4
<i>Tejido adiposo pardo</i> .....	6
Origen del tejido adiposo .....	7
<i>Determinación del linaje celular</i> .....	8
Modelos de adipogénesis .....	10
Adipogénesis en la línea celular 3T3-L1.....	10
Vías de señalización activadas por los inductores.....	13
<i>IGF-1/Insulina</i> .....	13
<i>Glucocorticoides</i> .....	14
<i>Señalización por AMPc</i> .....	15
Expansión clonal mitótica.....	17
Principales factores de transcripción que regulan la adipogénesis .....	17
<i>C/EBP<math>\beta</math> y C/EBP<math>\delta</math></i> .....	17
<i>PPAR<math>\gamma</math></i> .....	19
<i>C/EBP<math>\alpha</math></i> .....	22
La proteína EPAC.....	23
Estructura y mecanismo de activación de EPAC.....	24
Agonistas e inhibidores de EPAC .....	26
Estructura de los genes de EPAC.....	27
Localización de EPAC.....	27
Participación de EPAC en procesos biológicos .....	27

La proteína MCAM.....	28
Estructura de la proteína MCAM.....	28
Estructura del gen de MCAM.....	30
Regulación de la expresión de MCAM.....	31
Funciones de MCAM.....	32
MCAM en células madre.....	33
<b>Objetivos .....</b>	<b>34</b>
<b>Materiales y métodos .....</b>	<b>36</b>
Cultivo de los fibroblastos 3T3-L1 .....	37
Diferenciación de fibroblastos 3T3-L1 a adipocitos .....	37
Tratamientos con dibutilil-AMPc y 8-pCPT-2'-O-Me-AMPc.....	38
Tratamiento con Pioglitazona .....	38
Tratamiento con inhibidores de PKA .....	38
Tratamiento de fibroblastos y adipocitos con TNF $\alpha$ .....	39
Conteo de células .....	39
Western Blot .....	40
<i>Preparación de las muestras</i> .....	40
<i>Electroforesis, transferencia y revelado</i> .....	40
Tinción con Oil-Red-O .....	41
Cuantificación de mRNA por RT-qPCR.....	42
<i>Extracción de RNA</i> .....	42
<i>Retrotranscripción</i> .....	42
<i>PCR cuantitativa en tiempo real</i> .....	43
Inmunofluorescencia.....	44
Construcciones de vectores lentivirales para RNAi.....	45
<i>Armado de los fragmentos a clonar</i> .....	46
<i>Digestión del vector pLKO.1 y clonado del fragmento</i> .....	47
<i>Transformación de bacterias con el vector pLKO.1 con shRNA</i> .....	47
<i>Cultivo de bacterias transformadas y purificación de plásmidos</i> .....	48
Producción de lentivirus.....	49

Análisis de expresión génica por <i>microarrays</i> .....	51
Inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) .....	51
Análisis estadístico .....	53
<b>Resultados .....</b>	<b>54</b>
<i>Parte I: Participación de la señal AMPc-EPAC en la activación de genes necesarios para la diferenciación de fibroblastos 3T3-L1 a adipocitos.....</i>	<i>55</i>
Efecto de la presencia de MIX en la mezcla de diferenciación sobre la expresión de C/EBP $\beta$ y PPAR $\gamma$ .....	56
Efecto de la señalización a través de AMPc-PKA en la expansión clonal mitótica y la diferenciación .....	58
Efecto del reemplazo de MIX por un agonista de EPAC en la diferenciación y la expresión de PPAR $\gamma$ .....	61
Efecto del reemplazo de MIX por el agonista de EPAC en la expresión de C/EBP $\beta$ .....	62
Efecto del reemplazo de MIX por el agonista de EPAC en la expresión de otros genes adipogénicos.....	62
<i>Parte II: Evaluación de la expresión de MCAM durante la diferenciación de células 3T3-L1 y su importancia para la formación del adipocito.....</i>	<i>65</i>
Evaluación del aumento de MCAM en células diferenciadas por western blot e inmunofluorescencia.....	66
Efecto de los inductores de la diferenciación y distintas combinaciones de estos en el aumento del mRNA de MCAM en fibroblastos 3T3-L1.....	68
Evaluación de la participación de PKA en la expresión de MCAM en células 3T3-L1.....	71
Estudio de la expresión de MCAM durante la adipogénesis.....	71
Efecto del activador de PPAR $\gamma$ , pioglitazona, sobre la inducción de MCAM en las células 3T3-L1 .....	73
Efecto de la inhibición de la expresión de PPAR $\gamma$ sobre la inducción de MCAM en las células 3T3-L1 .....	74

Evaluación de los niveles de mRNA de MCAM en fibroblastos no adipogénicos .....	77
Efecto del silenciamiento de MCAM por RNAi en la diferenciación de fibroblastos 3T3-L1 a adipocitos .....	79
Efecto del silenciamiento de MCAM por RNAi en la expresión de genes adipogénicos .....	80
Efecto del silenciamiento de MCAM por RNAi en la activación temprana de ERK.....	81
Efecto del silenciamiento de MCAM por RNAi en la expresión de C/EBP $\beta$ .....	82
Efecto del silenciamiento de MCAM por RNAi en los niveles de $\beta$ -catenina .....	83
Efecto del silenciamiento de MCAM por RNAi en la inducción temprana de PPAR $\gamma$ .....	83
<b>Discusión</b> .....	<b>85</b>
<b>Conclusiones</b> .....	<b>94</b>
<b>Bibliografía</b> .....	<b>96</b>

# Introducción

---

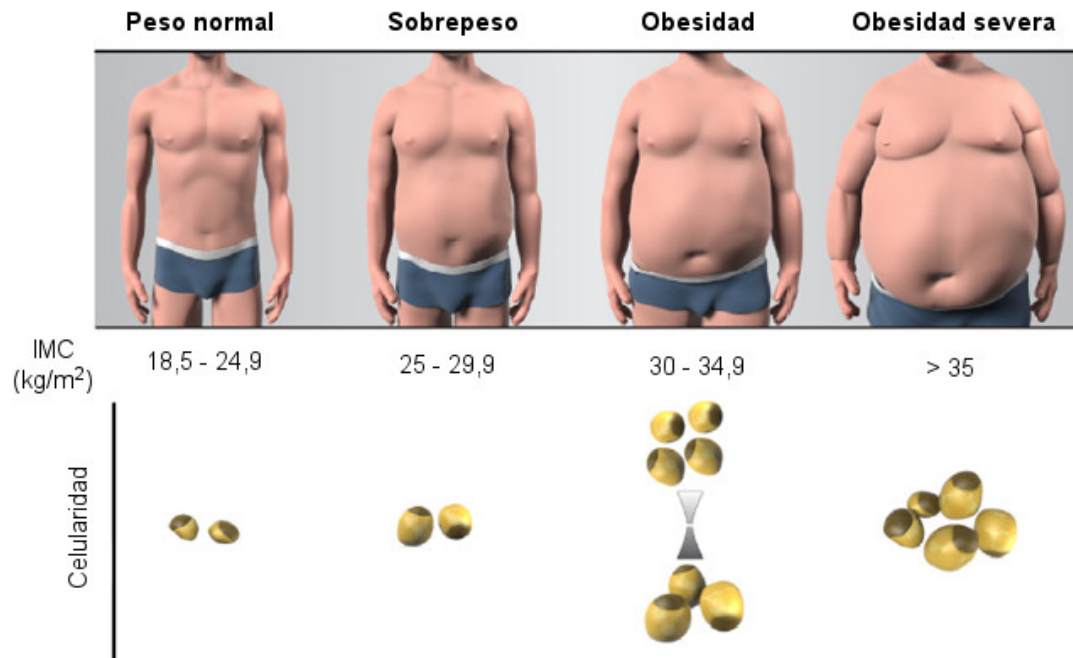
## OBESIDAD

La obesidad es una enfermedad crónica y compleja que se encuentra entre las principales causas prevenibles de muerte a nivel mundial. De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (OMS) está caracterizada por la acumulación anormal o excesiva de grasa corporal que puede representar un riesgo para la salud de la persona [1]. Este aumento de la grasa corporal está asociado a la expansión del tejido adiposo, debida tanto a un mayor tamaño de los adipocitos (hipertrofia) como a un mayor número de estas células (hiperplasia) [2] (Figura 1). La obesidad se desarrolla a partir de un desbalance energético sostenido, en el que la cantidad de calorías consumidas supera a las utilizadas. Dicho desbalance se debe principalmente a factores dietarios y baja actividad física o sedentarismo, pero también existen factores genéticos que predisponen al desarrollo de la enfermedad [3]. En la obesidad, además de la expansión del tejido adiposo se observa una disfunción de éste y la generación de un estado proinflamatorio crónico [4]. A su vez, junto con el sobrepeso constituyen factores de riesgo importantes para el desarrollo de otras patologías, como resistencia a insulina y diabetes tipo 2, dislipidemia, enfermedad cardiovascular y diversos tipos de cáncer [5]. De esta manera, la obesidad representa una de las principales causas de mortalidad, morbilidad y discapacidad en países desarrollados, y supone un creciente gasto de recursos para los sistemas de salud [3, 6]. Por lo tanto, resulta fundamental profundizar los conocimientos sobre la formación y la función del tejido adiposo, y sobre su rol en el desarrollo de enfermedades metabólicas.

Dado el carácter complejo de la obesidad, para su diagnóstico se utilizan distintos tipos de medidas antropométricas y también determinaciones serológicas. El método más aceptado es la determinación del Índice de Masa Corporal (IMC). Este índice se define como el cociente entre el peso de una persona en kilogramos y el cuadrado de su estatura en metros [3]. La OMS define que una persona padece de obesidad cuando su IMC es mayor o igual a  $30 \text{ kg/m}^2$  [1] (Figura 1). Otra medida utilizada es el perímetro abdominal, y se considera un signo de obesidad cuando éste es mayor o igual a 102 cm en hombres o a 88 cm en mujeres [5].

Si bien tiene mayor prevalencia en países desarrollados, la obesidad en países en vías de desarrollo se encuentra en aumento constante, por lo que desde hace años es considerada una epidemia a nivel mundial. Según datos de la OMS, en 2014 más de 600 millones de personas mayores de 18 años eran obesos, lo que corresponde a un 13% de la población mundial de adultos [1]. En nuestro país, el relevamiento

realizado por la Encuesta Nacional de Factores de Riesgo del año 2013 indicó que el 20,8% de la población de adultos mayores de 18 años eran obesos, y que la prevalencia era mayor respecto de años anteriores [8].



**Figura 1. Aumento del tamaño y número de adipocitos en la obesidad.** Representación esquemática de la celularidad del tejido adiposo (tamaño y número de adipocitos) en distintos estados de peso. Se indica el índice de masa corporal asociado a cada estado. Adaptado de Arner y Spalding, 2010 [7].

La principal herramienta para combatir la obesidad y las enfermedades asociadas es la prevención, a través de una dieta equilibrada y de la realización regular de actividad física [1, 3]. Una vez establecida, la obesidad representa un cuadro de difícil reversión ya que implica profundos cambios en el estilo de vida del paciente los cuales deben ser mantenidos a largo plazo para evitar ganar peso nuevamente. La base fundamental de su tratamiento consiste en la adopción de hábitos alimentarios y de actividad física que permitan contrarrestar el desbalance energético. También existen tratamientos farmacológicos y quirúrgicos, pero estos deben implementarse como complementos de las modificaciones del estilo de vida y hábitos alimentarios [9].

## **EL TEJIDO ADIPOSO**

Durante mucho tiempo se consideró al tejido adiposo como una forma de tejido conectivo especializado en el almacenamiento de energía en forma de triglicéridos, los cuales podían ser sintetizados o utilizados en respuesta a las diferentes necesidades energéticas del organismo. Posteriormente, el descubrimiento de la leptina y de otros factores secretados por los adipocitos, denominados en conjunto como adipoquinas o adipocitoquinas, han otorgado al tejido adiposo un importante rol endocrino, modulando el metabolismo y otros procesos fisiológicos del organismo. De esta manera, hoy en día se reconoce al tejido adiposo como un complejo órgano endocrino que cumple diversas funciones fisiológicas y que posee un rol fundamental en la homeostasis energética [10]. Por otro lado, existen distintos tipos de tejido adiposo, caracterizados por las células que los componen y por su localización anatómica, características que condicionan su fisiología y funciones.

### **Tipos de tejido adiposo**

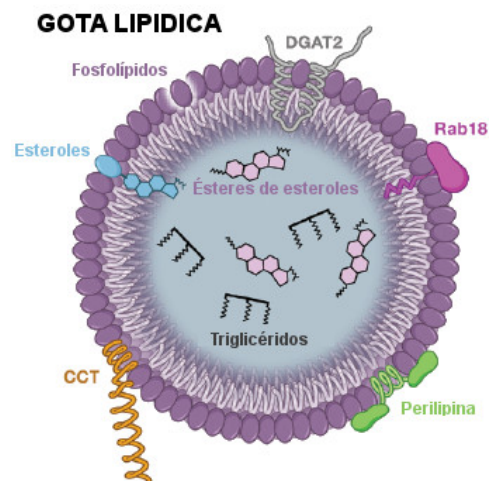
El tejido adiposo está compuesto por diversos tipos celulares: adipocitos (células adiposas), que son las células fundamentales del tejido, preadipocitos, células madre, células endoteliales, células del sistema inmune, células del sistema nervioso. Existen complejas interacciones entre los distintos tipos celulares que modulan la fisiología del tejido adiposo [10]. Tradicionalmente se distinguen dos clases de células adiposas según su aspecto: adipocitos blancos o uniloculares y adipocitos pardos o multiloculares, los cuales componen los tejidos adiposos blanco y pardo, respectivamente, y que, como se verá a continuación poseen diferentes funciones.

#### *Tejido adiposo blanco*

El tejido adiposo blanco es el tejido adiposo más abundante en humanos adultos. Como se menciona anteriormente, está formado por adipocitos de forma esferoidal que contienen una única gota de lípidos (uniloculares) que ocupa la mayor parte del volumen celular. Estas células son capaces de sufrir importantes cambios de tamaño según distintas condiciones fisiológicas [10]. Además, continuamente se generan nuevos adipocitos que reemplazan a los adipocitos muertos, de manera que por año aproximadamente el 10% de los adipocitos se renuevan [11].



El tejido adiposo blanco constituye la principal reserva energética del organismo y su principal función es el control de dicha reserva, almacenando el exceso de energía en forma de triglicéridos y movilizándolos a estos en periodos de escasez energética. Los triglicéridos representan una forma muy concentrada de energía y se acumulan en gotas intracelulares, las cuales están recubiertas por diferentes proteínas (p. ej.: Perilipina) involucradas en su metabolismo [12]. Para controlar las reservas de lípidos, los adipocitos responden ante distintos estímulos hormonales y nerviosos asociados a los estados energéticos y nutricionales del organismo. Por ejemplo, la insulina, una hormona producida durante la ingesta de alimentos, activa mecanismos de síntesis y almacenamiento de triglicéridos, mientras que durante el ayuno la noradrenalina favorece su movilización [13].



**Figura 2. Esquema de una gota lipídica.** La gota está delimitada por una monocapa de fosfolípidos y dentro se almacenan principalmente triglicéridos y ésteres de colesterol. Diversas proteínas se encuentran asociadas a las gotas lipídicas, por ejemplo Perilipina, Colina fosfato citidiltransferasa (CCT), Diacilglicerol aciltransferasa (DGAT2) y las proteínas de la familia de GTPasas Rab (Rab18). Adaptado de Kraemer y col., 2009 [14].

Por otro lado, el tejido adiposo blanco actúa como un importante órgano endocrino, secretando una variedad de moléculas que reciben el nombre de adipocinas, entre las que se encuentran la Leptina, la Adiponectina, la Resistina y el inhibidor del activador de plasminógeno (PAI-1). Estas actúan de forma autocrina, paracrina y endocrina sobre diversos procesos fisiológicos como el balance energético, la respuesta inmune, el control de la presión arterial y la función vascular, entre otros [12, 15]. La Adiponectina, por ejemplo, es una proteína secretada

constitutivamente por los adipocitos y que tiene receptores en distintos tejidos. En el hígado y músculo esquelético estimula la oxidación de ácidos grasos y regula el metabolismo de glucosa, mejora la función de células  $\beta$  del páncreas y aumenta la sensibilidad a la insulina en los tejidos periféricos. También tiene efectos antiinflamatorios y antiaterogénicos [12, 15]. Además la Adiponectina es utilizada como un marcador de resistencia a insulina y disfunción metabólica, pues menores niveles de Adiponectina en plasma están asociados con estas patologías [15]. Los constantes avances en el conocimiento de estas moléculas y sus funciones han permitido comprender el rol clave del tejido adiposo en la patofisiología de enfermedades asociadas a la obesidad y el síndrome metabólico.

El tejido adiposo blanco se encuentra ampliamente distribuido en el cuerpo, pero se distinguen dos compartimentos principales que son el tejido adiposo subcutáneo localizado en el abdomen, la región glútea, y los muslos, y el tejido adiposo visceral, que recubre los órganos abdominales (Figura 3). Además, existen diferencias funcionales y metabólicas entre estos compartimentos, que se traducen, por ejemplo, en una asociación entre el aumento de la grasa visceral y un mayor riesgo de resistencia a insulina [15, 16].

#### *Tejido adiposo pardo*

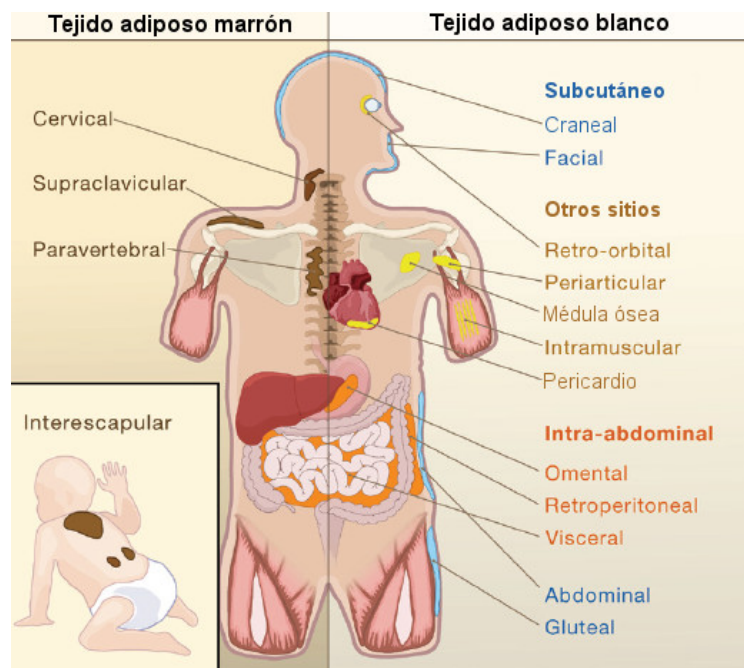
El tejido adiposo pardo o marrón está formado por adipocitos que contiene múltiples gotas lipídicas (multiloculares) y un alto número de mitocondrias que le dan su aspecto. En contraste con los adipocitos blancos, estas células están especializadas en disipar la energía almacenada en los triglicéridos en forma de calor [10]. La generación de calor se produce por la actividad de la proteína UCP-1 (del inglés, *uncoupling protein-1*) que se encuentra en las mitocondrias de los adipocitos pardos. Esta proteína desacopla la oxidación de los ácidos grasos de la producción de ATP y la energía liberada en la cadena respiratoria se disipa como calor. Este proceso es estimulado por el sistema nervioso simpático (por ejemplo por exposición al frío) y por algunas hormonas [15].

En humanos el tejido adiposo pardo es abundante al nacer y durante la infancia, pero en los adultos está presente en menor cantidad en las regiones cervical, supraclavicular, axilar y paravertebral [16] (Figura 3).

Recientemente, se ha descrito la presencia de células con características de los adipocitos pardos dentro del tejido adiposo blanco. Estas células reciben el nombre de adipocitos beige [15]. Sin embargo, la evidencia hasta el momento sugiere que

estas células provienen de precursores diferentes a los de adipocitos pardos y también se ha propuesto que podrían originarse por transdiferenciación de adipocitos blancos [15, 17]. Factores como la exposición al frío, el ejercicio físico y diversas moléculas, son capaces de inducir la producción de adipocitos beige y su actividad [17].

Dadas sus capacidades de uso de energía, se ha sugerido que la activación de tejido adiposo pardo y/o adipocitos beige podría representar una herramienta muy útil para el tratamiento de la obesidad y patologías asociadas a ésta [16, 17].

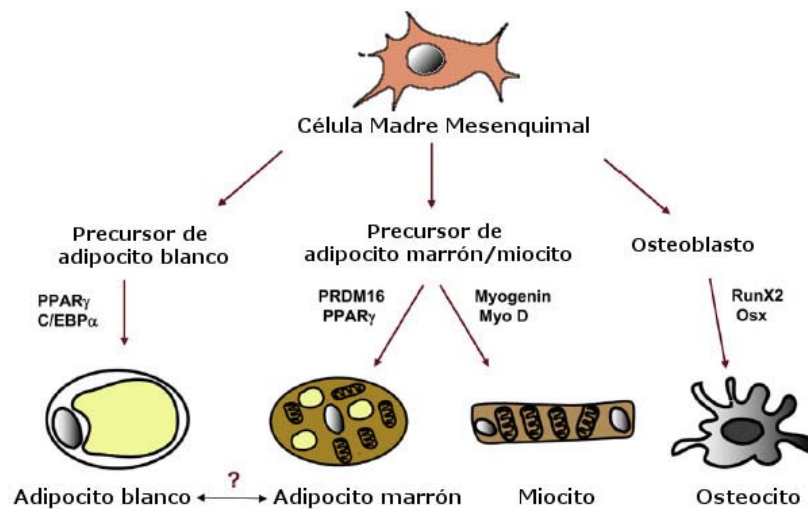


**Figura 3. Distribución del tejido adiposo en humanos.** Se indica la localización de distintos compartimentos de tejidos adiposos en el cuerpo. Nótese que el tejido adiposo pardo es abundante luego del nacimiento pero en el adulto está presente en menor cantidad. Adaptado de Gesta y col., 2007 [16].

### Origen del tejido adiposo

El tejido adiposo se deriva del mesodermo a partir de la diferenciación de células madre mesenquimales (MSCs). Estas células son multipotentes y además de diferenciarse a adipocitos son capaces de producir osteocitos, miocitos, y condrocitos [18] (Figura 4). El proceso global de diferenciación de estas células madre hasta dar adipocitos maduros, denominado adipogénesis, comprende dos etapas. En la primera etapa, de compromiso, se determina el destino celular, generándose una célula

precursora denominada preadipocito, que si bien no presenta un aspecto distintivo su potencial está limitado al linaje adiposo. La siguiente etapa, de diferenciación terminal, implica la activación de un programa transcripcional en los preadipocitos que resulta en cambios morfológicos y bioquímicos asociados al fenotipo de adipocito maduro [18]. La diferenciación terminal es la fase más estudiada, dado que la mayoría de los estudios sobre adipogénesis utilizan líneas celulares cuyo potencial de diferenciación a otros tipos celulares está restringido [18, 19]. Los eventos moleculares involucrados en esta fase serán descritos con mayor detalle posteriormente.

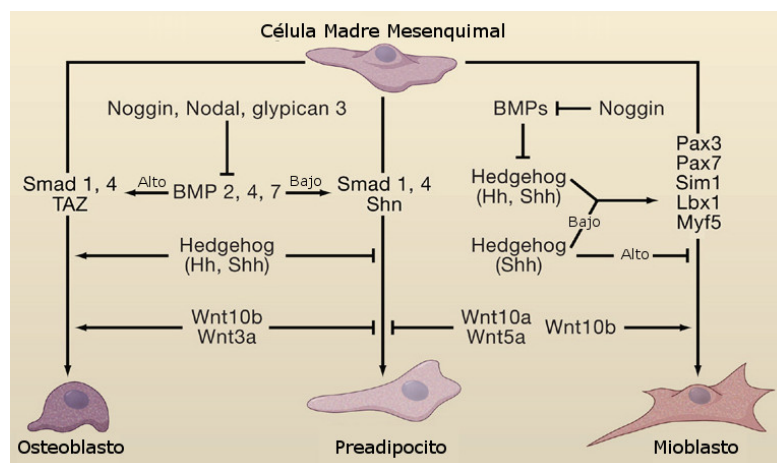


**Figura 4. Modelo del origen de los adipocitos.** Los adipocitos se derivan de las células madre mesenquimales que también se pueden diferenciar a miocitos, osteocitos. Se indican algunos factores involucrados en la diferenciación a cada tipo celular. Adaptado de Park y col., 2008 [20].

#### *Determinación del linaje celular*

La determinación del linaje se produce por un balance entre diferentes señales extracelulares y la actividad de distintos factores de transcripción que promueven el compromiso y la diferenciación hacia un destino celular mientras que reprimen otros posibles destinos [16, 18, 21]. Entre los reguladores involucrados se incluyen diversos morfógenos como Hedgehog, miembros de la familia Wnt y miembros de la familia BMP/TGF $\beta$  (Figura 5). Por ejemplo las proteínas BMP2 y BMP4 (del inglés *Bone Morphogenetic Protein*) han sido involucradas en la determinación del linaje adiposo en células madre pluripotentes [22]. Por el contrario, la vía de señalización de Hedgehog ha demostrado tener efectos antiadipogénicos [23].

Las proteínas Wnts son proteínas secretadas que cumplen importantes roles durante el desarrollo embrionario y son esenciales en la determinación del destino celular de las células madre. En la vía canónica, dependiente de  $\beta$ -catenina, ante la ausencia de estímulo por Wnts la proteína  $\beta$ -catenina es degradada en el proteasoma. La unión de Wnt a los receptores Frizzled (Fzd) y correceptores LRP5/6 activa una señal que previene la degradación de  $\beta$ -catenina, la cual se acumula en el citosol y luego transloca al núcleo donde puede actuar como un coactivador de la transcripción [24]. Resultados de diferentes trabajos indican que distintos Wnts reprimen la adquisición del linaje adiposo a la vez que promueven la diferenciación hacia otros linajes mesenquimales [25-29]. Por ejemplo Wnt10b estimula la osteogénesis en precursores mesenquimales [25, 26], mientras que se ha indicado que Wnt3a es capaz de inducir diferenciación miogénica de células madre mesenquimales de médula ósea de rata [27]. Además, la activación de la vía Wnt/ $\beta$ -catenina induce la condrogénesis en pericitos cultivados en presencia de TGF $\beta$  [28]. La vía Wnt  $\beta$ -catenina también actúa durante la diferenciación terminal, y se ha observado que se encuentra activa en los preadipocitos manteniendo el estado indiferenciado a través de la inhibición de la expresión de PPAR $\gamma$  y C/EBP $\alpha$  [30, 31]. La inactivación de esta vía provoca la diferenciación espontánea de preadipocitos y células madre multipotentes [30]. Por otro lado, durante la diferenciación de los preadipocitos 3T3-L1 los niveles de Wnt10b y  $\beta$ -catenina disminuyen y se ha propuesto que C/EBP $\beta$  y PPAR $\gamma$  participan en su represión [30 – 34].



**Figura 5. Determinación del linaje de las células madre mesenquimales.** Se indican diversos factores involucrados en el control del compromiso de las células madre mesenquimales a distintos linajes. Puntas de flecha indican actividad positiva sobre un proceso y puntas romas efectos negativos. Adaptado de Gesta y col., 2007 [16].

## Modelos de adipogénesis

Existen diversos modelos *in vitro* para el estudio del proceso de adipogénesis, entre los que se distinguen los cultivos primarios y las líneas celulares. Cada uno de estos presenta características propias respecto su capacidad de proliferar, modo de inducción de la diferenciación, y también se han descrito algunas diferencias en la expresión y regulación temporal de factores de transcripción asociados a la adipogénesis [35].

Entre los cultivos primarios podemos nombrar: cultivos de fibroblastos de embrión de ratón (en inglés *MEFs*), cultivos de células madre multipotentes de diverso origen (médula ósea, tejido adiposo, cordón umbilical, etc.) y los cultivos primarios de preadipocitos y células precursoras obtenidas a partir de la fracción estromal-vascular del tejido adiposo. En estos cultivos la proporción de células que pueden diferenciar varía ampliamente y depende de la especie, edad o estadio del desarrollo y localización de donde se obtiene el tejido [18, 35].

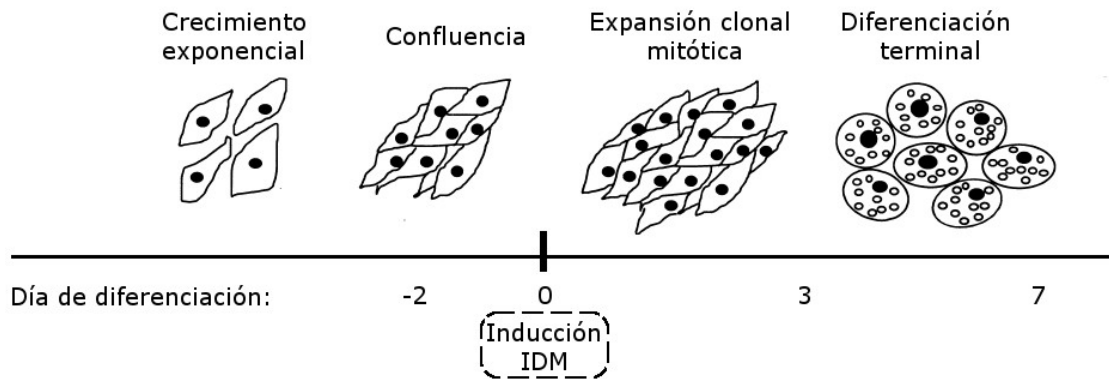
Dentro de las líneas celulares se distinguen: las líneas de preadipocitos, que son células ya comprometidas al linaje adiposo, aunque pueden pertenecer a diferentes estadios del desarrollo de los adipocitos; y las líneas de células multipotentes, capaces de producir distintos tipos celulares, incluyendo adipocitos, osteocitos y miocitos [10].

Las líneas celulares de preadipocitos de ratón 3T3-L1 y 3T3-F442A, son los modelos *in vitro* más utilizados para el estudio de la adipogénesis y otros aspectos de la fisiología de los adipocitos, y con los cuales se han realizado importantes descubrimientos en estas áreas que confirman su validez [36]. Ambas líneas celulares fueron establecidas a partir células de la línea de fibroblastos Swiss 3T3 seleccionadas por su capacidad de acumular lípidos espontáneamente al permanecer varias semanas en estado de confluencia [37, 38]. De estas dos líneas celulares, la 3T3-L1 es la de uso más frecuente y la que empleamos en nuestros estudios. Por lo tanto, a continuación nos enfocaremos en describir el proceso de diferenciación en esta línea.

## ADIPOGÉNESIS EN LA LÍNEA CELULAR 3T3-L1

En la línea 3T3-L1 la adipogénesis se induce cuando estas células alcanzan dos días de postconfluencia y su proliferación se encuentra detenida. En ese momento

se las trata con una mezcla de diferenciación que contiene la hormona insulina, el glucocorticoide sintético dexametasona y el inhibidor de fosfodiesterasas isobutilmetilxantina (MIX o IBMX), en presencia de suero fetal bovino. Posteriormente, en un período de alrededor de 7 días, las células pierden su apariencia de fibroblasto y adquieren características morfológicas y bioquímicas propias del fenotipo de adipocito (Figura 6).



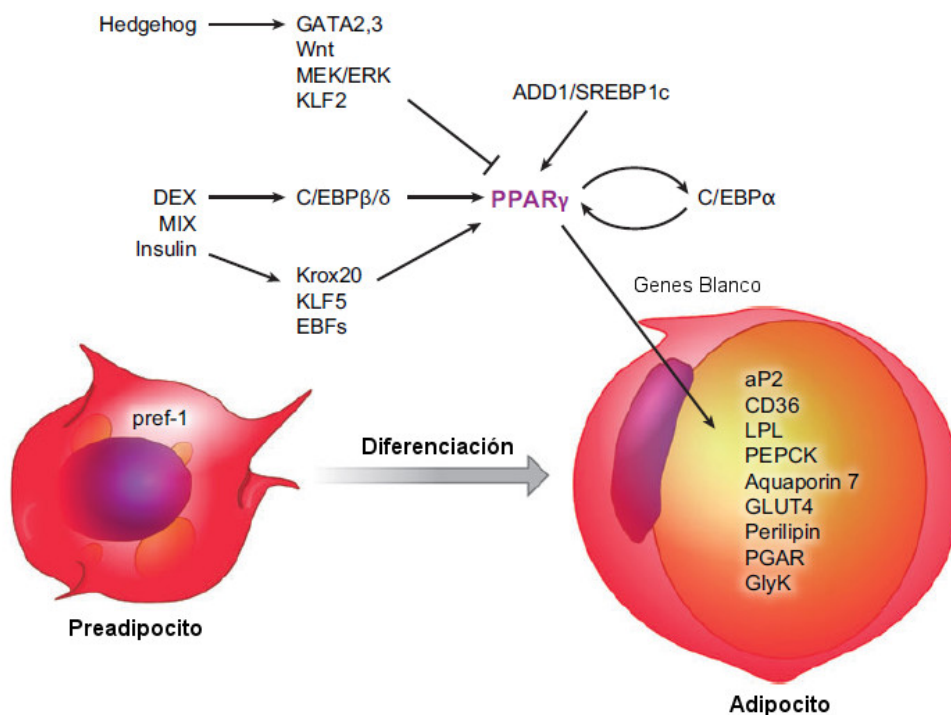
**Figura 6. Esquema del proceso de diferenciación de la línea celular 3T3-L1.** Se indican distintas etapas de la diferenciación de los fibroblastos 3T3-L1 a adipocitos. Los días de diferenciación no están representados en escala. El día 0 corresponde al momento en que se agrega la mezcla de inductores. No se les asigna tiempo a las células en estado de proliferación antes de la confluencia (etapa de crecimiento exponencial). Adaptado de Cowherd y col. 1999 [41].

Si bien la línea celular 3T3-L1 es utilizada como un modelo de diferenciación de adipocitos blancos existen algunas diferencias entre ambas células. Por ejemplo, mientras que los adipocitos blancos poseen una única y gran gota de lípidos, las células 3T3-L1 diferenciadas poseen varias. Además la producción de leptina en los adipocitos 3T3-L1 es menor que la de los adipocitos *in vivo* [16, 39]. Por otro lado, como ocurre con muchas líneas celulares las características de la línea pueden ir cambiando con los sucesivos pasajes, y se ha observado que la capacidad de diferenciación de estas células decae progresivamente con los pasajes [40].

El programa de diferenciación por el cual los preadipocitos 3T3-L1 se convierten en adipocitos maduros puede dividirse en dos fases. En la primera, luego de la inducción, las células realizan una o dos rondas de división celular. Este proceso, denominado expansión clonal mitótica, se describirá con más detalle posteriormente. A continuación, en la etapa terminal de la diferenciación las células comienzan a

acumular lípidos y adquieren las características fenotípicas y bioquímicas de los adipocitos maduros [36].

El proceso de diferenciación se encuentra regulado por una compleja red de factores de transcripción. Luego del agregado de la mezcla de inductores se activa la expresión de los factores de transcripción tempranos C/EBP $\beta$  y C/EBP $\delta$ , los cuales a su vez inducen la expresión de PPAR $\gamma$ , considerado el regulador maestro de la adipogénesis, y también de C/EBP $\alpha$ . En la etapa terminal de la diferenciación, PPAR $\gamma$  y C/EBP $\alpha$  mantienen su expresión mutuamente y a la vez son los responsables de la activación de genes importantes para la función del adipocito [42] (Figura 7). En los párrafos siguientes se describirán las principales señales y factores involucrados en la adipogénesis de los fibroblastos 3T3-L1.



**Figura 7. Principales factores involucrados en la diferenciación a adipocitos.** Se indican distintas señales y factores de transcripción que controlan el proceso de adipogénesis. PPAR $\gamma$  es el regulador central y su activación promueve la diferenciación terminal y la inducción de genes asociados al fenotipo de adipocitos, de los cuales se indican algunos involucrados en la captación y almacenamiento de lípidos. Adaptado de Tontonoz y Spiegelman, 2008 [42].



## Vías de señalización activadas por los inductores

Como sucede en otros procesos de diferenciación celular, la adipogénesis requiere de la integración de diversas señales extra e intracelulares. En los modelos *in vitro* se utiliza una mezcla de distintos inductores para iniciar la diferenciación, y si bien la composición de ésta puede variar según el modelo celular, en general se considera que son necesarios: el factor de crecimiento similar a insulina 1 (IGF-1) o insulina, glucocorticoides, agentes que elevan la concentración de AMPc intracelular o análogos de este segundo mensajero y la presencia de suero fetal bovino, que es una fuente de diversos factores de crecimiento [18, 46]. Por otro lado también se han podido identificar algunos agentes que, por el contrario, inhiben la diferenciación a adipocitos (p. ej.: TNF $\alpha$ ) [43]. La identificación de estos agentes ha permitido determinar algunas de las vías de señalización que participan de la regulación de la adipogénesis. A continuación se describirán, algunos de los mecanismos involucrados en la actividad de los agentes inductores.

### *IGF-1/Insulina*

La insulina tiene efectos importantes en la adipogénesis. En el caso de los preadipocitos 3T3-L1, se ha visto que estos expresan bajos niveles del receptor de insulina, pero por otro lado poseen un alto número de receptores del factor de crecimiento IGF-1. Por ello en las primeras etapas de la diferenciación, la insulina actúa a través del receptor de IGF-1, para lo cual se requiere emplear concentraciones suprafisiológicas de insulina [44]. Dos vías de señalización asociadas a la respuesta del receptor de IGF-1 han sido involucradas en la adipogénesis: la vía PI3K-PKB y la vía de MEK-ERK.

La vía PI3K-PKB posee un rol clave en la diferenciación de adipocitos. Así, se ha visto que la inhibición (farmacológica) de la actividad de la PI3K con wortmanina o LY294002 impide la expansión clonal mitótica (ver a continuación) y la diferenciación de células 3T3-L1 [45, 46]. De manera similar, el *knockout* de PKB o la supresión de su actividad por RNAi inhiben la adipogénesis [45, 47]. PKB es activada a los pocos minutos luego del tratamiento con inductores [45] y ha sido involucrada en la inactivación de factores antiadipogénicos como FOXO-1 y GATA2 [48, 49]. Además, PKB participa en la inducción de la actividad transcripcional de PPAR $\gamma$ , necesaria para la diferenciación [50].

La activación de la vía MEK-ERK durante la fase temprana de la adipogénesis posee un rol positivo sobre la diferenciación. Por un lado ha demostrado ser fundamental para el proceso de expansión clonal mitótica. Las MAPKs ERK1 y ERK2 son activadas por fosforilación, mediada por MEK, de manera rápida pero transitoria luego del agregado de la mezcla de inductores, y se ha observado que el bloqueo de su activación mediante el uso de inhibidores de MEK evita que las células realicen la expansión clonal mitótica [51-53]. Al mismo tiempo, la activación de ERK estimula la actividad de factores de transcripción tempranos. Así, se ha informado que esta vía es responsable de la activación de CREB [54] y que también induce la fosforilación de C/EBP $\beta$ , regulando su capacidad de unión al DNA [55]. De acuerdo con esto se ha observado que la inhibición farmacológica de MEK resulta posteriormente en una menor expresión de PPAR $\delta$  y C/EBP $\alpha$  y una menor diferenciación [55, 56]. Por otro lado se ha indicado un rol negativo de ERK en las etapas más tardías de la diferenciación, dado que esta quinasa es capaz de fosforilar al factor de transcripción PPAR $\gamma$ , lo que disminuye su actividad transcripcional y en consecuencia la adipogénesis se inhibe [57].

### *Glucocorticoides*

Los glucocorticoides tienen efectos promotores de la adipogénesis y ejercen su actividad a través de la unión al receptor de glucocorticoides (GR). La unión del glucocorticoide a su receptor en el citoplasma provoca la translocación de este último al núcleo, donde se une a elementos reguladores en DNA y recluta coactivadores remodeladores de la cromatina para modular la expresión de sus genes blanco [58]. Se ha informado que la regulación negativa de la expresión del receptor de glucocorticoides por RNAi inhibe la diferenciación de preadipocitos de ratón, asociada una menor expresión de los factores de transcripción proadipogénicos C/EBP $\alpha$  y PPAR $\gamma$  [59]. Un efecto similar se observó a través de la inhibición farmacológica de la actividad del receptor de glucocorticoides en fibroblastos de ratón y células madre mesenquimales humanas [60].

Diversos roles han sido propuestos para explicar la actividad de los glucocorticoides y su receptor. Inicialmente se describió que la dexametasona, un glucocorticoide sintético, es el componente de la mezcla de diferenciación que induce la expresión del gen proadipogénico C/EBP $\delta$  en las etapas tempranas de la adipogénesis de fibroblastos 3T3-L1 [61]. En cambio, en preadipocitos humanos, se ha visto que estimula la expresión de C/EBP $\beta$  [62]. Además se observó que el receptor de

glucocorticoides contribuye a la inducción de KLF15, un activador de la expresión de PPAR $\gamma$  (MEFs) [60].

Estudios a escala genómica observaron que, dentro de las primeras horas posteriores a la inducción de la diferenciación, el receptor de glucocorticoides se asocia cooperativamente con otros factores de transcripción, como C/EBPs y STAT5, en elementos regulatorios de diversos genes activados en la adipogénesis, incluyendo el de PPAR $\gamma$ . A su vez se reclutan modificadores de la cromatina, lo que permitiría la posterior unión de otros factores de transcripción adipogénicos y cambios en la expresión de estos genes [59, 63]. Incluso, se ha indicado que el tratamiento con dexametasona induce la acetilación de C/EBP $\beta$  y de esta manera impide la interacción de este factor de transcripción con represores de la transcripción como la desacetilasa de histonas HDAC1 [64].

Otro de los mecanismos por los cuales los glucocorticoides estimulan la adipogénesis sería a través de la inhibición de reguladores negativos de la diferenciación. Por ejemplo se ha visto que la presencia de dexametasona en la mezcla de diferenciación inhibe la expresión de Runx2, un factor de transcripción que regula negativamente la adipogénesis en favor de la osteoblastogénesis [65], y también del marcador de preadipocitos Pref-1 [66].

### *Señalización por AMPc*

Si bien es conocido que la activación de la señalización por AMPc tiene efectos lipolíticos en los adipocitos maduros, se ha observado que el aumento de AMPc intracelular es importante para el proceso de adipogénesis. Este aumento se logra utilizando agentes como la forskolina, que activa la enzima adenilato ciclase encargada de la síntesis de AMPc, o como la metilisobutilxantina (MIX), que inhibe las enzimas fosfodiesterasas que degradan AMPc. También se utilizan análogos permeables de AMPc como el dibutilil-AMPc.

La proteína quinasa A (PKA) es el mediador clásico de la señalización de AMPc. Este segundo mensajero se une a las subunidades regulatorias de la enzima, y de esta manera se disocian y activan las subunidades catalíticas. Sin embargo, existe evidencia contradictoria sobre su función en la adipogénesis. Por un lado, se ha informado que la PKA tiene un rol inhibitorio sobre la diferenciación, mientras que la inhibición de su actividad acelera la diferenciación [67]. Nuestro grupo, en un trabajo previo, observó que PKA no es necesaria para la diferenciación pero que sería

importante para el proceso expansión clonal mitótica (ver a continuación) [68]. En concordancia, otro estudio indicó que no se requiere la actividad de la subunidad catalítica de la PKA para la adipogénesis, aunque se propuso que las subunidades regulatorias podrían tener un efecto proadipogénico independiente [69]. Por el contrario, otros trabajos han informado roles positivos de PKA en la adipogénesis. Según Petersen y col. [54] la PKA es necesaria para la diferenciación y estaría encargada de suprimir los efectos antiadipogénicos de las proteínas RhoA y ROCK. También, la PKA ha sido involucrada en la inducción de la remodelación de la cromatina en torno al promotor de PPAR $\gamma$ , y al a vez participaría en la estimulación de la actividad transcripcional de este factor de transcripción [50, 70]. Por otro lado, Tonneato y col. [71] han encontrado que la PKA regula el transporte desde la mitocondria al núcleo de la inmunofilina FKBP51, un regulador negativo del receptor de glucocorticoides, y así participaría del control fino de la expresión génica durante la adipogénesis.

Como se explicará posteriormente, el AMPc también activa la señalización de EPAC. Esta proteína es un intercambiador de GTP (GEF) para la pequeña proteína G Rap [72]. Distintos trabajos han indicado que la activación de esta vía es necesaria en la diferenciación, dado que se ha visto que el silenciamiento de la expresión de EPAC o de su blanco Rap inhiben la diferenciación de fibroblastos de ratón [84,69]. No obstante, en estos estudios la activación de EPAC no es suficiente para que ocurra la adipogénesis. En contraste, en un trabajo de nuestro grupo, el reemplazo de MIX en la mezcla de diferenciación por el agonista específico de EPAC, 8-pCPT-2'-O-Me-AMPc, si fue capaz de inducir la diferenciación de fibroblastos 3T3-L1 [68]. Aunque la participación de la señalización de EPAC en la adipogénesis está demostrada, su función en este proceso no está bien caracterizada. Uno de los objetivos del presente trabajo será investigar el rol de EPAC en la expresión de distintos genes adipogénicos.

Finalmente, es interesante señalar que si bien se han propuesto otras funciones para la señalización de AMPc, como por ejemplo la inhibición de la expresión de Wnt10b [31], la inducción de C/EBP $\beta$  [61] o la producción de ligandos de PPAR $\gamma$  [73], aún no se conocen los mecanismos involucrados en estas actividades.

## Expansión clonal mitótica

Dentro de las 48 horas posteriores a la inducción de la diferenciación, los fibroblastos 3T3-L1 reingresan sincronizadamente al ciclo celular y experimentan una o dos rondas de división celular, un proceso conocido como expansión clonal mitótica (ECM). Luego las células salen del ciclo celular y proceden a la fase de diferenciación terminal. Se ha propuesto que los cambios en la estructura de la cromatina asociados a la mitosis facilitarían la unión al DNA de diversos factores requeridos para la inducción de genes adipogénicos [74].

Si bien se ha descrito la participación de varias proteínas del ciclo celular y la mitosis en la regulación de la adipogénesis [36], existe controversia sobre el requerimiento de la expansión clonal mitótica para la adipogénesis. Por un lado, se observó que el bloqueo de la activación de ERK1 y ERK2 impidió la expansión clonal mitótica pero no afectó la diferenciación [51, 52]. Por otro lado, resultados previos de nuestro grupo indican que la actividad de la proteína quinasa A (PKA) es necesaria para que tenga lugar la expansión clonal mitótica, pero la inhibición de esta vía no afecta la diferenciación de los fibroblastos 3T3-L1 [68]. En contraste, otro grupo indicó que el bloqueo de la expansión clonal mitótica inhibe la adipogénesis [53]. El factor de transcripción C/EBP $\beta$  que tiene un rol importante en la adipogénesis, es también necesario para la expansión clonal mitótica; se observó que fibroblastos de ratón *knockout* para C/EBP $\beta$  o que expresan una mutante dominante negativa de este factor de transcripción presentan inhibición tanto de la expansión clonal mitótica como de la diferenciación a adipocitos [75, 76].

Otros modelos *in vitro* como la línea de células multipotentes de ratón C3H10T1/2 y preadipocitos humanos, sin embargo, diferencian sin esta etapa de división celular, aunque en el caso de los preadipocitos obtenidos de tejido adiposo también es posible que ya hayan pasado por esta etapa y se encuentren en un estado más avanzado del desarrollo de adipocitos cuando se los aísla [39, 43]

## Principales factores de transcripción que regulan la adipogénesis

### C/EBP $\beta$ y C/EBP $\delta$

Las proteínas de la familia C/EBP (del inglés *CCAAT/enhancer binding protein*) tienen roles importantes en la función y desarrollo de distintos tejidos. Estos factores

de transcripción poseen un dominio bZIP (del inglés *basic leucine zipper*) de dimerización y unión al DNA, y pueden formar homo y heterodímeros con otros miembros de la familia. Varios miembros de esta familia participan de la regulación de la adipogénesis: C/EBP $\alpha$ , C/EBP $\beta$ , C/EBP $\delta$  y C/EBP $\zeta$  (más conocido como CHOP-10), los cuales presentan diferentes roles y patrones de expresión temporal durante la diferenciación [36].

C/EBP $\beta$  y C/EBP $\delta$  actúan como reguladores tempranos de la adipogénesis, y su expresión aumenta a las pocas horas luego de la inducción de la diferenciación y después de 48 h comienza a decaer (Figura 9). Se ha indicado que la activación transcripcional de C/EBP $\beta$  es inducida por el aumento de AMPc intracelular y mediada por el factor de transcripción CREB que posee elementos de unión en el promotor de C/EBP $\beta$  [61, 77]. Otros factores como STAT3, Krox20 y KLF4 también han sido asociados a la inducción de C/EBP $\beta$  [21]. La regulación de la expresión de C/EBP $\delta$  es menos conocida pero se ha visto que éste es inducido por glucocorticoides de la mezcla de diferenciación [61]. A pesar de que su expresión es rápidamente activada, C/EBP $\beta$  recién adquiere capacidad de unirse al DNA aproximadamente a las 16 horas posteriores a la inducción de la diferenciación, luego de ser fosforilado secuencialmente por MAPKs y GSK-3 $\beta$  [55]. Este momento coincide con la entrada en la fase S en la expansión clonal mitótica, en la cual, como se nombró anteriormente, C/EBP $\beta$  tiene un rol importante [55, 75, 76]. A continuación C/EBP $\beta$  y C/EBP $\delta$  se unen a elementos regulatorios en los promotores de PPAR $\gamma$  y C/EBP $\alpha$  para activar su expresión [36]. Por otro lado, se ha observado que C/EBP $\beta$  también tendría un rol indirecto en la inducción de estos dos factores de transcripción a través de la inhibición de la vía Wnt/ $\beta$ -catenina durante la adipogénesis [33].

Es interesante señalar que a pesar de tener un rol importante en los estudios *in vitro* de la adipogénesis, en modelos *in vivo* se ha observado que la falta de C/EBP $\beta$  o C/EBP $\delta$  sólo afecta ligeramente el desarrollo del tejido adiposo, aunque esto podría deberse a que un gen compense la falta del otro. Por otro lado, ratones *knockout* para ambos genes pese a la baja supervivencia mostraron menor cantidad de tejido adiposo que, sin embargo, expresaban PPAR $\gamma$  y C/EBP $\alpha$ , sugiriendo la existencia de mecanismos redundantes que participan en la activación de PPAR $\gamma$  y C/EBP $\alpha$  y también se ha sugerido que C/EBP $\beta$  podría tener un rol en las etapas tardías después de activarse PPAR $\gamma$  y C/EBP $\alpha$  [36, 78].

Existen tres isoformas C/EBP $\beta$  generadas, a partir del mismo mRNA, por traducción alternativa, denominadas LAP (del inglés, *liver-activating protein*) LAP\* y LIP (*liver inhibitory protein*). La isoforma LIP carece del dominio de transactivación y puede actuar como inhibidor de las otras isoformas [79].

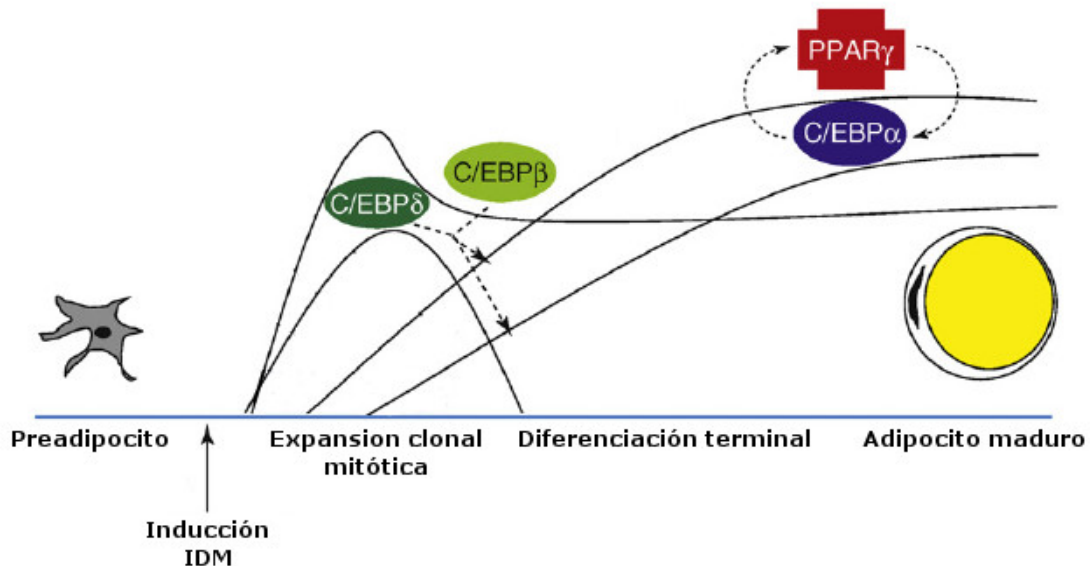
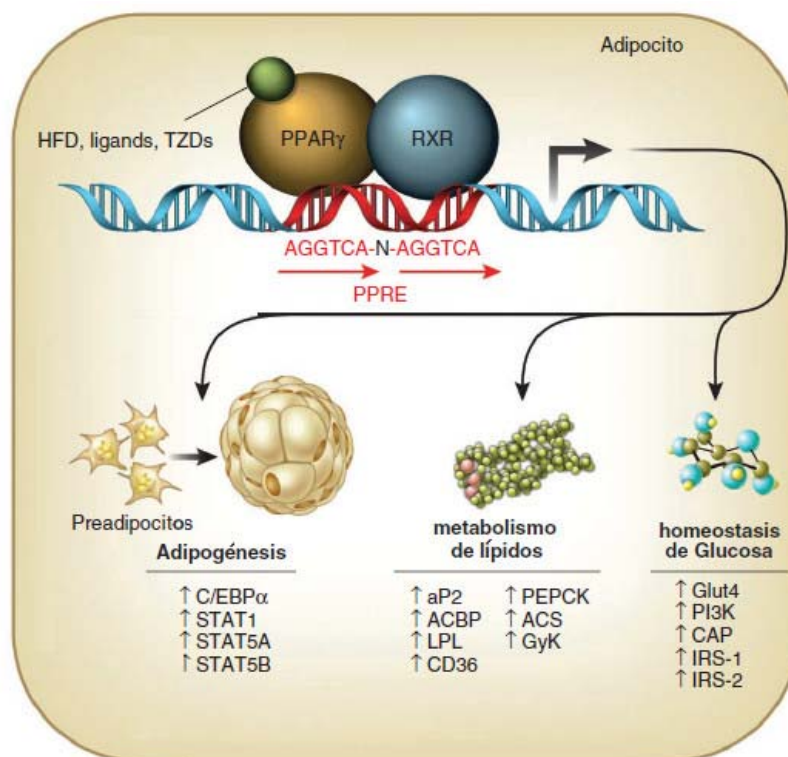


Figura 8. **Expresión de los principales factores de transcripción durante la adipogénesis de los fibroblastos 3T3-L1.** Se esquematiza el patrón temporal de la expresión de los factores de transcripción más importantes en la diferenciación a adipocitos y las etapas del proceso asociadas. Las flechas indican que un factor de transcripción activa la expresión de otro. Adaptado de Lefterova y Lazar, 2009 [80].

### PPAR $\gamma$

El factor de transcripción PPAR $\gamma$  (por las siglas en inglés de receptor activado por proliferadores de peroxisomas gamma) es reconocido como el regulador maestro del proceso de adipogénesis ya que es a la vez necesario y suficiente para inducir la diferenciación a adipocitos. Esto ha sido demostrado a través de diversos estudios de ganancia y pérdida de la función de PPAR $\gamma$ . Por ejemplo, su expresión en células no adipogénicas, tratadas en presencia de un activador de este factor de transcripción y los inductores de diferenciación, es suficiente para activar la expresión de genes característicos de adipocitos, la acumulación intracelular de lípidos y adquisición de una morfología de adipocito [81] (Figura 9). Estudios *in vitro* también han demostrado que formas dominantes negativas de PPAR $\gamma$  inhiben la adipogénesis [82, 83]. Los ratones *knockout* no son viables, mueren durante el desarrollo embrionario debido a defectos en la placenta [84, 85], sin embargo se observó que fibroblastos obtenidos de estos embriones son incapaces de diferenciarse a adipocitos [85, 86].

Por otro lado, PPAR $\gamma$  no solamente es importante durante la adipogénesis sino que también es necesario para mantener el estado diferenciado del adipocito, constituyéndose en un factor clave en la fisiología del adipocito, por lo que PPAR $\gamma$  es altamente expresado tanto en tejido adiposo blanco como tejido adiposo marrón [42]. PPAR $\gamma$  regula la expresión de la mayoría de los genes involucrados en la adipogénesis y en el metabolismo de lípidos como PLIN1 (Perilipina 1), FABP4 (Proteína de unión de ácidos grasos), FATP1 (Transportador de ácidos grasos), ACS (Acil-CoA sintetasa), entre otros [87-90]. Genes asociados a la sensibilidad a insulina, como el del transportador de glucosa (GLUT4) y el de Adiponectina (ADIPOQ) también son regulados por PPAR $\gamma$  [91, 92] (Figura 9).



**Figura 9. Diversos roles de PPAR $\gamma$  en el tejido adiposo.** Ligandos como las tiazolidinedionas (TZDs) activan PPAR $\gamma$  que forma heterodímeros con RXR y regula, a través de la unión a elementos PPRE, la expresión de diversos genes involucrados en la diferenciación y función de los adipocitos. Adaptado de Ahmadian y col., 2013 [98].

Existen dos isoformas de este factor de transcripción, PPAR $\gamma$ 1 y PPAR $\gamma$ 2, las cuales son producidas por la actividad de distintos promotores en el gen y también por *splicing* alternativo. La diferencia entre ambas radica en la presencia de 30 aminoácidos adicionales en la región N-terminal de PPAR $\gamma$ 2 [93, 94]. PPAR $\gamma$ 1 tiene una expresión más amplia, se lo ha detectado en: tejido adiposo, macrófagos, músculo



esquelético y tejido óseo. PPAR $\gamma$ 2, por otro lado, se expresa casi exclusivamente en el tejido adiposo. Si bien ambas isoformas son capaces de inducir la diferenciación a adipocitos PPAR $\gamma$ 2 sería más eficiente [42].

PPAR $\gamma$  pertenece a la superfamilia de receptores nucleares y al igual que otros miembros de esta familia, forma heterodímeros con el receptor nuclear RXR, los cuales se unen a secuencias denominadas Elementos de Respuesta a PPARs (PPREs) [42] (Figura 9). A partir de diversos análisis a escala genómica se ha determinado que la mayoría de los PPREs se ubican en zonas lejanas a los sitios de inicio de la transcripción de los genes blanco, particularmente en regiones intergénicas y también en intrones [95, 96].

Durante la adipogénesis, la expresión de PPAR $\gamma$  es inicialmente activada por C/EBP $\beta$  y C/EBP $\delta$ , los cuales tienen sitios de unión en su promotor [42, 97]. Posteriormente, C/EBP $\alpha$  mantiene su expresión en un mecanismo regulatorio que involucra la activación mutua entre C/EBP $\alpha$  y PPAR $\gamma$  [42, 86] (Figuras 7 y 8). Otros factores de transcripción también han sido involucrados en el control de la expresión de PPAR $\gamma$ : entre ellos, los factores KLF5 y SREBP1c, han sido indicados como reguladores positivos [99, 100], mientras que GATA2 y KLF2 actúan como reguladores negativos [101, 102].

La actividad transcripcional de PPAR $\gamma$  es modulada en diversos niveles. En primer lugar, y de manera similar a la mayoría de los receptores nucleares, PPAR $\gamma$  es activado por unión de un ligando. Hasta el momento no se ha podido identificar el ligando endógeno de PPAR $\gamma$ , aunque se ha propuesto que la señalización de AMPc que se activa luego de la inducción de la diferenciación y el factor de transcripción SREBP1c estarían involucrados en la producción de dicha molécula [73, 103, 104]. Sin embargo, se han descrito diversas moléculas capaces de unirse con gran afinidad a PPAR $\gamma$ , algunas naturales como el prostanoide 15-desoxi- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandina J<sub>2</sub> (15-dPGJ<sub>2</sub>), y otras sintéticas como las tiazolidinedionas [105, 106] aunque en el caso de la 15-dPGJ<sub>2</sub> las concentraciones *in vivo* de ésta no serían significativas como para ejercer una función activadora [42]. Las tiazolidinedionas (TZDs), como por ejemplo la pioglitazona, son potentes activadores de PPAR $\gamma$  y se utilizan en la clínica para el tratamiento de la resistencia a insulina [106]. Es importante destacar que también se ha observado activación de PPAR $\gamma$  independiente de ligando y que la región N-terminal de la proteína estaría involucrada en este mecanismo [107]. Además se han descrito diversas modificaciones postraduccionales de PPAR $\gamma$ , como fosforilación, acetilación, sumoilación y ubiquitinación [98, 108]. Estas modificaciones modularían la

actividad de PPAR $\gamma$  afectando la unión del ligando, su actividad independiente de ligando y su asociación con corre reguladores de la transcripción. A su vez, la presencia del ligando podría afectar la ocurrencia de dichas modificaciones [108, 109].

PPAR $\gamma$  también es capaz de interactuar con diferentes corre reguladores, lo que determina la expresión diferencial de sus genes blanco. Estos corre reguladores pueden modificar el estado de la cromatina o formar complejos que permiten o bloquean la asociación de la maquinaria basal de transcripción. Entre los coactivadores de PPAR $\gamma$  se encuentran PGC-1 $\alpha$ , las proteínas de la familia CBP/p300 que tienen actividad de histona acetiltransferasa (en inglés *HATs*), y TRAP220 que forma parte del complejo *Mediador* y vincularía a PPAR $\gamma$  con la maquinaria basal de transcripción [110-112]. Por otro lado las desacetilasas de histonas como Sirt1 y HDAC3, y los corre presores de receptores nucleares NCoR y SMRT modulan negativamente la actividad de PPAR $\gamma$  [113-115]. Además la unión de ligandos también afectaría la afinidad de PPAR $\gamma$  por uno u otro corre regulador, por ejemplo permitiendo la disociación de corre presores y favoreciendo la unión de coactivadores [108].

Si bien diversas vías de señalización, factores de transcripción y corre reguladores han sido involucrados en el control de la adipogénesis, la mayoría de los mecanismos en los que estos participan convergen en la regulación de la expresión y la actividad de PPAR $\gamma$ .

### *C/EBP $\alpha$*

El factor de transcripción C/EBP $\alpha$  posee un rol muy importante para el desarrollo del tejido adiposo. La expresión de C/EBP $\alpha$  ocurre con posterioridad a la de los otros C/EBPs, durante la diferenciación terminal, y ésta es activada por C/EBP $\beta$ , C/EBP $\delta$  y PPAR $\gamma$  (Figuras 7 y 8). Una vez activa, su expresión se mantiene a través de un mecanismo de regulación positiva mutua con PPAR $\gamma$ , aunque también se ha propuesto que es capaz de autoactivarse [42]. Junto con PPAR $\gamma$  es responsable de la activación de varios genes asociados con el fenotipo de adipocito, como por ejemplo el gen del transportador de glucosa GLUT4, y el de la proteína de unión a ácidos grasos FABP4 [18, 91]. De hecho, estudios a escala genómica han demostrado que entre el 30 y el 60% de los sitios en los que se une PPAR $\gamma$  en adipocitos humanos y de ratón también se une C/EBP $\alpha$  [96, 116]. Ambos factores de transcripción facilitarían mutuamente su unión a dichos sitios [117].

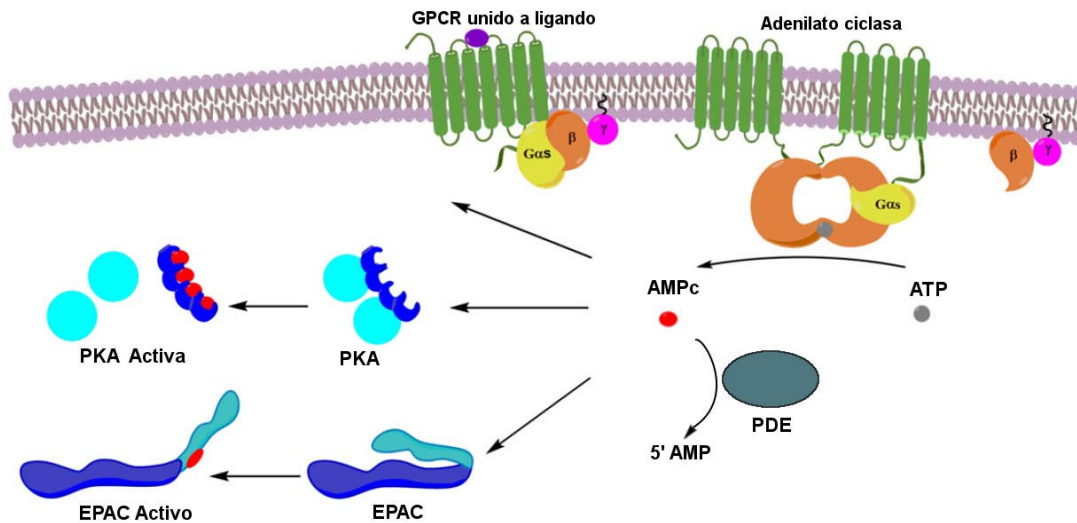
Se ha observado que ratones *knockout* para C/EBP $\alpha$  en todos los tejidos excepto el hígado presentan una ausencia casi total de tejido adiposo blanco en diferentes localizaciones (subcutáneo, perirrenal y epididimal) [118]. Por otro lado, si bien la expresión de PPAR $\gamma$  en células *knockout* para C/EBP $\alpha$  es capaz de inducir diferenciación se ha observado que C/EBP $\alpha$  es necesario para la adquisición de sensibilidad a insulina en los adipocitos [91].

## LA PROTEÍNA EPAC

El AMPc es uno de los segundos mensajeros más importantes que actúa en la fisiología celular y posee un rol central en la regulación de múltiples procesos como diferenciación, proliferación, secreción, etc. Distintos estímulos extracelulares inician mecanismos que resultan en el control de la actividad de la enzima Adenilato Ciclasa (AC), la cual es la encargada de catalizar la síntesis de AMPc a partir de ATP. Por otro lado, las fosfodiesterasas (PDEs) son las enzimas responsables de degradar el AMPc, y de esta manera modular sus efectos (Figura 10). Por lo tanto, los niveles intracelulares de AMPc son regulados a través del balance entre la actividad de la adenilato ciclasa y las fosfodiesterasas. A su vez, la localización intracelular de estas enzimas permite un control de la distribución espacial del segundo mensajero, generando gradientes y microdominios de AMPc dentro de la célula. También se ha descrito la compartimentalización de los distintos efectores de la señalización por AMPc. En conjunto, estos mecanismos permiten el control espacial y temporal de las vías de señalización inducidas por AMPc y sus respuestas [72]. La proteína quinasa A (PKA) fue clásicamente considerada como el mediador de los efectos del AMPc, hasta que en 1998 se descubrieron las proteínas EPAC, las cuales demostraron ser nuevos efectores de este segundo mensajero en diversos procesos celulares y que actúan independientemente de PKA [119, 120] (Figura 10). Al mismo tiempo, se han indicado funciones opuestas y también sinérgicas de ambas vías activadas por AMPc [72]. La localización y disponibilidad de estas proteínas, junto a la generación de compartimentos de AMPc tendría un rol fundamental en la activación de una u otra vía en respuesta a diferentes estímulos.

Las proteínas EPAC (siglas del inglés *exchange protein directly activated by cAMP*) constituyen una familia de proteínas intercambiadoras de GTP (GEF) que son activadas por AMPc y que actúan sobre un grupo de pequeñas proteínas G denominadas Rap. Esta familia está compuesta por dos miembros, EPAC1 y EPAC2,

los cuales son producto de genes distintos que se expresan diferencialmente en diversos tejidos. Mientras que EPAC1 es de distribución más amplia y se encuentra principalmente en corazón, SNC, riñones, tejido adiposo, ovario, útero, la expresión de EPAC2 es más limitada y se da mayormente en hígado, páncreas, glándula adrenal y SNC [72, 119, 120].



**Figura 10. Esquema de las vías de señalización de AMPc.** Se representan distintos componentes de estas vías, como los receptores acoplados a proteínas G (GPCR), la enzima adenilato ciclasa que cataliza la formación de AMPc a partir de ATP, la enzima fosfodiesterasa que degrada AMPc a 5' AMP y las proteínas efectoras PKA y EPAC. A modo de simplificación no se representan otros efectores de AMPc. Adaptado de Banerjee y Cheng, 2015 [121].

El descubrimiento de las proteínas EPAC ha permitido conocer nuevos roles para la señalización del AMPc en la función celular y a la vez constituye un nuevo punto de interacción con otras vías de señalización. Se ha descrito la participación de la señalización de EPAC en diversos procesos celulares como proliferación, diferenciación, secreción, remodelación del citoesqueleto, entre otros [72].

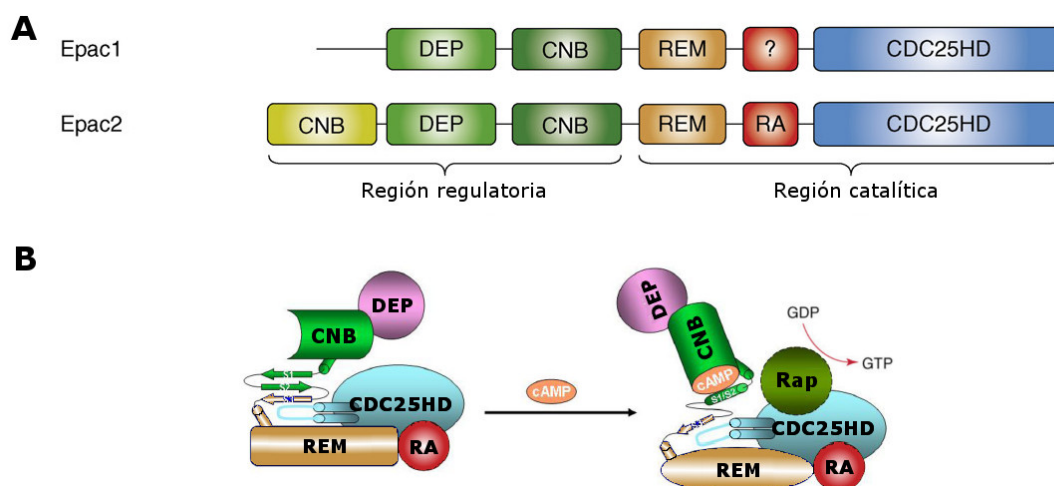
### Estructura y mecanismo de activación de EPAC

Las estructuras de las proteínas EPAC1 y EPAC2 son similares y presentan un alto grado de conservación de secuencia [121]. En ambas se pueden definir dos regiones principales, una región N-terminal y una región C-terminal, y cada una de estas regiones está compuesta por diferentes dominios (Figura 11A). La región N-

terminal tiene función regulatoria dado que contiene el dominio CNB de unión a AMPc y el dominio DEP (Dishevelled/Egl-10/pleckstrin) implicado en la localización intracelular. A diferencia de EPAC1, EPAC2 posee dos dominios CNB, pero uno de ellos tiene baja afinidad por AMPc y no es necesario para su actividad aunque cumpliría otros roles importantes. La actividad catalítica para la activación de Rap se encuentra en la región C-terminal, que está compuesta por un dominio con homología a la proteína CDC25 (CDC25HD) con función de intercambio de nucleótidos, un dominio REM (*Ras exchange motif*) que estabiliza el dominio CDC25HD, y un dominio RA (*Ras association*) cuya función aún no es clara [72].

A partir de distintos estudios bioquímicos y estructurales se ha propuesto un modelo para el mecanismo de activación de EPAC [72, 122]. En este modelo (Figura 11B), en ausencia de AMPc las proteínas EPAC se encuentran en un estado inactivo por autoinhibición, en el cual el dominio CNB impide la interacción entre la región catalítica de EPAC y su proteína blanco. La activación de EPAC se produce por la unión de AMPc al dominio CNB, lo que provoca el desplazamiento de la región regulatoria de forma tal que las proteínas Rap puedan asociarse al sitio catalítico.

Es interesante señalar que en algunos casos se han descrito respuestas de EPAC que no son mediadas por Rap y también otras que son independientes de su activación por AMPc [123,124].



**Figura 11. Estructura y mecanismo de activación de EPAC. A)** Se indican los distintos dominios que conforman las proteínas EPAC1 y EPAC2. **B)** Modelo del mecanismo de activación de EPAC2 por AMPc. Adaptado de Bos, 2006 y Cheng y col., 2008 [125, 126].

## Agonistas e inhibidores de EPAC

Se han desarrollado análogos de AMPc que poseen gran especificidad para la activación de EPAC, respecto de PKA [127]. El más conocido es el 8-paraclorofeniltio-2'-O-metil-AMPc (8-pCPT-2'-O-Me-AMPc) (Figura 12) y se lo considera un “súper activador” de EPAC, dado que se ha observado en estudios *in vitro* que es capaz de activar a EPAC con una eficacia mayor que la del AMPc [127]. La presencia del grupo metilo en la posición 2'-O de la ribosa, afecta negativamente la interacción en el sitio de unión de AMPc de la PKA, otorgándole especificidad por EPAC. Mientras que el grupo paraclorofeniltio en la adenina aumenta la afinidad por EPAC. A la vez, estas modificaciones le otorgan una mayor capacidad de atravesar la membrana plasmática [127]. Estos análogos de AMPc han ayudado a discriminar los efectos de EPAC y la PKA en distintos procesos biológicos.

En los últimos años se han obtenido moléculas con actividad inhibitoria sobre las proteínas EPAC, denominadas ESI por las siglas en inglés de inhibidores selectivos de EPACs. Muchos de estos inhibidores farmacológicos son capaces de regular la actividad de ambas isoformas de EPAC (p. ej.: ESI-09) y actúan principalmente como inhibidores competitivos de la unión de AMPc, mientras que otros presentan especificidad según la isoforma (p. ej. ESI-05) [121].

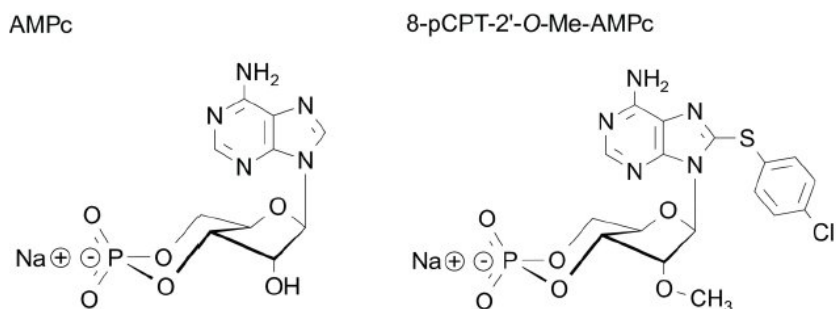


Figura 12. Estructura del agonista de EPAC 8-pCPT-2'-O-Me-AMPc. A modo de comparación se muestra la estructura del AMPc.

## Estructura de los genes de EPAC

Como se menciona anteriormente EPAC1 y EPAC2 son productos de genes distintos: *RAPGEF3* y *RAPGEF4*, respectivamente. A partir del gen *RAPGEF3*, por

*splicing* alternativo, se generan 3 productos transcripcionales que dan lugar a tres isoformas de EPAC1 de diferente tamaño, pero hasta el momento no se conocen diferencias en la función, distribución tisular e importancia de estas isoformas. EPAC2 también posee 3 isoformas con distintas regiones N-terminal y estas se expresan diferencialmente en distintos tejidos [121].

## **Localización de EPAC**

En los diferentes tejidos en que se expresan, las proteínas EPAC se han visto localizadas en distintos compartimentos subcelulares, como la membrana plasmática, la membrana nuclear y regiones perinucleares, entre otros. Además se ha observado que pueden modificar su localización en respuesta a su activación [72]. De esta manera, la localización intracelular de las proteínas EPAC sería importante en la regulación de procesos celulares específicos.

## **Participación de EPAC en procesos biológicos**

Además de la participación de EPAC en adipogénesis descrita anteriormente, la señalización de EPAC ha sido involucrada en otros procesos de diferenciación. Por ejemplo, en células precursoras de médula ósea, se ha visto que la activación de EPAC y Rap1 tiene un rol importante para la diferenciación de osteoclastos estimulando la translocación de NF $\kappa$ B al núcleo y la inducción del remodelado del citoesqueleto de actina [128]. También se ha descrito su participación en la diferenciación neuronal de células de neuroblastoma SH-SY5Y inducida por AMPc, a través de un mecanismo en el que EPAC media la activación de la vía de ERK [129], mientras que la inhibición de EPAC impidió la diferenciación y mielinización dependiente de AMPc de células de Schwann en cultivo [130]. Por otro lado, recientemente se ha observado que la activación de la vía de señalización de EPAC es capaz de reemplazar al factor de transcripción OCT4, uno de los factores más importantes para la reprogramación de células, para la inducción de pluripotencia en células diferenciadas [131].

Otra función que se ha visto para EPAC es la regulación de la exocitosis inducida por AMPc en distintos tipos celulares. Por ejemplo, EPAC tiene un rol importante en el control de la secreción de insulina por células  $\beta$  del páncreas [132] y

también ha sido involucrado en la liberación de hormona de crecimiento en células PC12 [133], entre otros procesos. Si bien la movilización de  $\text{Ca}^{2+}$  es fundamental en los procesos de exocitosis, estudios recientes en adipocitos 3T3-L1 y humanos han indicado que la activación de EPAC media la secreción de Adiponectina inducida por AMPc, en un mecanismo independiente de  $\text{Ca}^{2+}$  [134].

Por otro lado, recientemente se han desarrollado ratones *knockout* (KO) para EPAC1 [135]. Estos ratones desarrollan menor masa de tejido adiposo, tanto con dieta normal como con dieta alta en grasas. En contraste con los estudios en fibroblastos 3T3-L1, esta reducción del tejido adiposo se observó asociada a un menor tamaño de los adipocitos y no a una deficiencia en la capacidad adipogénica. Esta menor adiposidad estaría principalmente asociada a un aumento de la sensibilidad a leptina en estos animales. Este resultado concuerda con un trabajo previo en que la activación de la vía de EPAC en células del hipotálamo induce resistencia a leptina [136].

## **LA PROTEÍNA MCAM**

MCAM (por las siglas en inglés de molécula de adhesión celular de melanomas), también conocida como CD146, es una proteína integral de membrana que pertenece a la superfamilia de proteínas de adhesión celular con dominios de inmunoglobulina (IgSF). Originalmente se la describió como un marcador asociado a la progresión tumoral y metástasis en melanomas humanos [137], pero luego se la encontró presente en otras lesiones malignas y también en tejidos normales como endotelios y músculo liso [138]. Por otro lado, desde hace unos años se ha utilizado a MCAM como un marcador de células estromales mesenquimales (MSCs) cuya expresión está asociada con el potencial de diferenciación [139]. Se han descrito diferentes roles MCAM en adhesión celular, migración, proliferación, señalización y diferenciación participando de procesos de progresión tumoral desarrollo de órganos y tejidos [138].

### **Estructura de la proteína MCAM**

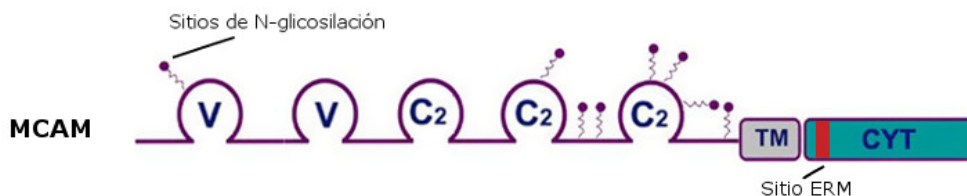
La secuencia y la estructura de la proteína MCAM se encuentran conservadas en diferentes organismos, entre ellos el humano y el ratón [138]. En su estructura se



distinguen una región N-terminal extracelular, una región de transmembrana y una pequeña región C-terminal citoplasmática (Figura 13). La porción extracelular está compuesta por cinco dominios de tipo inmunoglobulina (V-V-C2-C2-C2) y además posee sitios potenciales de N-glicosilación (Asn-X-Ser/Thr), de los cuales se encontraron ocho en la proteína de humanos y seis en la de ratón. Por otro lado, la región citoplasmática contiene un sitio de unión a proteínas ERM (siglas de Ezrin, Radixin y Moesin), involucrado en la asociación con el citoesqueleto de actina, y dos potenciales sitios de fosforilación por PKC (proteína quinasa C) [138].

Se ha descrito la existencia de al menos 3 isoformas de MCAM. La isoforma larga (MCAM-l) y la isoforma corta (MCAM-s) tienen un peso molecular entre 113 y 119 kDa, y son idénticas en sus dominios extracelulares y la región transmembrana, pero difieren en el largo de la cola citoplasmática. Estas isoformas se producen por *splicing* alternativo [140]. La isoforma larga sería la predominante en células de melanoma y endoteliales [141]. Por otro lado, en células humanas y de otros organismos, pero no en células de ratón, se ha identificado una forma soluble de MCAM (sMCAM), que comprende sólo la región extracelular. Ésta es generada a partir de la forma de membrana por el corte por una metaloproteasa de la matriz extracelular (MMP), aunque se ha propuesto que en aves es también producida por *splicing* alternativo [138, 140].

Algunos trabajos sugieren distintas propiedades para las isoformas larga y corta, dado los elementos presentes en la cola citoplasmática de la isoforma larga que serían importantes para su interacción con diferentes proteínas de señalización y el citoesqueleto, aunque otros trabajos no han encontrado diferencias en la capacidad de adhesión [142, 143]. La actividad de la forma soluble no ha sido bien definida, pero sus niveles en sangre han sido asociados a patologías como falla renal crónica [144].



**Figura 13. Estructura de la proteína MCAM.** Se indican los dominios de tipo inmunoglobulina (V y C2) y sitios de N-glicosilación en la región extracelular de la proteína, la región transmembrana (TM) y la región citoplasmática (CYT) donde está el sitio para unión a proteínas ERM. Adaptado de Wang y Yan, 2013 [138].

## Estructura del gen de MCAM

La estructura del gen de MCAM es similar en humanos y en ratones. El mRNA más largo, que codifica para la isoforma MCAM-I, consta de 16 exones, mientras que el mensajero de la isoforma corta se produce por exclusión del exón 15. Los dominios de tipo inmunoglobulina están codificados en los exones 2 a 4 por 2 exones cada uno, a excepción del segundo dominio V que está codificado por 3 exones (Figura 14A). La región transmembrana está codificada en el exón 14 y la cola citoplasmática entre los exones 14 y 16. El exón 16 posee la región 3'-UTR, que en el mensajero de ratón es más corta y tiene una secuencia sustancialmente diferente de su contraparte en humanos [138].

La región promotora del gen no contiene elementos TATA-box o CAAT-box, pero en cambio posee un elemento Iniciador (Inr) ubicado a unos 29 nt río arriba del primer codón ATG [145]. También existen sitios de unión para diferentes factores de transcripción como CREB, SP1 y AP-2 (Figura 14B), los cuales se ha demostrado que son importantes reguladores de la expresión de MCAM en células de melanoma [138]. Finalmente, la secuencia de la región promotora es rica en CG [145] lo cual podría tener un rol en la expresión de MCAM ya que se ha observado que los promotores ricos en CG se caracterizan por su superposición con islas de CpG las cuales participan en la regulación de la expresión génica por modificación de su estado de metilación [146].

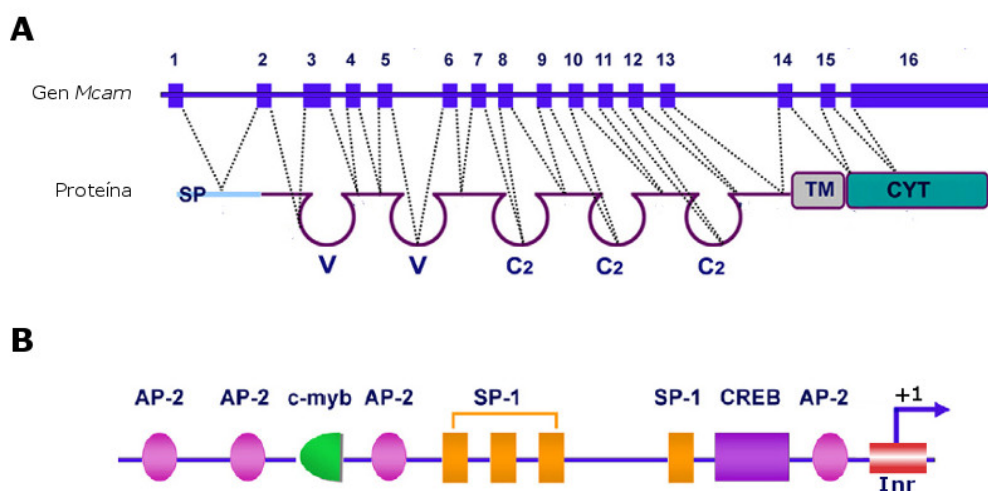


Figura 14. **Estructura del gen de MCAM** **A)** Esquema de la distribución de intrones y exones en el gen de MCAM y regiones de la proteína codificadas. **B)** Esquema de la ubicación de los distintos elementos regulatorios en la región promotora del gen de MCAM donde se unen los factores de transcripción AP-2, Sp1 y CREB. Se indica también el elemento Inr. La posición +1 representa el sitio de inicio de la transcripción. Adaptado de Wang y Yan, 2013 [138].

## Regulación de la expresión de MCAM

Dada la presencia de los sitios para unión de factores de transcripción en el promotor de MCAM previamente descritos, en varios trabajos se ha estudiado la importancia de estos elementos regulatorios en la expresión de MCAM, y se ha propuesto que estarían asociados a diferentes mecanismos de regulación en células tumorales y normales.

La presencia de un sitio CRE está clásicamente asociada a una posible regulación por la señalización de AMPc. En estudios con líneas celulares de diverso origen tisular, se ha observado que el tratamiento con agentes que aumentan los niveles intracelulares de AMPc, induce un aumento en la expresión de MCAM [147-150], aunque en líneas de melanoma que expresan constitutivamente altos niveles de MCAM, su expresión sólo se ve levemente afectada por estos agentes. Sin embargo, es importante destacar que existe evidencia contradictoria sobre el rol del elemento CRE en el control de la expresión de MCAM. Por un lado, entre los trabajos mencionados, algunos autores concluyen que el elemento CRE es un regulador transcripcional importante para la expresión de MCAM y que este sitio es fundamental para la inducción en respuesta a AMPc [145, 148], mientras que otros han observado que la expresión de MCAM y su regulación por AMPc ocurre aun en ausencia de este sitio [150]. Intentando conciliar estas diferencias y teniendo en cuenta los distintos modelos celulares estudiados, se ha propuesto que los sitios CRE no necesariamente contribuyen a la expresión de MCAM en todas las líneas celulares y [145].

Los factores de transcripción AP-2 y Sp1 cumplen funciones importantes en el control de diversos procesos celulares como crecimiento, diferenciación y apoptosis [151, 152]. Se ha demostrado que ambos son capaces de unirse a los elementos del promotor de MCAM y que tienen un rol importante en su regulación [145]. En particular para AP-2 se observó que puede tener actividad represora o activadora de la transcripción de MCAM, según a cuál de sus sitios se una [145, 153].

Finalmente, trabajos recientes han sugerido nuevas formas de regulación de la expresión de MCAM. Por ejemplo, en melanocitos se ha observado que Endotelina-3 es capaz de activar MCAM, a través de las vías de PKB y ERK [154].

## Funciones de MCAM

Se ha propuesto que MCAM funciona en adhesión celular participando de interacciones homotípicas, heterotípicas y con la matriz extracelular [140]. Por un lado, Bardin y col. [155] informaron que MCAM contribuye a la cohesión entre células del endotelio vascular. Asimismo, se demostró que MCAM está involucrado en la adhesión homotípica entre células de melanoma, pero que la interacción no sería entre moléculas de MCAM sino por medio de un ligando diferente [138]. En otro trabajo se observó que el bloqueo de MCAM con un anticuerpo impidió que células de melanoma pudieran unirse a células endoteliales que también expresan MCAM [156].

También se ha informado que MCAM actúa como receptor para diferentes ligandos como laminina-411, Wnt5a, Netrina-1 y como correceptor para el receptor 2 de VEGF (VEGFR-2) [138, 140]. De esta manera mediaría la activación de diferentes vías de señalización intracelular. Por ejemplo, como correceptor de VEGF en células endoteliales participaría de la señalización a través de PKB, p38, y NF- $\kappa$ B promoviendo la migración y angiogénesis [157]. Además, en células de melanoma se ha demostrado una regulación recíproca entre PKB y MCAM, que sería importante durante el desarrollo tumoral [158].

Por otro lado, varios trabajos sugieren un rol de MCAM en la organización del citoesqueleto, y de esta manera dan mecanismos posibles que contribuyen a explicar su función en la adhesión y migración de distintos tipos celulares. Por ejemplo, en células endoteliales, la estimulación de MCAM con un anticuerpo produjo el reclutamiento y activación de la quinasa Fyn, desencadenando una cascada de activación de proteínas quinasas que ha sido asociada con la organización de adhesiones focales y la remodelación del citoesqueleto de actina [159]. Asimismo se demostró que MCAM es capaz de interactuar con proteínas del grupo ERM (Ezrin-Radixin-Moesin), las cuales vinculan a MCAM con los filamentos de actina e inducen la activación de la pequeña proteína G RhoA en células de melanoma, promoviendo así el remodelado del citoesqueleto [160]. Otros autores han propuesto que la proteína Shroom1 también está involucrada en la asociación de MCAM con el citoesqueleto de actina [141].

## **MCAM en células madre**

MCAM ha sido indicado como un marcador de células madre mesenquimales (MSCs) y diversos trabajos han observado que su expresión está positivamente asociada al potencial de diferenciación de estas células [139]. Por ejemplo, se observó que las células perivasculares de cordón umbilical humano (HUCPVCs) contienen mayores niveles de MCAM en comparación con células madre de médula ósea (BM-MSCs), y su capacidad de proliferación, multipotencialidad y clonogenicidad también son más altas [161]. Recientemente se vio que la inhibición de la expresión de MCAM por RNAi en células madre multipotentes de médula ósea redujo la capacidad de diferenciación hacia linajes adipogénicos y osteogénicos [162]. De acuerdo con esto se ha informado que los niveles de MCAM disminuyen con los sucesivos pasajes, y también durante el envejecimiento y diferenciación de las células multipotentes [163]. Por lo tanto, MCAM tiene un rol importante para la diferenciación y proliferación de MSCs.

# Objetivos

---

El presente trabajo se propone aportar nuevos conocimientos sobre los mecanismos involucrados en el proceso de diferenciación adipogénica mediante el estudio de la importancia de MIX a través de la señal AMPc-EPAC y de la expresión de MCAM en la diferenciación de los fibroblastos 3T3-L1.

El primer objetivo es analizar la participación de la señal AMPc-EPAC en la activación de genes que son necesarios para la diferenciación de fibroblastos 3T3-L1 a adipocitos. Por ello se desea investigar:

- a) La activación de los factores de transcripción adipogénicos C/EBP $\beta$  y PPAR $\gamma$ , evaluando si la presencia de MIX en la mezcla de diferenciación o su reemplazo por análogos de AMPc, como dibutilil-AMPc o un agonista específico de EPAC, son capaces de regular la expresión de ambos factores.
- b) La activación de otros genes involucrados en la diferenciación, evaluando, a través de un análisis por *microarrays*, si genes adipogénicos son regulados en presencia de MIX o de un análogo específico de EPAC.

El segundo objetivo de este trabajo es estudiar la expresión de MCAM durante la diferenciación de las células 3T3-L1 y su importancia para la formación del adipocito. Este gen lo hemos identificado a partir del análisis por *microarrays* y su rol en la adipogénesis no ha sido caracterizado. Por ello se desea investigar:

- a) La dinámica temporal de la expresión del mRNA de MCAM.
- b) Cómo se afecta la expresión de este mRNA con los distintos componentes de la mezcla de diferenciación.
- c) El efecto de activadores e inhibidores de PPAR $\gamma$  sobre su expresión.
- d) El efecto del silenciamiento de MCAM mediante ensayos de interferencia de RNA (RNAi) en la diferenciación de los fibroblastos 3T3.L1 y en la expresión de genes tempranos y tardíos involucrados en la adipogénesis

# **Materiales y Métodos**

---



### **Cultivo de los fibroblastos 3T3-L1**

Los fibroblastos 3T3-L1 de ratón (ATCC CL-173) se obtuvieron de la Asociación Banco Argentino de Células. Las células fueron cultivadas en medio DMEM con alta glucosa y rojo fenol (Invitrogen) suplementado con 10% (v/v) de suero fetal bovino (SFB, Natocor), 100 µg/ml de estreptomycin, 100 U/ml de penicilina y 250 ng/ml de anfotericina B. En adelante se hará referencia a este medio de cultivo completo como DMEM+SFB. Los cultivos se mantuvieron en estufa humidificada a 37 °C, gaseada con CO<sub>2</sub> 5%.

Los pasajes de las células se realizaron 2 o 3 veces por semana cuando los cultivos alcanzaron el 70-80% de confluencia. En ese momento se descartó el medio de cultivo, se agregó tripsina 0,25%-EDTA 1 mM (500 µl / 25 cm<sup>2</sup>) y se incubó unos 5 min en estufa, hasta que las células se despegaron de la superficie de cultivo. Luego, para resuspender las células y detener la actividad de la tripsina, se agregaron 5 ml de DMEM+SFB / 25 cm<sup>2</sup>. Para su mantenimiento las células se replaquearon al 5% de confluencia, mientras que para los experimentos de diferenciación se plaquearon de manera de alcanzar la confluencia en aproximadamente 2 días.

### **Diferenciación de fibroblastos 3T3-L1 a adipocitos**

Para iniciar la diferenciación, los cultivos de fibroblastos 3T3-L1 con dos días de postconfluencia (considerado día 0) fueron tratados con una mezcla conteniendo 10 µg/ml de insulina (I), 100 nM de dexametasona (D), y 500 µM de metilisobutilxantina (MIX, M) en DMEM+SFB (IDM). Luego de 72 h (día 3) se cambió el medio de cultivo por DMEM+SFB suplementado con 10 µg/ml de insulina. Posteriormente, cada 48 h, se cambia el medio a DMEM+SFB.

Generalmente la acumulación de lípidos comienza a evidenciarse a partir del día 4 luego de la inducción, y las células se consideran terminalmente diferenciadas al cabo de 7 a 10 días.

En algunos experimentos los fibroblastos 3T3 postconfluentes fueron tratados con sólo uno de los inductores (I, D o M) o combinaciones binarias de estos (ID, DM, IM). Tres días después, el medio de cultivo se reemplazó por DMEM+SFB solo o suplementado con insulina 10 µg/ml en aquellos ensayos inducidos en presencia de insulina. Posteriormente, cada 48 h, se cambió el medio a DMEM+SFB.

En algunos experimentos se usaron células NIH3T3, las cuales fueron gentilmente cedidas por el laboratorio de la Dra. Alejandra Guberman. Éstas se cultivaron y diferenciaron siguiendo los mismos protocolos descritos para los fibroblastos 3T3-L1

### **Tratamientos con dibutiril-AMPc y 8-pCPT-2'-O-Me-AMPc**

Los análogos de AMPc, N<sup>6</sup>,2'-O-dibutiril-AMPc (Sigma) y 8-pCPT-2'-O-Me-AMPc (Sigma) se disolvieron en DMEM como soluciones stock 100X (100 mM y 20 mM, respectivamente).

En los experimentos con estos análogos, fibroblastos 3T3-L1 postconfluentes fueron tratados con mezclas de diferenciación conteniendo insulina y dexametasona (ID) en combinación con dibutiril-AMPc (1 mM) o 8-pCPT-2'-O-Me-AMPc (200 µM) en el día 0. A las 24 h se reemplazó nuevamente el medio de cultivo por DMEM+SFB con agregado de ID y el análogo de AMPc. El día 3 se cambió el medio de cultivo por DMEM+SFB suplementado con Insulina 10 µg/ml. Posteriormente, cada 48 h, se cambio el medio a DMEM+SFB.

### **Tratamiento con Pioglitazona**

Pioglitazona es un agonista de PPAR $\gamma$ . Se utilizó el fármaco Pioglit 30 (Laboratorios Phoenix). Un comprimido conteniendo 30 mg de pioglitazona base se trituró y se resuspendió en 3 ml de DMSO para dar el stock 30 mM. Una alícuota de éste se diluyó 1/30 en PBS para dar una solución de trabajo 1 mM.

Las células fueron tratadas con pioglitazona 2 µM que fue agregada junto con los inductores el día 0, y luego con el cambio de medio del día 3.

### **Tratamiento con inhibidores de PKA**

Los inhibidores de PKA, Rp-cAMPS y Rp-8-Br-cAMPS (Biolog) se disolvieron en DMEM para generar soluciones stock 100X (5 mM).

En los ensayos con estos inhibidores una hora antes de la inducción de la diferenciación, a los fibroblastos 3T3-L1 se les cambio el medio por DMEM+SFB y se les agregaron ambos inhibidores en concentración 50  $\mu$ M cada uno. Los inhibidores se volvieron a agregar junto con insulina 10  $\mu$ g/ml cuando se cambio el medio el día 3 de inducción. Posteriormente, cada 48 h, se reemplazo el medio por DMEM+SFB.

### **Tratamiento de fibroblastos y adipocitos con TNF $\alpha$**

Una solución de TNF $\alpha$  (2  $\mu$ g/ml) fue gentilmente cedida por el laboratorio de la Dra. Alcira Nesse.

En experimentos de diferenciación se agregó TNF $\alpha$  para obtener una concentración final de 2 ng/ml junto con la mezcla de diferenciación y después al cambiar al medio con insulina en el día 3. En experimentos con adipocitos 3T3-L1, se cambio el medio de células 3T3-L1 diferenciadas durante 9 días y el día siguiente las células se trataron con TNF $\alpha$  25 ng/ml por 48 h.

### **Conteo de células**

Para contar la cantidad de células los cultivos en placas de 24 pocillos se lavaron una vez con PBS, se les agregó tripsina 0,25%-EDTA 1 mM y se incubaron en estufa a 37 °C durante 5 min. Luego se resuspendieron las células en PBS y se las transfirió a un tubo eppendorf. La suspensión celular se homogenizó por pipeteo y se tomó una alícuota de 10  $\mu$ l que se utilizó para determinar el número de células por mililitro contando en los cuatro cuadrantes externos de una cámara de Neubauer (Boeco) de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\text{Células / ml} = (\text{N}^\circ \text{ de células en los 4 cuadrantes} / 4) \times 10^4$$

## **Western Blot**

### *Preparación de las muestras*

Para la determinación de la expresión de C/EBP $\beta$ ,  $\beta$ -catenina y PPAR $\gamma$  cultivos de fibroblastos 3T3-L1 en placas de 6 pocillos fueron inducidos con los tratamientos indicados en cada experimento. A las 24 y 30 h para C/EBP $\beta$ , a los 4 días para  $\beta$ -catenina y a los 8 días para PPAR $\gamma$  se descartó el medio de cultivo, las células se lavaron con PBS frío y luego se cosecharon por *scraping* en 70  $\mu$ l de PBS. La suspensión celular se pasaron a un tubo eppendorf y se homogenizó en vortex. A continuación se sacaron 10  $\mu$ l de muestra para medir proteínas y al resto se les agregaron 20  $\mu$ l de Laemmli Sample Buffer (LSB) 4X [164].

Para la evaluación de la expresión de MCAM se procedió de manera similar a lo descrito para PPAR $\gamma$  pero para obtener muestras más concentradas se partió de cultivos en placas de 21 cm<sup>2</sup> y las células se cosecharon en 100  $\mu$ l de PBS. Se sacaron 10  $\mu$ l para medir proteínas y se agregaron 30  $\mu$ l de LSB 4X.

Para la determinación de la activación de la quinasa ERK, cultivos de fibroblastos 3T3-L1 con dos días de postconfluencia fueron tratados durante 1 h con medio DMEM con 1% de SFB y luego inducidos con la mezcla de diferenciación durante 30 minutos. Posteriormente se removió el medio de cultivo y las células se cosecharon directamente por *scraping* en 50  $\mu$ l de LSB 1X.

Todas las muestras se conservaron a -20 °C hasta su posterior procesamiento.

La determinación de la concentración de proteínas se realizó usando 5  $\mu$ l de suspensión de células en 1 ml de reactivo de Bradford. Luego de 5 min se midió su absorbancia a 595 nm. Como estándar se usó albúmina sérica bovina (BSA).

Todas las muestras en LSB fueron sonicadas durante 15 segundos y luego incubadas durante 5 minutos en baño de agua hirviendo. Antes de sembrar, a cada tubo con muestra se le agregó de glicerol para aumentar la densidad de la muestra y así facilitar su entrada en la calle del gel.

### *Electroforesis, transferencia y revelado*

Las proteínas se resolvieron por electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS (PAGE-SDS) utilizando un sistema discontinuo compuesto por un gel concentrador de 3% T y un gel separador de 9% T. En cada calle del gel se sembraron

iguales cantidades de proteína (30-70  $\mu\text{g}$ ) y en una de las calles se sembró un marcador de peso molecular de rango 10-180 kDa (Thermo Page Ruler). La corrida se realizó a voltaje constante de 120 V, durante aproximadamente 1 h. Una vez finalizada la corrida los geles fueron transferidos a membranas de nitrocelulosa utilizando un sistema de transferencia semiseco (Hoefer TE 70). El gel, la membranas y hojas de papel Whatmann fueron humedecidos en buffer de transferencia (Tris 25 mM, Glicina 192 mM, Metanol 20% v/v, pH: 8,3) y la transferencia se realizó en un campo eléctrico de 12 V, durante 30-40 min. A continuación se verificó la transferencia observando que las bandas del marcador de peso molecular hayan pasado a las membranas y también a través de la tinción de las membranas con una solución de rojo Ponceau (Sigma) al 0,2% en ácido acético. El colorante se removió usando agua destilada.

Las membranas fueron bloqueadas con leche descremada al 5% en T-TBS (Tris-HCl 25mM, pH 7.5, NaCl 150 mM y Tween-20 0,1%) durante 1 h a temperatura ambiente. Luego de lavarlas tres veces con T-TBS se incubaron con anticuerpo primario diluido en albúmina sérica bovina (BSA) al 5% en T-TBS durante toda la noche a 4 °C con agitación constante. A continuación las membranas se lavaron 3 veces con T-TBS y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente con anticuerpo secundario conjugado a peroxidasa diluido en BSA 5% en T-TBS.

Finalmente, después de lavar las membranas con T-TBS, se realizó el revelado utilizando un reactivo quimioluminiscente conteniendo, y se capturaron las imágenes a través de un equipo G-Box (Syngene) o por exposición de films para rayos X. La proteína, Gliceraldehído-3 -fosfato deshidrogenasa (GAPDH), se utilizó como control de carga salvo para fosfo-ERK1/2 que se utilizó como control de carga ERK2.

Los anticuerpos primarios utilizados fueron: anti-PPAR $\gamma$  (C26H12, Cell Signaling), anti-C/EBP $\beta$  (C-19, Santa Cruz), anti- $\beta$ -catenina (Cell Signaling), anti-CD146/MCAM (EPR3208, Abcam), anti-fosfo-ERK1/2 (Santa Cruz), anti-ERK2 (Santa Cruz), anti-GAPDH (Santa Cruz). El anticuerpo anti- $\beta$ -catenina fue gentilmente cedido por la Dra. Cecilia Varone, los anticuerpos anti-fosfo-ERK1/2 y anti-ERK2, por el Dr. Omar Coso y el anticuerpo anti-GAPDH por la Dra. Alejandra Guberman.

### **Tinción con Oil-Red-O**

Se preparó una solución stock de Oil-Red-O al 0,4% en isopropanol. La solución de trabajo se preparaba en el momento de realizar la tinción mezclando

solución stock y agua destilada en proporción 3:2. Esta mezcla se deja reposar durante 30 min y luego se filtra con papel de filtro previo a su uso.

Los cultivos de células 3T3-L1 fueron lavados tres veces con PBS y fijados con formaldehído al 4% en PBS durante 30 min a temperatura ambiente. Luego, las células fijadas se lavaron dos veces con agua destilada y una vez con isopropanol 60% en agua. A continuación se les agregó solución de trabajo de Oil-Red-O hasta cubrir la monocapa y se incubó durante 30 - 60 min a temperatura ambiente. Finalmente se las lavó varias veces con agua hasta eliminar el exceso de colorante. Las células se observaron en microscopio y se tomaron fotografías de distintos campos. También se tomaron fotografías de las placas enteras.

## **Cuantificación de mRNA por RT-qPCR**

### *Extracción de RNA*

Para obtener el RNA total de los cultivos se utilizó el reactivo TRI Reagent (Molecular Research Center) siguiendo las indicaciones del fabricante. En los cultivos de adipocitos, luego de lisar las células con el reactivo pero antes de agregar cloroformo, se realizaba un paso de centrifugación a 12 000 g durante 15 min a 4 °C para separar los lípidos. De esta manera, los lípidos forman una fina capa en la superficie del reactivo; dicha capa es descartada y se continúa la extracción de RNA a partir de la fase inferior. En todos los casos el *pellet* de RNA obtenido se disolvió en agua libre de nucleasas (Biodynamics). A continuación se estimó la concentración de RNA a partir de 1 o 2  $\mu$ l de muestra midiendo la absorbancia a 260 nm en un espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific). También se evaluó la calidad de las muestras a partir de las relaciones de absorbancia A260/A280 y A260/A230.

### *Retrotranscripción*

Para la síntesis de cDNA a partir de RNA total, en un volumen de 7  $\mu$ l se mezclaron 1  $\mu$ g de RNA y 0,25  $\mu$ g de Oligo (dT)<sub>15</sub>. Esta mezcla se incubó durante 5 min a 70 °C para desnaturalizar el RNA, e inmediatamente se la puso en hielo por 5 min. A continuación se le agregaron 5,5  $\mu$ l de otra mezcla conteniendo: 100 U de enzima MMLV Reverse Transcriptase (Promega) o RevertAid Reverse Transcriptase (Thermo Scientific), *buffer* de reacción y 0,5 mM de cada dNTP. La reacción se llevó a

cabo incubando a 42 °C durante 1 h y finalmente se detuvo por incubación a 70 °C por 10 min. Las muestras luego se conservaron a -20 °C.

#### *PCR cuantitativa en tiempo real*

Los niveles relativos de distintos mRNA se determinaron por PCR cuantitativa en tiempo real. Cada reacción de PCR se llevó a cabo en un volumen final de 25 µl conteniendo:

- 5 µl de una dilución 1/10 de cDNA
- 200 nM de oligonucleótido *forward*
- 200 nM de oligonucleótido *reverse*
- 0,2 mM de cada dNTP
- 3 mM de MgCl<sub>2</sub>
- 1 U de Platinum Taq DNA Polymerase (Invitrogen)
- Buffer de reacción de la enzima

Cada reacción de PCR se realizó por duplicado en un termociclador Bio-Rad MyIQ2 y se usaron las siguientes condiciones: 5 min a 94 °C; 40 ciclos de: 20 s a 94 °, 30 s a 58, 60 o 62 °C (según el par de oligonucleótidos) y 40 s a 72°C. A continuación se realizaba la determinación de la *melting-curve*, para controlar la especificidad de la reacción.

El análisis de las curvas de amplificación y la determinación de la expresión relativa de cada mRNA se realizaron utilizando el software Bio-Rad IQ5. La expresión de cada mRNA se normalizó utilizando el mRNA del gen *Rplp0* como referencia.

Los oligonucleótidos para detectar los mRNA de *Mcam* y Perilipina (*Plin1*) se diseñaron con el programa Primer3 v0.4.0 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>), mientras que las secuencias de los oligonucleótidos para *Pparg2* y el mRNA de la Proteína ácida ribosomal P0 (*Rplp0*) se obtuvieron de trabajos publicados [165, 166]. Los oligonucleótidos para Adiponectina (*Adipoq*), fueron gentilmente cedidos por la Dra. Graciela Piwien-Pilipuk. En todos los casos, mediante la herramienta bioinformática Primer BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) se verificó la especificidad de los oligonucleótidos y en un gel de agarosa 2% preparado en buffer Tris 45 mM, ácido bórico 45 mM, EDTA 1 mM (TBE 0,5X) se controló la formación del producto de PCR esperado. Las secuencias de los oligonucleótidos utilizados para la

determinación de cada mRNA, sus correspondientes temperaturas de hibridación y el tamaño de los fragmentos amplificados se describen en la tabla I.

**Tabla I. Lista de oligonucleótidos usados para RT-qPCR**

<i>Gen</i>	<i>Primer</i>	<i>Secuencia</i>	<i>Temperatura de hibridación</i>	<i>Tamaño fragmento</i>
<i>Mcam</i>	Forward	ATTGGTGGCAAATCCTTCTG	62 °C	131 pb
	Reverse	CACAAGGACCAATGTGAACG		
<i>Plin1</i>	Forward	TGAAGGGTGTACGGATAACG	58 °C	110 pb
	Reverse	TGAAGGGTATCGATGTCTCG		
<i>Pparg2</i>	Forward	CCAGAGCATGGTGCCTTCGCT	58 °C	241 pb
	Reverse	CAGCAACCATTGGGTCAGCTC		
<i>Adipoq</i>	Forward	CAGTGGATCTGACGACACCA	58 °C	433 pb
	Reverse	CGAATGGGTACATTGGGAAC		
<i>Rplp0</i>	Forward	GAGGAATCAGATGAGGATATGGGA	58 °C	72 pb
	Reverse	AAGCAGGCTGACTTGGTTGC		

## Inmunofluorescencia

Para los estudios de inmunofluorescencia de PPAR $\gamma$  y de MCAM, las células se cultivaron sobre cubreobjetos de vidrio en placas de 24 pocillos. A los 7 días luego de la inducción de la diferenciación se descarto el medio de cultivo, las células se lavaron con PBS y se fijaron con formaldehído 4% en PBS durante 15 min a temperatura ambiente. Luego de lavar dos veces con PBS frío, las células se permeabilizaron por 10 min con Tritón X-100 al 0,25% en PBS, para PPAR $\gamma$ , o con Saponina 0,5% en PBS, para MCAM. A continuación los cultivos se volvieron a lavar con PBS y se realizó el bloqueo con BSA 1%, Glicina 300 mM, Tween-20 0,025% en PBS por 1 hora a temperatura ambiente. Después se incubó con 50  $\mu$ l de anticuerpo primario diluido en solución de bloqueo, en una cámara húmeda a 37 °C durante 1 hora. Posteriormente se lavó con PBS y se incubó durante 1 hora con 100  $\mu$ l del anticuerpo secundario diluido en solución de bloqueo a temperatura ambiente y en oscuridad y terminada la incubación se lavó con PBS 3 veces.

En las inmunofluorescencias de MCAM previo al montaje se tiñeron los núcleos con Hoechst 33258 (Sigma) y las gotas lipídicas con Bodipy 493/503 diluido 1/2000 en PBS (Molecular Probes), con lavados entre tratamientos. Finalmente, los cubreobjetos se montaron con glicerol-PBS sobre portaobjetos. Las muestras para PPAR $\gamma$  se vieron



en un microscopio Nikon Eclipse e600, equipado con cámara color Nikon Coolpix 5000. Las muestras para MCAM se vieron en microscopio invertido Olympus IX-71, equipado con una cámara QImaging EXi Aqua. Las imágenes se procesaron usando el programa ImageJ.

Los pares de anticuerpos utilizados y sus diluciones fueron los siguientes:

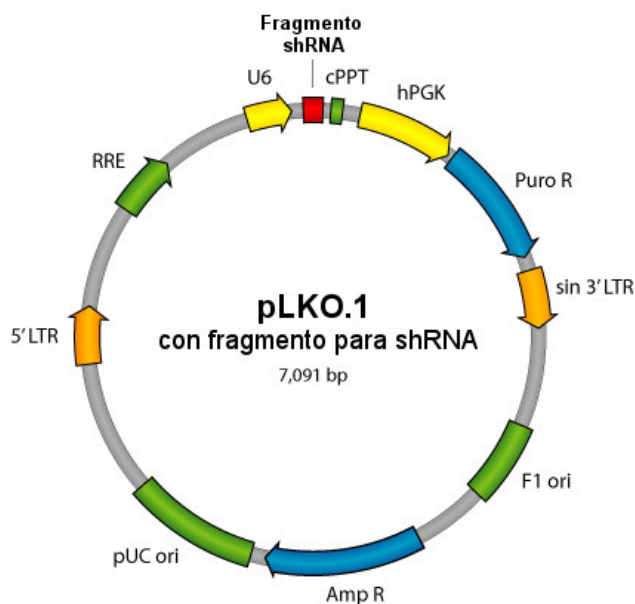
- Primario anti-PPAR $\gamma$  (C26H12, Cell Signaling) dilución 1/200
- Secundario para PPAR $\gamma$ : conjugado con Cy2 (Santa Cruz) dilución 1/200. Gentilmente cedido por la Dra. Alejandra Guberman
- Primario anti-CD146/MCAM (EPR3208, Abcam), dilución 1/75
- Secundario para MCAM: conjugado con Alexa555 (Molecular Probes) dilución 1/500. Gentilmente cedido por la Dra. Flavia Saravia

### **Construcción de vectores lentivirales para RNAi**

Para realizar el silenciamiento de la expresión de MCAM en las células 3T3-L1, generamos vectores lentivirales basados en el sistema pLKO.1 que contienen secuencias de shRNA contra el mRNA de *MCAM*, de modo de lograr la inhibición de su expresión por mecanismos de interferencia de RNA (RNAi). Estos vectores son de expresión constitutiva y pueden ser utilizados mediante transfección o transducción.

El plásmido pLKO.1 fue amablemente cedido por el grupo del Dr. Compagno, del Departamento de Química Biológica FCEN-UBA. En el pLKO.1 se clona un fragmento de DNA conteniendo la secuencia para el shRNA bajo el promotor U6 humano, y por lo tanto la transcripción del shRNA es constitutiva y depende de la RNA Polimerasa III. El vector también expresa un gen que confiere resistencia frente al antibiótico Puromicina, lo cual permite la selección de aquellas células que incorporaron el vector. Finalmente, también cuenta con diversos elementos necesarios para su propagación en bacterias y su inclusión en las partículas de lentivirus (Figura 15).

Las secuencias para generar los fragmentos de DNA a clonar se obtuvieron de la base de datos TRC (<http://www.broadinstitute.org/rnai/public/>). Las correspondientes secuencias blanco y la localización de estas en el mRNA de MCAM de ratón se indican en la tabla II.



**Figura 15. Mapa del vector pLKO.1 con fragmento que codifica un shRNA.** Modificado de <http://www.addgene.org/plko>

**Tabla II. Lista de oligonucleótidos usados para la generación de shRNAs**

Identificador	Secuencia Blanco	Localización
TRCN0000113082	CCGACTCGTAAGAGTGAATTT	CDS
TRCN0000113084	ACCGAGTTCATATCCAGTCAT	CDS
TRCN0000375735	TACATCGATCTGAGGCATTAG	CDS

El armado de los fragmentos de DNA conteniendo las secuencia para los shRNA y la preparación del vector, se realizaron siguiendo las instrucciones del protocolo de Addgene (<http://www.addgene.org/plko>) con algunas modificaciones.

#### *Armado de los fragmentos a clonar*

Cada fragmento de DNA se forma por hibridación de dos oligonucleótidos de unos 60 nt. Para ello, en un tubo se mezclaron 100 pmol de cada oligonucleótido, 5  $\mu$ l de buffer NEB 2 5X (Concentraciones finales: Tris-HCl 10 mM, NaCl 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, DTT 1 mM, pH 7.9) y se llevo a volumen final de 50  $\mu$ l con agua libre de nucleasas. En un baño de agua a 95 °C se incubó la mezcla durante 4 min para desnaturalizar los oligonucleótidos y a continuación se dejo enfriar el baño durante varias horas hasta alcanzar temperatura ambiente. De esta forma los oligonucleótidos se hibridaron y formaron el fragmento que posee extremos cohesivos, de manera de poder clonarlo direccionalmente entre los sitios Agel y EcoRI del vector. Dado que los

oligonucleótidos se obtienen por síntesis convencional, estos no poseen grupos fosfato en sus extremos 5' y por lo tanto no se generan concatémeros de los fragmentos durante la ligación.

#### *Digestión del vector pLKO.1 y clonado del fragmento.*

El vector pLKO.1, posee una secuencia “*stuffer*” de unos 1,9 kpb entre sitios de corte para las enzimas de restricción Agel y EcoRI. Las enzimas de restricción usadas dejan extremos cohesivos no compatibles, disminuyendo el riesgo de recircularización del vector vacío durante la ligación. El vector se digirió simultáneamente con ambas enzimas de restricción. Para eso se mezclaron en un tubo 6 µg del plásmido pLKO.1, 10 U de Agel/ BshTI (Fermentas), 10 U de EcoRI (NEB), 6 µl de Buffer O (Fermentas) y se llevo a volumen final de 50 µl con agua libre de nucleasas. La mezcla se incubó durante 2 - 3 h a 37 °C y posteriormente se inactivaron las enzimas incubando a 80 °C durante 20 min. Una alícuota se analizó en un gel de agarosa 0,8% preparado en buffer Tris 40 mM, ácido acético 20 mM, EDTA 1 mM (TAE 1X) para verificar la digestión, distinguiéndose el vector sin cortar (~9 kpb) del vector cortado por ambas enzimas (~7 kpb) y del fragmento “*stuffer*” (~1,9 kpb). Una vez verificada la reacción la totalidad de la muestra se corrió en un gel preparativo de agarosa 0,8% en TAE 1X. Luego de su visualización, se extrajo la banda correspondiente al vector cortado, y se purifico el DNA utilizando el kit comercial QIAEX II Gel Extraction Kit (Qiagen).

Para el clonado del fragmento con secuencia para shRNA en el vector pLKO.1 se mezclaron en un tubo 40 ng de vector digerido, 6 µl del fragmento a clonar, 1 µl de enzima T4 DNA Ligasa (NEB), 2 µl de buffer de la enzima y se llevaron a volumen de 20 µl con agua libre de nucleasas. Se incubo durante unas 18 h a 16 °C.

#### *Transformación de bacterias con el vector pLKO.1 con shRNA*

Se probaron distintas condiciones de transformación por shock térmico utilizando bacterias *E. coli* de la cepa DH5α, sin embargo no se obtuvieron transformantes con el vector deseado. Por lo tanto en colaboración con la Dra. Laura Raiger lustman del Departamento de Química Biológica FCEN-UBA se realizó la transformación de bacterias de la cepa TOP10 por electroporación. La detección de bacterias transformantes se realizó por PCR, luego de disgregar una pequeña muestra de la colonia en 20 µl de agua y calentarla a 100 °C durante 15 min para romper las células. Una alícuota se utilizó para la reacción de PCR como se detalla a continuación:

1,2 µl lisado de bacterias,  
6,2 µl de GoTaq PCR Mix (Promega)  
300 nM *Primer Forward* (ACCCGACAGGCCCGAAGGAA)  
300 nM *Primer Reverse* (GCCGCGGCCAAAGTGGATCT)  
ddH<sub>2</sub>O a 12,5 µl

Las condiciones de temperaturas utilizadas para la PCR fueron:

2 min 95 °C  
35 ciclos de:  
    45 s a 95 °C  
    45 s a 60 °C  
2 min a 72 °C  
Extensión final: 5 min a 72 °C.

En paralelo se realizó una reacción de PCR utilizando una muestra del plásmido pLKO.1 como control. Luego de la PCR, en un gel de agarosa 1% en TAE 1X se corrieron las muestras y se tiñó el gel bañándolo con bromuro de etidio 5 µg/ml en TAE 1X. Las colonias positivas muestran una banda de aprox. 640 pb.

#### *Cultivo de bacterias transformadas y purificación de plásmidos*

Todos los cultivos de bacterias transformadas se llevaron a cabo en medio LB suplementado con ampicilina 100 µg/ml. Es importante destacar que las bacterias que contenían el plásmido pLKO.1-shRNA o vacío crecieron de manera más lenta. Para purificar cantidades suficientes de plásmido, se tomo una parte de una colonia de bacterias transformantes con escarbadietes y se utilizó para inocular un precultivo de 3 ml que se incubo durante 8 h a 37 °C en agitación constante. Luego se centrifugó el precultivo, se resuspendió el pellet en 1 ml de medio de cultivo fresco y se uso para inocular 150 ml de medio de cultivo, que fue incubado a 37 °C durante unas 20 h con agitación constante de aproximadamente 200 rpm. A continuación se centrifugo el cultivo a 7000 g durante 10 min a 4 °C para bajar las bacterias. A partir del pellet obtenido se purificó el plásmido utilizando el kit comercial NucleoBond® Xtra Maxi (Macherey-Nagel) siguiendo las instrucciones del fabricante.

## Producción de lentivirus

A continuación se detalla el protocolo utilizado para la producción de lentivirus. Es importante destacar que si bien los lentivirus generados son defectuosos para su replicación, son capaces de infectar células humanas. Por lo tanto, la producción de partículas lentivirales y la transducción de células 3T3-L1 fueron realizadas con las medidas de bioseguridad requeridas de nivel BSL2+.

El vector pLKO.1 puede ser utilizado con sistemas de producción de virus de segunda o tercera generación. Estos difieren en que en los de tercera generación los genes necesarios para producir las partículas virales están distribuidos en más vectores. En este trabajo utilizamos un sistema de segunda generación compuesto por los vectores pCMV- $\Delta$ R8.9 y pCMV-VSVG, los cuales fueron gentilmente provistos por el Dr. Damián Romero. El vector pCMV- $\Delta$ R8.9 contiene los genes para el empaquetamiento del RNA viral y las proteínas que median la inserción de su secuencia en el genoma de la células huésped. Por su parte el vector pCMV-VSVG posee las secuencias para las proteínas de la envoltura que le confieren el tropismo al virus, es decir el tipo de células y especies que puede infectar. En particular, la envoltura VSVG permite que las partículas infecten un amplio espectro de tipos celulares de diferentes especies.

Las células de la línea HEK293FT, gentilmente cedidas por el Dr. Damián Romero, se utilizaron para la producción de las partículas virales. Estas células fueron cultivadas en DMEM+SFB, de manera similar a la línea 3T3-L1.

Para la producción de lentivirus, se inocularon células en placas de 6 pocillos de manera que al día siguiente estuvieran en aproximadamente en un 60 a 70% de confluencia, y se cultivaron durante 24 h en medio DMEM suplementado con 10% de SFB pero sin el agregado de antibióticos. Al día siguiente se transfectaron de acuerdo al siguiente protocolo

Por cada pocillo a transfectar se prepara un tubo conteniendo:

- 100  $\mu$ l de DMEM
- 1,3  $\mu$ g del vector lentiviral
- 0,9  $\mu$ g de plásmido pCMV- $\Delta$ R8.9
- 0,3  $\mu$ g de plásmido pCMV-VSVG

En otro tubo se mezclan 100  $\mu$ l de DMEM y 6  $\mu$ l de Lipofectamina 2000 (Invitrogen). Se incuba durante 5 min. A continuación se mezclan los contenidos de ambos tubos, y se incuba durante 20-30 minutos para la formación de complejos de transfección. Transcurrido ese tiempo se agregan los complejos gota a gota en el pocillo a la vez que se mueve suavemente la placa para homogeneizar. Se cultivan las células durante 5-6 horas en estufa a 37 °C y luego se cambia el medio por 1,5 ml de DMEM+SFB sin antibióticos.

A las 48 y 72 horas posteriores a la transfección se realizan la primera y segunda cosecha de virus, respectivamente. Para eso se extrae el medio de cultivo conteniendo las partículas virales con una jeringa sin aguja. Se coloca un filtro de 0,45  $\mu$ m en la jeringa y se pasa el contenido a un tubo. Este paso es importante para eliminar células y restos celulares que pudieran contaminar los cultivos de las células a ser transducidas. A las células que se les extrajo el medio a las 48 h se les renueva el medio de cultivo. Estas suspensiones virales se utilizan para transducción como se indica a continuación.

Para generar líneas celulares que expresen el vector lentiviral, se crecen fibroblastos 3T3-L1 en placas de 6 pocillos de manera que el día de la primer cosecha de virus estén en aproximadamente un 30-40% de confluencia. En general se preparan el día anterior a la transducción.

Para la transducción, se retira el medio de cultivo de las células 3T3-L1 y se reemplaza por el medio conteniendo las partículas lentivirales. Al día siguiente, se reinfectan las células repitiendo este procedimiento. Luego de 24 h se les cambia el medio a las células infectadas y se agrega puromicina en concentración 5  $\mu$ g/ml como agente de selección. La selección se realiza durante 4 -6 días, con cambios de medio conteniendo puromicina cada 48 h. Posteriormente las células se propagan, una parte se congela para su conservación y el resto se utilizan para los experimentos.

Como control negativo en los experimentos se utilizó el vector pLKO.1 vacío, sin stuffer ni secuencia para shRNA el cual fue generado y gentilmente cedido por el Lic. Javier Brandani.

## **Análisis de expresión génica por *microarrays***

Células 3T3-L1 cultivadas en placas de 9 cm<sup>2</sup> fueron tratadas por triplicado con medio control, ID, IDM o ID+8CPT y al cabo de 3 días de cada cultivo se obtuvo el RNA total de utilizando el reactivo TRI Reagent según las indicaciones del fabricante. También se obtuvo RNA total de un único cultivo de o ID+8CPT de 9 días. Los *pellets* de RNA en etanol 75% se enviaron al laboratorio del Dr. Damián Romero en el Univeristy of Mississippi Medical Center donde se finalizó la extracción del RNA utilizando el kit comercial Qiagen RNAeasy Mini, se le realizó un tratamiento con DNasa, y se verificó su integridad y calidad con el equipo Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent).

Las muestras luego fueron enviadas al Northwestern University Genomics Core donde fueron procesadas y se realizó la hibridación con *microarrays* Illumina MouseRef-8 v2.0 Expression BeadChip Serial# V2\_0\_R2\_11278551\_A (Illumina). Estos poseen 25.697 sondas que abarcan casi la totalidad del transcriptoma de ratón. Los valores de intensidad fueron normalizados por *cubic spline* sin sustracción de fondo utilizando el software GenomeStudio v1.8.0 (Illumina). Los datos obtenidos fueron analizados estadísticamente en colaboración con el Dr. Damián Romero utilizando el software GeneSpringGX v12.0 (Agilent), realizando una corrección de línea de base utilizando la intensidad mediana de todas las muestras. Luego los datos fueron filtrados para obtener indicadores de “Presente” o “Marginal” en el 100% de las muestras en al menos una condición experimental. Finalmente los datos fueron transformados usando el logaritmo en base 2 y analizados por ANOVA de dos vías con la corrección para múltiples pruebas Benjamini-Hochberg FDR (*False Discovery Rate*) y se realizaron pruebas *post hoc* de Student-Newman Keuls (SNK). Se usó un punto de corte de cambio (*Fold Change*) de 1,5 veces.

## **Inmunoprecipitación de cromatina (ChIP)**

Las células 3T3-L1 se cultivaron en 3 placas de 10 cm y nueve días después de inducir la diferenciación con IDM+Pio alcanzaron un 80% de diferenciación y se las utilizó para los experimentos de ChIP como se explica a continuación.

Cada placa se trató con formaldehído 1% en PBS durante 10 min a temperatura ambiente que luego se neutralizó con Glicina 0,125 M. Las células de

cada placa se cosecharon, se pasaron a un tubo y luego de centrifugarlas se resuspendieron en 1 ml de Buffer I (PIPES 5 mM pH 8, KCl 85 mM, NP-40 0,5%, e inhibidores de proteasas) y se incubaron durante 10 min en hielo. A continuación se aislaron los núcleos por centrifugación, y posteriormente fueron lisados en buffer II (Tris-HCl 50 mM pH 8,1, EDTA 10 mM, SDS 1% con inhibidores de proteasas). Para obtener fragmentos de cromatina de unos 500 pb los lisados fueron sonicados en un equipo Diagenode Bioruptor durante 5 min a potencia máxima con ciclos 30 s ON – 30 s OFF en agua helada. Se tomo una alícuota de la muestra para cuantificar la concentración de DNA y verificar su nivel de fragmentación por electroforesis en un gel de agarosa 1,7%

Una vez verificado el sonocado se continuó con la inmunoprecipitación de la cromatina. Primero se realizó el preclareado de la cromatina utilizando bolitas de agarosa unidas a proteína A, previamente bloqueadas con BSA y DNA de esperma de salmón, para eliminar aquello que se pueda unir inespecíficamente a las bolitas. Una parte de la preparación de cromatina se guardó para usar como *Input* y el resto se dividió en dos alícuotas conteniendo cada una aproximadamente 30 µg de DNA. A una de ellas se le agregó 5 µg de anticuerpo anti-PPAR $\gamma$  y a la otra anti-IgG control. Los tubos se incubaron durante una noche a 4 °C con rotación constante. A continuación se les agrego a cada tubo 30 µl de bolitas de agarosa-proteína A bloqueadas y se incubaron durante 2 h a 4 °C con rotación. Después de 5 lavados se eluyó la cromatina unida a las bolitas agregando Buffer de Elución (SDS 1%, NaHCO<sub>3</sub> 100 mM) e incubando durante 15 min a temperatura ambiente, se centrifugó y se recuperó el sobrenadante que contiene los fragmentos de DNA inmunoprecipitados. Para liberar el DNA de la unión a proteínas (*decross-link*) se agregó NaCl 0,2 M y se incubó una noche a 65 °C. Posteriormente se adicionaron RNasa A y Proteinasa K, y se incubó durante 1 h a 45 °C. Finalmente se extrajo el DNA con el método de fenol-cloroformo y se analizó la presencia de los fragmentos de interés por PCR cuantitativa en tiempo real utilizando los oligonucleótidos de la tabla III

Los anticuerpos utilizados fueron: anti-PPAR $\gamma$  (C26H12, Cell Signaling), anti-PPAR $\gamma$  (G-18, Santa Cruz).



**Tabla III. Lista de oligonucleótidos usados para CHIP-qPCR**

Región	Primer	Secuencia	Tamaño fragmento
<i>Fabp4</i> PPRE	Forward	AATGTCAGGCATCTGGGAAC	99 pb
	Reverse	GACAAAGGCAGAAATGCACA	
<i>Mcam</i> intrón Z1	Forward	CAACTTCTTTGCGGGTGTG	243 pb
	Reverse	AAACTGCCTTTTCCAGCAAC	
<i>Mcam</i> intrón Z2	Forward	CTGTTGCTGGAAAAGGCAGT	289 pb
	Reverse	TCGATGGCTTAAAGGAAAGC	
<i>Mcam</i> intrón Z3	Forward	CCATCGAGTAGACATGCTTTCC	207 pb
	Reverse	GTCAGTCTGGGAGGCACTAGAC	
<i>Mcam</i> intrón Z4	Forward	ACCCACTTCTCTGGCCTCTT	245 pb
	Reverse	TGTCTGGACTGTGTGGCTTC	
<i>Mcam</i> intrón Z5	Forward	TTCAAAGTTCCTGCTGTTGGT	261 pb
	Reverse	CCCACAGTAGCATGTCAAGAAAC	
<i>Mcam</i> intrón Z6	Forward	TTGTATTGCAGCGTTTCTTGAC	284 pb
	Reverse	AGAAGCTGGTGGAGAGACAGAT	
<i>Mcam</i> distal	Forward	TAATGCCAAGTCCCCTTTCA	106 pb
	Reverse	TTATGGGGAAACACCTTGGA	

**Nota:** Los oligonucleótidos *Mcam* Z1 a Z6 fueron diseñados con el programa Primer 3, mientras que *Fabp4* PPRE y *Mcam* distal se obtuvieron de Lefterova y col., 2008 [96].

### Análisis estadístico

Todos los experimentos se repitieron al menos tres veces. Los datos se expresan como media  $\pm$  desvío estándar. Para comparaciones entre dos muestras se utilizó la prueba de t de Student (t-test) y para comparaciones entre más de dos muestras y se realizó análisis de la varianza de una vía (ANOVA) seguido de la prueba *post hoc* de Bonferroni. Los análisis se realizaron con el programa GraphPad Prism 6. En todos los casos, valores de estadístico p menores a 0,05 se consideraron como estadísticamente significativos.

# Resultados

---

---

## **PARTE I**

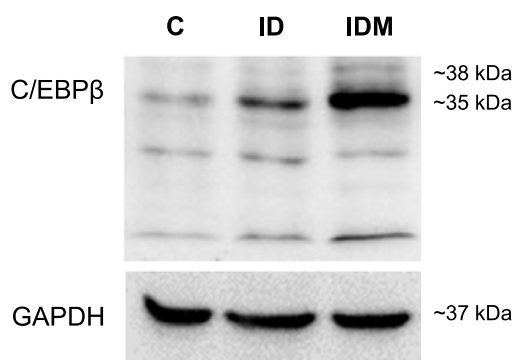
***Participación de la señal AMPc-EPAC  
en la activación de genes necesarios para la  
diferenciación de fibroblastos 3T3-L1 a adipocitos***

En la primera parte de este trabajo de tesis nos propusimos estudiar el rol de la señal AMPc-EPAC en la diferenciación de los fibroblastos 3T3-L1 a adipocitos, para lo cuál se realizaron los estudios que se describen a continuación:

### **Efecto de la presencia de MIX en la mezcla de diferenciación sobre la expresión de C/EBP $\beta$ y PPAR $\gamma$**

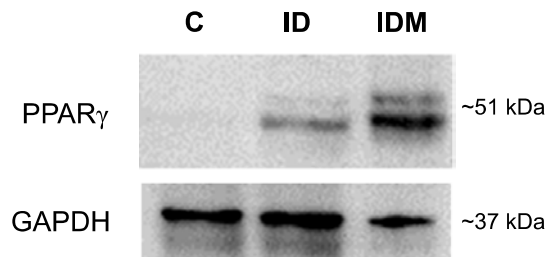
Como se mencionó en la introducción, los fibroblastos 3T3-L1 diferencian a adipocitos dentro de un período de aproximadamente 8 días luego del agregado de una mezcla que contiene insulina, dexametasona y MIX (IDM). En un trabajo previo del laboratorio se había visto que estas células no diferencian cuando se tratan con insulina y dexametasona si no se incluye MIX [68]. Por lo tanto, quisimos estudiar la contribución de la presencia de MIX sobre los niveles de dos factores de transcripción importantes para la adquisición del fenotipo adipocítico, uno de expresión temprana, C/EBP $\beta$ , y otro de expresión más tardía, PPAR $\gamma$ .

Primero tratamos cultivos postconfluentes de fibroblastos 3T3-L1 con medio sin inductores (Control, C), con insulina y dexametasona (ID) o con la mezcla completa de diferenciación (IDM), y evaluamos los niveles de los factores de transcripción por *western blot*. Como se puede ver en la figura 16, si bien luego de 24 h de tratamiento sólo con insulina y dexametasona (ID) hubo un ligero aumento de los niveles de C/EBP $\beta$  con respecto a las células control (C), la presencia de MIX en la mezcla de diferenciación (IDM) indujo un aumento mayor. De manera similar, cuando se analizó el contenido de PPAR $\gamma$  a los 8 días observamos que sus niveles estaban aumentados en los cultivos tratados con ID, pero en aquellos tratados con IDM los niveles eran aún mayores (Figura 17).



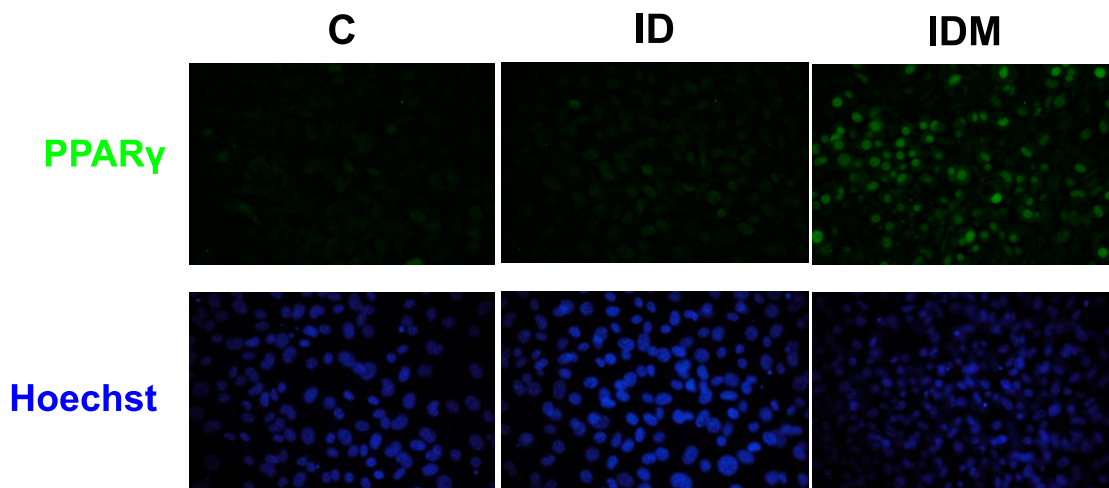
**Figura 16. Efecto de MIX en la mezcla de diferenciación sobre la expresión de C/EBP $\beta$ .** Fibroblastos 3T3-L1 con dos días de postconfluencia fueron tratados con DMEM+SFB solo (C),

con el agregado de insulina y dexametasona (ID) o con insulina, dexametasona y MIX (IDM). A las 24 h luego de la inducción se evaluaron los niveles de C/EBP $\beta$  por *western blot*.



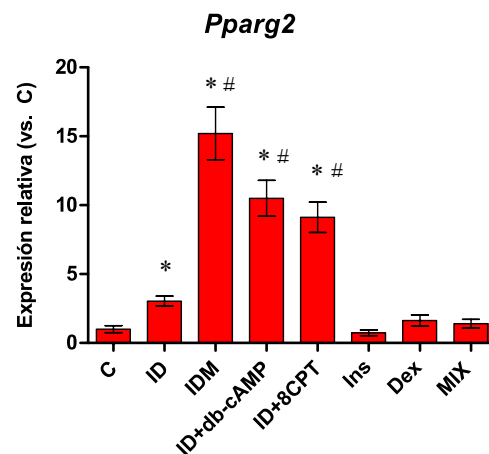
**Figura 17. Efecto de MIX en la mezcla de diferenciación sobre la expresión de PPAR $\gamma$ .** Fibroblastos 3T3-L1 con dos días de postconfluencia fueron tratados con DMEM+SFB solo (C), con el agregado de insulina y dexametasona (ID) o con insulina, dexametasona y MIX (IDM). 8 días luego de la inducción se evaluaron los niveles de PPAR $\gamma$  por *western blot*.

Dado que PPAR $\gamma$  es considerado el regulador maestro de la adipogénesis, a continuación también analizamos los efectos de la presencia de MIX en la mezcla de diferenciación sobre la cantidad de PPAR $\gamma$  por inmunofluorescencia. Encontramos que en los cultivos tratados con IDM en comparación con los cultivos tratados sólo con ID, hubo una mayor señal de PPAR $\gamma$  en los núcleos de las células luego de 8 días de tratamiento cuando las células ya diferenciaron (Figura 18).



**Figura 18. Efecto de MIX en la mezcla de diferenciación sobre la expresión de PPAR $\gamma$  evaluada por inmunofluorescencia.** Fibroblastos 3T3-L1 con dos días de postconfluencia fueron tratados con DMEM+SFB solo (C), con el agregado de insulina y dexametasona (ID) o con insulina, dexametasona y MIX (IDM). 8 días luego de la inducción se analizaron los niveles de PPAR $\gamma$  por inmunofluorescencia (verde). Los núcleos se tiñeron con Hoechst 33258 (azul). Aumento 400X.

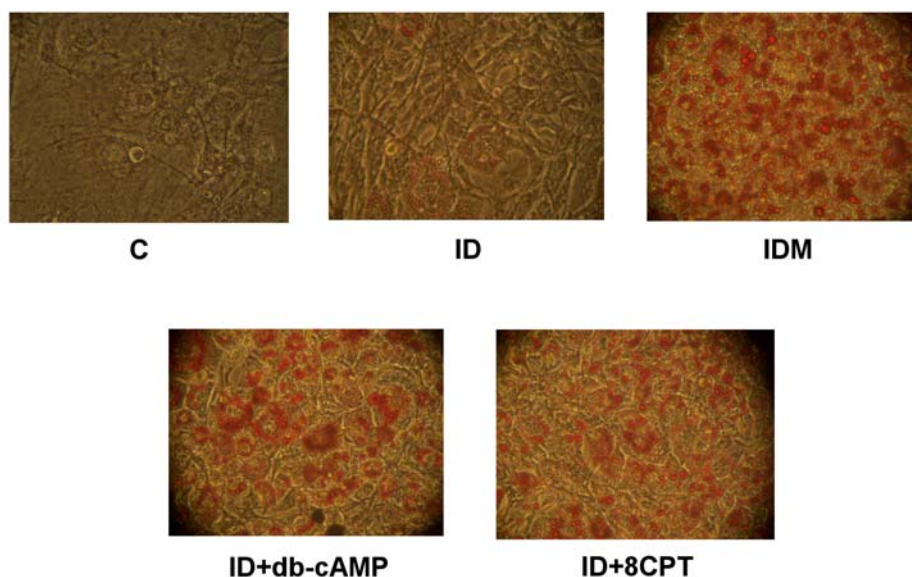
Además se analizó la expresión de PPAR $\gamma$  a nivel de su mRNA por PCR en tiempo real (RT-qPCR), técnica que se puso a punto durante el trabajo de tesis. En concordancia con los resultados anteriores, observamos que, 8 días después de la inducción, el mRNA de PPAR $\gamma$  en células tratadas con IDM se encontraba significativamente aumentado en comparación con las células controles y con aquellas inducidas sólo con ID (Figura 19), lo que se correlaciona con el grado de diferenciación obtenido pues ID no produce una diferenciación significativa (Figura 20).



**Figura 19. Efecto de MIX y análogos de AMPc en la mezcla de diferenciación sobre la expresión de PPAR $\gamma$ .** Fibroblastos 3T3-L1 con dos días de postconfluencia fueron tratados con DMEM+SFB solo (C); o con el agregado de insulina y dexametasona (ID); insulina, dexametasona y MIX (IDM); insulina, dexametasona y dibutilil-AMPc 1 mM (ID+db-cAMP); insulina, dexametasona y 8CPT 200  $\mu$ M (ID+8CPT); insulina (Ins); dexametasona (Dex) o MIX. Los análogos de AMPc se agregaron a 0 y 24 h. 8 días luego de la inducción se analizaron los niveles del mRNA de PPAR $\gamma$ 2 por RT-qPCR y su expresión se normalizó utilizando *Rplp0* como referencia. Se muestran los resultados de un experimento representativo como media  $\pm$  DE relativos al tratamiento Control). \*  $p < 0,05$ , vs C y #  $p < 0,05$  vs. ID, test *post hoc* de Bonferroni.

### Efecto de la señalización a través de AMPc-PKA en la expansión clonal mitótica y la diferenciación

Diversos trabajos han informado sobre la importancia de la señalización de EPAC en la diferenciación de los fibroblastos 3T3-L1 [54, 68, 69]. Sin embargo, Petersen y col. [54] han propuesto que EPAC es necesario para la diferenciación pero su activación no es suficiente para mediar los efectos del aumento de AMPc indicando que también se requiere la activación de PKA. Por el contrario, otros autores han informado que la actividad de PKA no es necesaria para la diferenciación [69, 167].



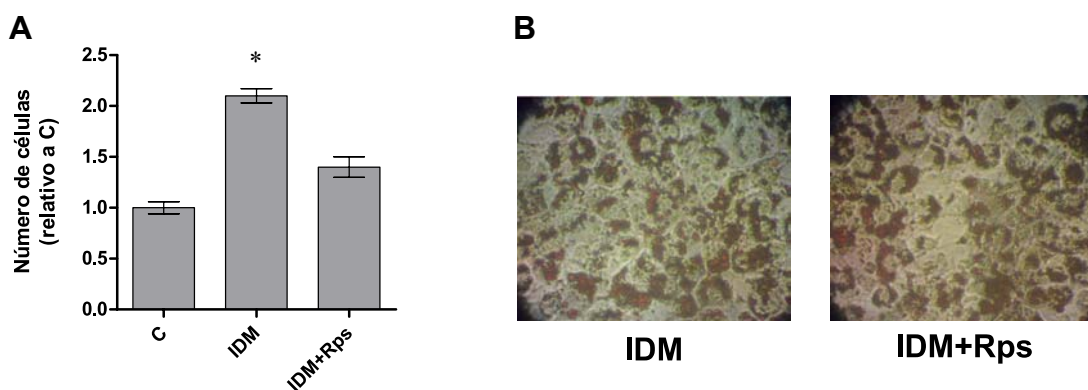
**Figura 20. Efecto de la presencia de MIX o de análogos de AMPc en la mezcla de diferenciación sobre la adipogénesis.** Fibroblastos 3T3-L1 con dos días de postconfluencia fueron tratados con DMEM+SFB solo (C), con el agregado de insulina y dexametasona (ID), insulina, dexametasona y MIX (IDM), insulina, dexametasona y dibutiril-AMPc 1 mM (ID+db-cAMP); insulina, dexametasona y 8CPT 200  $\mu$ M (ID+8CPT), los análogos de AMPc se agregaron a 0 y 24 h. 8 días luego de la inducción las gotas lipídicas se tiñeron con Oil-Red-O y se fotografiaron las células.

De acuerdo con esto último, en un trabajo previo de nuestro grupo se observó que la inhibición de PKA afecta la expansión clonal mitótica pero no la diferenciación de los fibroblastos 3T3-L1 [68]. A su vez, se vio que el reemplazo de MIX en la mezcla de diferenciación por el análogo de AMPc que funciona como agonista de EPAC, 8-pCPT-2'-O-Me-AMPc, fue capaz de inducir la diferenciación pero no la expansión clonal mitótica, sugiriendo que la diferenciación es un proceso independiente de PKA. En este trabajo previo se empleó en uno de los abordajes experimentales H89, un inhibidor muy utilizado de PKA. Sin embargo, algunos informes apuntan a la falta de especificidad de este inhibidor pues también podría actuar sobre la quinasa asociada a Rho (ROCK), la quinasa de la proteína ribosomal S6 (S6K), entre otros [168]. En particular, se ha observado que la inhibición de ROCK favorece la adipogénesis [169].

Teniendo en cuenta la controversia sobre la participación de PKA en la adipogénesis, nos pareció importante evaluar el efecto de otros inhibidores de PKA sobre expansión clonal mitótica y adipogénesis, como Rp-cAMPS y Rp-8-Br-cAMPS, que han sido utilizados previamente en la línea 3T3-L1 en forma conjunta para inhibir la actividad de esta enzima. A diferencia de H89, que actúa a nivel de las subunidades

catalíticas de la PKA, estos inhibidores actúan compitiendo con AMPc por la unión a las subunidades regulatorias [168].

Primero ensayamos el efecto de estos inhibidores sobre la expansión clonal mitótica. Para ello, los fibroblastos 3T3-L1 se trataron con los inhibidores de PKA desde 1 hora antes del agregado de la mezcla de diferenciación y tres días luego del inicio de la diferenciación se contó el número de células. Observamos que en los cultivos inducidos en ausencia de los inhibidores se produjo un aumento en el número de células respecto del encontrado en las células controles, lo cual es consistente con el reingreso de las células al ciclo celular que ocurre al comienzo del proceso de diferenciación. Por el contrario, este efecto se vio inhibido por el tratamiento con Rp-cAMPS y Rp-8-Br-cAMPS (Figura 21A).



**Figura 21. Efecto de inhibidores de PKA sobre la expansión clonal mitótica y la diferenciación.** Fibroblastos 3T3-L1 con dos días de postconfluencia fueron tratados con DMEM+SFB solo (C), con el agregado de la mezcla de diferenciación en ausencia (IDM) o presencia de Rp-cAMPS 50  $\mu$ M y Rp-8-Br-cAMPS 50  $\mu$ M (IDM+Rps). **A)** Luego de tres días se contó el número de células. Los valores se expresan relativizados a las células control como media  $\pm$  DE. \*  $p < 0,05$  vs. C, test *post hoc* de Bonferroni. **B)** 8 días luego de la inducción los lípidos se tiñeron con Oil-Red-O y se fotografiaron las células.

También se estudió el efecto de estos inhibidores sobre la diferenciación de los fibroblastos 3T3-L1. Nuevamente, los fibroblastos fueron preincubados con los inhibidores de PKA y luego inducidos por agregado de la mezcla de diferenciación. Los inhibidores se mantuvieron durante los primeros 5 días de la diferenciación y al día 8 evaluamos la acumulación de lípidos por tinción con Oil Red O. A diferencia de lo observado para la expansión clonal, no se detectaron diferencias entre los tratamientos en ausencia y presencia de Rp-cAMPS y Rp-8-Br-cAMPS (Figura 21B).



Los resultados obtenidos con estos inhibidores confirman que la expansión clonal requiere de la actividad de PKA pero no así la diferenciación.

### **Efecto del reemplazo de MIX por un agonista de EPAC en la diferenciación y la expresión de PPAR $\gamma$**

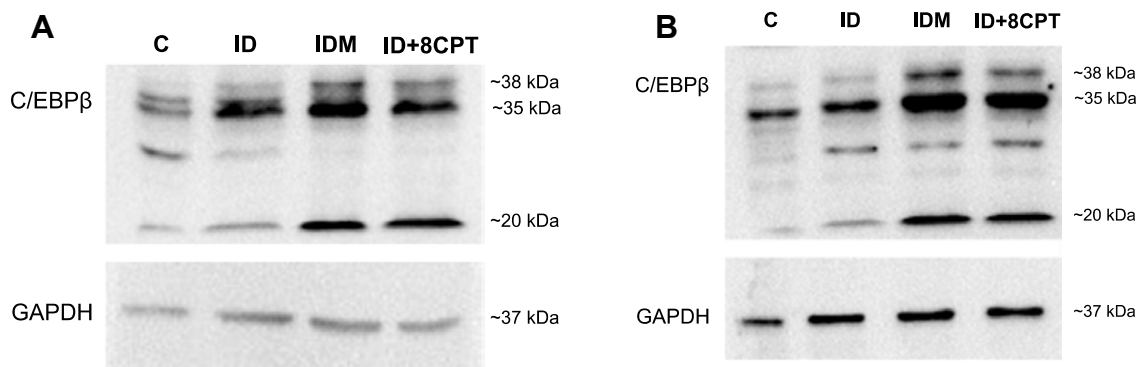
Para continuar analizando la importancia de EPAC en la diferenciación, se reemplazó MIX en la mezcla de diferenciación por dos análogos permeables de AMPc: dibutilil-AMPc (db-AMPc) u 8-(4-clorofeniltio)-2'-O-metil-AMPc (8CPT), este último activa EPAC y no PKA. La diferenciación obtenida con el agregado de estos análogos solamente al momento de iniciar la diferenciación (tiempo 0) fue menor que la observada con MIX. Sin embargo, la diferenciación mejoró cuando se agregó nuevamente mezcla de diferenciación conteniendo los análogos permeables de AMPc 24 o 48 h después de inducida la diferenciación, lo cual podría deberse a la degradación de estos compuestos por acción de fosfodiesterasas durante estos tratamientos. La mejor diferenciación y que es además similar a la obtenida con MIX, se logró con la adición de db-AMPc u 8CPT, a las 0 y 24 h (Figura 20). Por otro lado, cuando los fibroblastos 3T3-L1 se indujeron sólo con ID y recién después de 48 h se agregaron los análogos de AMPc, el efecto fue similar al que se obtiene con ID solo, lo que sugiere la importancia de su presencia en las primeras 48 h.

A continuación, reemplazamos MIX en la mezcla de diferenciación por db-AMPc o el agonista de EPAC, agregados a las 0 y 24 h y evaluamos sus efectos sobre los niveles del mRNA de PPAR $\gamma$ . En los cultivos tratados con MIX o los análogos de AMPc se observó un mayor aumento del mRNA de PPAR $\gamma$  en comparación con el tratamiento con ID (Figura 19). Por otro lado, también se evaluaron los efectos del tratamiento con cada uno de los inductores por separado para analizar la contribución de cada uno y en ningún caso estos produjeron un aumento significativo del mRNA de PPAR $\gamma$  (Figura 19), lo cual está de acuerdo con la falta de capacidad de estos para inducir la diferenciación por si solos, como se puede ver más adelante (Figura 26).

Estos resultados muestran la importancia de la presencia conjunta de insulina, dexametasona y MIX.

## Efecto del reemplazo de MIX por el agonista de EPAC en la expresión de C/EBP $\beta$

Para evaluar la participación de la señalización de EPAC en el aumento de los niveles de C/EBP $\beta$  observados en presencia de MIX, estudiamos por *western blot* los efectos del uso del análogo 8CPT sobre la expresión de este factor de transcripción temprano. En la figura 22A se puede ver que tanto con el tratamiento con IDM como con ID+8CPT se alcanzaron mayores niveles de C/EBP $\beta$  con respecto a los obtenidos con ID en las 24 h posteriores a la inducción. Se observaron resultados similares cuando se evaluaron los niveles de este factor de transcripción a las 30 h de inducida la diferenciación, después de una segunda adición del análogo de AMPc a las 24 h del inicio de la diferenciación (Figura 22B).



**Figura 22. Efecto de la presencia del agonista de EPAC en la mezcla de diferenciación sobre la expresión de C/EBP $\beta$ .** Fibroblastos 3T3-L1 con dos días de postconfluencia fueron tratados con DMEM+SFB solo (C), con el agregado de insulina y dexametasona (ID), con insulina, dexametasona y MIX (IDM) o con insulina, dexametasona y 8CPT (IDM+8CPT). A las 24 h (A) o 30 h (B) luego de la inducción se evaluaron los niveles de C/EBP $\beta$  por *western blot*.

Hasta aquí los resultados obtenidos muestran la participación de la señal AMPc-EPAC en la activación de C/EBP $\beta$  y PPAR $\gamma$ .

## Efecto del reemplazo de MIX por el agonista de EPAC en la expresión de otros genes adipogénicos

Para confirmar la capacidad del agonista 8CPT de reemplazar a MIX en la mezcla de diferenciación, se extrajeron los RNA totales de fibroblastos 3T3-L1 controles o tratados con mezclas conteniendo ID, IDM o ID+8CPT, y se los utilizó para comparar el patrón de genes expresados en los distintos tratamientos por un análisis

con *microarrays* realizado en el Northwestern University Genomics Core en conjunto con el laboratorio del Dr. Damián Romero de la Universidad de Mississippi (University of Mississippi Medical Center).

Este análisis confirmó la capacidad de IDM e ID+8CPT de aumentar la expresión de PPAR $\gamma$  con respecto a ID. De igual manera, la presencia de 8CPT fue capaz de regular genes involucrados en el proceso de adipogénesis y en el funcionamiento de los adipocitos que se sabe son regulados por PPAR $\gamma$  como Perilipina 1 (*Plin1*), G0/G1 switch gene 2 (*G0s2*), lipasa sensible a hormona (*Lipe*) y lipoproteína lipasa (*Lpl*). Otros genes importantes en la adipogénesis también fueron regulados en presencia 8CPT, como: acil-CoA sintetasa miembro 1 de la familia de cadena larga (*Acs1*), esteroil-CoA desaturasa 1 (*Scd1*), 1-acilglicerol-3-fosfato O-aciltransferasa (*Agpat2*), diacilglicerol O-aciltransferasa 2 (*Dgat2*), transportador de dicarboxilato (*Slc25a10*) (Tabla IV). Es decir, que a través de este análisis pudimos confirmar que al reemplazar MIX por 8CPT, se regulan muchos genes adipogénicos involucrados en síntesis, transporte y disponibilidad de lípidos.

**Tabla IV. Cambios en los niveles de mRNA de genes de adipocito inducidos por la presencia de MIX u 8CPT en la mezcla de diferenciación**

<i>Símbolo</i>	<i>Nombre del Gen (en inglés)</i>	<i>Número de Acceso</i>	<i>Expresión Relativa (IDM vs. ID)</i>	<i>Expresión Relativa (ID+8CPT vs. ID)</i>
<b>Genes blanco de PPAR<math>\gamma</math></b>				
<i>Pparg</i>	Peroxisome proliferator activated receptor gamma	NM_011146	4,51	3,25
<i>Srebf1</i>	Sterol regulatory element binding factor 1	NM_011480	8,23	14,20
<i>Ppargc1b</i>	Peroxisome proliferator activated receptor gamma, coactivator 1 beta	NM_133249	6,58	3,23
<i>Lipe</i>	Lipase, hormone sensitive	NM_010719	10,10	12,14
<i>Lpl</i>	Lipoprotein lipase	NM_008509	2,40	2,73
<i>Scd1</i>	Stearoyl-Coenzyme A desaturase 1	NM_009127	8,23	14,20
<i>G0s2</i>	G0/G1 switch gene 2	NM_008059	15,61	37,80
<i>Plin</i>	Perilipin	NM_175640	34,28	57,49
<b>Genes de metabolismo de lípidos</b>				
<i>Acs1</i>	Acyl-CoA synthetase long-chain family member 1	NM_007981	47,64	22,59
<i>Hsd11b1</i>	Hydroxysteroid 11-beta dehydrogenase 1	NM_008288	8,12	10,88
<i>Agpat2</i>	1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase 2	NM_026212	10,52	7,45
<i>Dgat1</i>	Diacylglycerol O-acyltransferase 1	NM_010046	7,83	5,39
<i>Dgat2</i>	Diacylglycerol O-acyltransferase 2	NM_026384	35,47	24,29
<i>Slc25a10</i>	Solute carrier family 25 member 10	NM_013770	5,96	5,46
<i>Fabp5</i>	Fatty acid binding protein 5	NM_010634	19,83	17,92

I, insulina; D, dexametasona; M, metilisobutilxantina; 8CPT, 8-pCPT-2'-O-Me-AMPC

Estos resultados, en conjunto, resaltan la capacidad de la activación de EPAC de reproducir la respuesta al tratamiento con MIX en la diferenciación de estos fibroblastos 3T3-L1 a adipocitos y contribuyen a dilucidar la importancia del cAMP en este proceso.

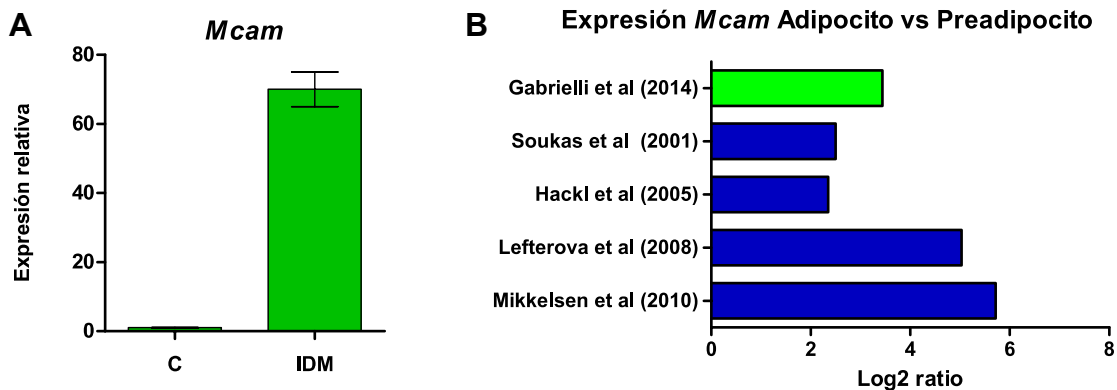
---

## **PARTE II**

***Evaluación de la expresión de MCAM durante la diferenciación de células 3T3-L1 y su importancia para la formación del adipocito***

El análisis por *microarray* realizado en la primera parte de este trabajo también nos ha permitido identificar algunos genes que varían su expresión durante la adipogénesis y cuyo rol aún no está caracterizado. Entre ellos, encontramos a MCAM cuya expresión resultó aumentada en las células 3T3-L1 diferenciadas.

A través de la determinación de los niveles del mRNA de MCAM por RT-qPCR en fibroblastos y adipocitos 3T3-L1, hemos podido confirmar el resultado del *microarray* (Figura 23A). Además, analizamos los datos obtenidos en algunos *microarrays* realizados por otros investigadores y en estos también hemos observado el aumento de la expresión de MCAM en niveles comparables a los obtenidos en nuestro análisis (Figura 23B).

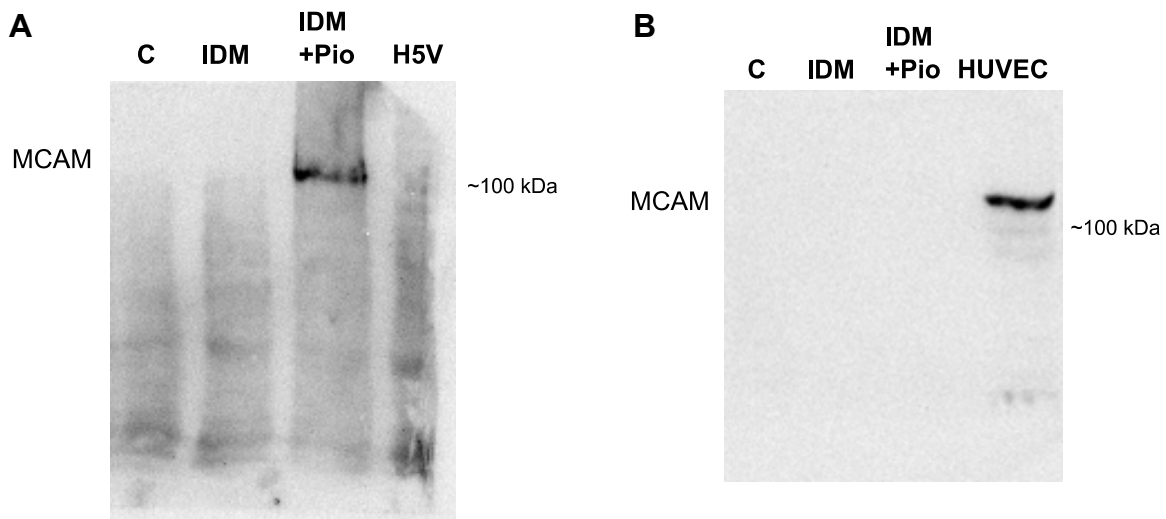


**Figura 23. Confirmación del aumento de los niveles de *Mcam* observados en el *microarray*.** **A)** Fibroblastos 3T3-L1 con dos días de postconfluencia fueron tratados con DMEM+SFB solo (C) o con el agregado la mezcla de diferenciación (IDM) y luego de 8 días se analizaron los niveles del mRNA de MCAM por RT-qPCR. Su expresión se normalizó utilizando *Rplp0* como referencia y se muestran los resultados de un experimento representativo como media  $\pm$  DE relativos al tratamiento C. **B)** Comparación del aumento de la expresión de *Mcam* observada en nuestro *microarray* (barra verde) con la de otros trabajos [96, 170-172]. Los valores de nivel de cambio se presentan con transformación logarítmica en base 2.

### Evaluación del aumento de MCAM en células diferenciadas por *western blot* e inmunofluorescencia

Para confirmar el aumento de MCAM en células diferenciadas se realizaron ensayos de *western blot*. Cuando se analizaron las muestras de cultivos inducidos con la mezcla de diferenciación no se pudo detectar la presencia de la banda correspondiente a MCAM. Por esta razón, se decidió repetir el ensayo agregando pioglitazona a la mezcla de inductores para mejorar la diferenciación final. Este compuesto es un activador de PPAR $\gamma$  [106] y cuando la diferenciación se induce en su

presencia, entre un 90 y 100% de las células adquieren el fenotipo de adipocitos, mientras que en su ausencia, el grado de diferenciación alcanzando puede variar entre un 40 a 70% según la preparación. Como puede verse en la figura 24A se observó una banda de alto peso molecular en la calle correspondiente a la muestra de células diferenciadas con el agregado de pioglitazona (IDM+Pio). Es importante señalar que si bien de acuerdo a la secuencia de aminoácidos de MCAM su peso es de unos 72 kDa, dado que esta proteína es altamente glicosilada su peso aparente en *western blot* se observa entre 100 y 150 kDa. En contraste, no se detectaron bandas en las calles correspondientes a las muestras de fibroblastos (C) o de células tratadas con IDM. Se utilizó como control positivo una preparación de la línea H5V de células endoteliales de ratón pero tampoco se pudo detectar la banda de alto peso molecular. Teniendo esto en cuenta, en otro experimento utilizamos como control positivo células de endotelio de venas umbilicales humanas (HUVEC), las cuales expresan altos niveles de MCAM [155]. En esta nueva corrida no pudimos detectar banda en la muestra de células 3T3-L1 inducidas con IDM+Pio pero se pudo confirmar la aparición de una banda de alto PM en el control positivo que fue similar a la encontrada anteriormente en la muestra de células diferenciadas en presencia de pioglitazona (Figura 24B).



**Figura 24. Evaluación de la expresión de MCAM por *western blot*.** Fibroblastos 3T3-L1 con dos días de postconfluencia fueron tratados con DMEM+SFB solo o con el agregado de la mezcla de diferenciación en ausencia (IDM) o presencia de Pioglitazona 2  $\mu$ M (IDM+Pio). Luego de siete días se determinaron los niveles de MCAM por *western blot*. **A)** Una muestra de células H5V se sembró como control positivo **B)** Una muestra de células HUVEC fue usada como control positivo.

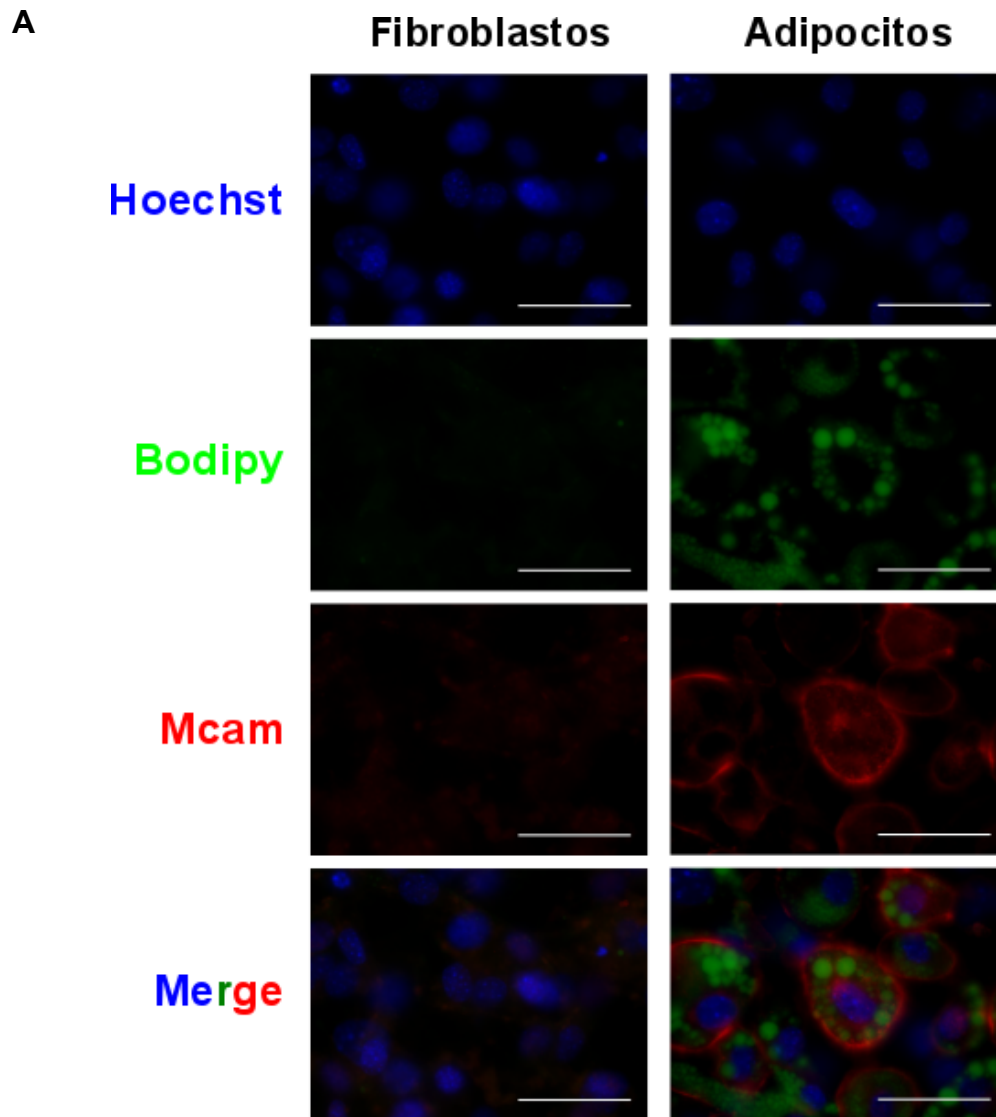
Dadas las dificultades con las determinaciones por *western blot*, decidimos emplear otra metodología con el fin de lograr una mejor respuesta del anticuerpo utilizado. Por ello a continuación analizamos por inmunofluorescencia la expresión de MCAM en células 3T3-L1 control y diferenciadas. En estos ensayos, las gotas lipídicas se marcaron con la sonda fluorescente Bodipy 493/503. Como puede verse en la figura 25A en fibroblastos 3T3-L1 los niveles de MCAM son bajos y no se observa acumulación de triglicéridos en el citoplasma. Por el contrario, en las células 3T3-L1 diferenciadas hay múltiples gotas lipídicas y los niveles de MCAM se encuentran elevados, particularmente en la membrana plasmática, lo cual está de acuerdo con la localización esperada [155]. En algunas células también hemos encontrado señal de MCAM en la región perinuclear, una distribución similar se encontró en otras células con este mismo anticuerpo (Figura 25B).

Por lo tanto, en esta segunda parte del trabajo nos interesó investigar la expresión de MCAM y su importancia en la diferenciación de los fibroblastos 3T3-L1 a adipocitos para lo cual se hicieron los estudios que se detallan a continuación.

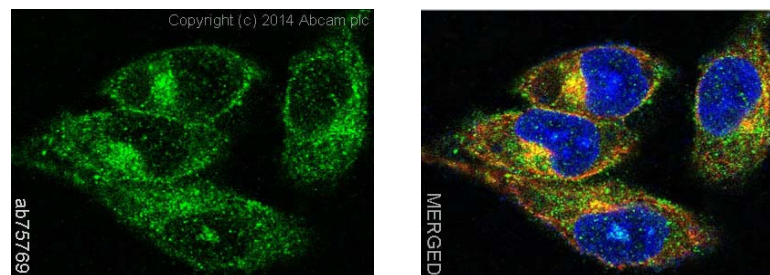
### **Efecto de los inductores de la diferenciación y distintas combinaciones de estos en el aumento del mRNA de MCAM en fibroblastos 3T3-L1**

A continuación se analizó si el incremento en la expresión de MCAM se debía a alguno de los inductores de la mezcla en particular. Para ello cultivos de fibroblastos 3T3-L1 fueron inducidos únicamente con insulina, dexametasona o MIX y se determinaron los niveles del mRNA de MCAM por RT-qPCR a los 7 días posteriores al inicio de los tratamientos. Observamos que ninguno de los tratamientos con un solo inductor fue capaz de incrementar la expresión de MCAM (Figura 26A). Además, como hemos mencionado anteriormente, estos tratamientos tampoco fueron capaces de inducir la adipogénesis (Figura 26B).



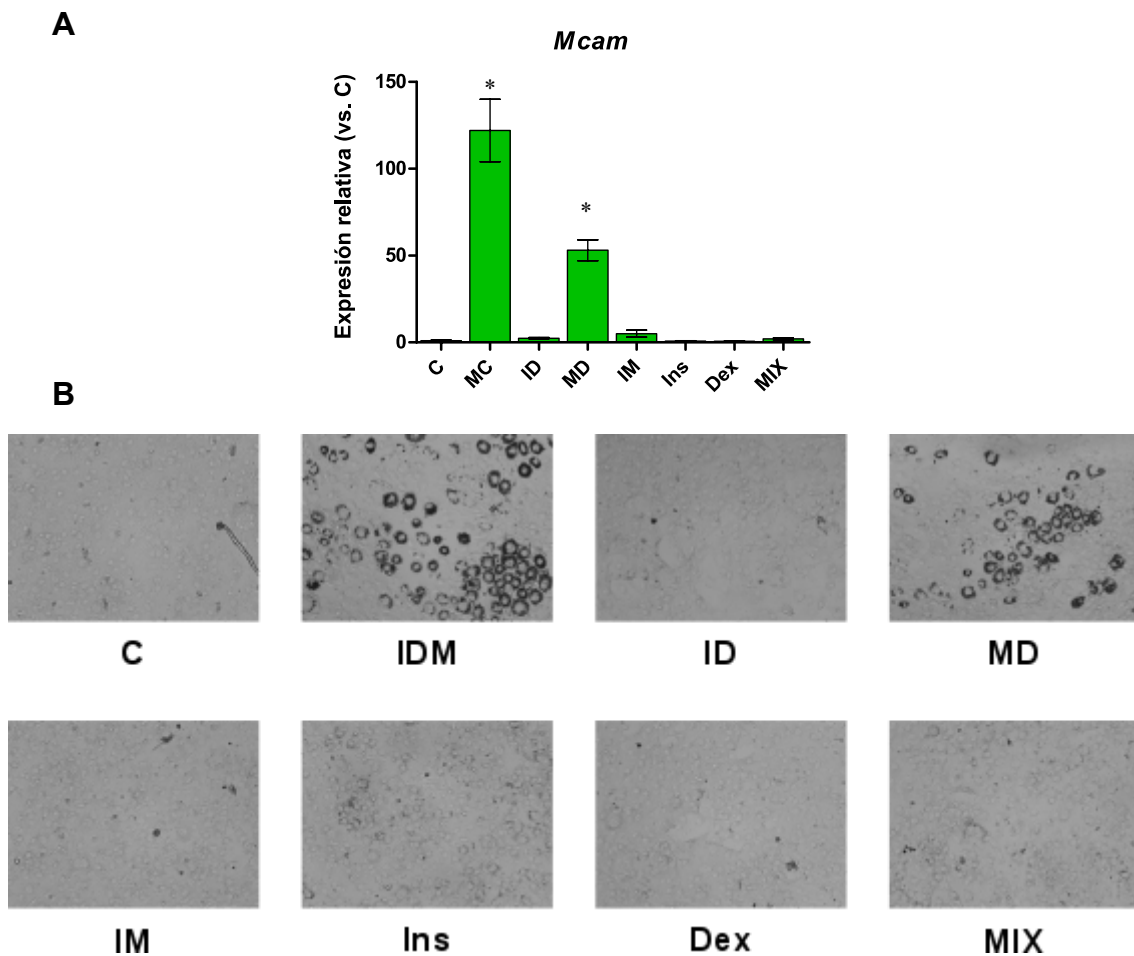


**B**



**Figura 25. Detección de MCAM por inmunofluorescencia.** (A) Fibroblastos 3T3-L1 con dos días de postconfluencia fueron tratados con DMEM+SFB solo (Fibroblastos) o con la mezcla de diferenciación (Adipocitos) y luego de siete días los niveles de MCAM se analizaron por inmunofluorescencia (rojo). Los núcleos se tiñeron con Hoechst 33258 (azul) y las gotas lipídicas con Bodipy 493/503 (verde). Barra = 50  $\mu$ m. (B) A modo de comparación se muestran imágenes de una inmunofluorescencia de MCAM en células de melanoma humano A375 (MCAM en verde, núcleos en azul, tubulina en rojo) obtenida del proveedor del anticuerpo (<http://www.abcam.com/cd146-antibody-epr3208-ab75769.html>)

Por otro lado, también estudiamos los efectos de diferentes combinaciones binarias de los inductores (ID, DM, IM). Solamente en el caso del tratamiento con DM observamos diferenciación a adipocitos aunque menor que la que se logra utilizando la mezcla completa, lo cual está de acuerdo con trabajos anteriores [51, 173]. Cuando analizamos la expresión de MCAM, encontramos que los niveles del su mRNA estaban aumentados en los cultivos tratados con DM pero tanto ID como IM no fueron capaces de inducir la diferenciación ni la expresión de MCAM (Figura 26). Es decir que no se encontró aumento de la expresión de MCAM en ausencia de diferenciación.

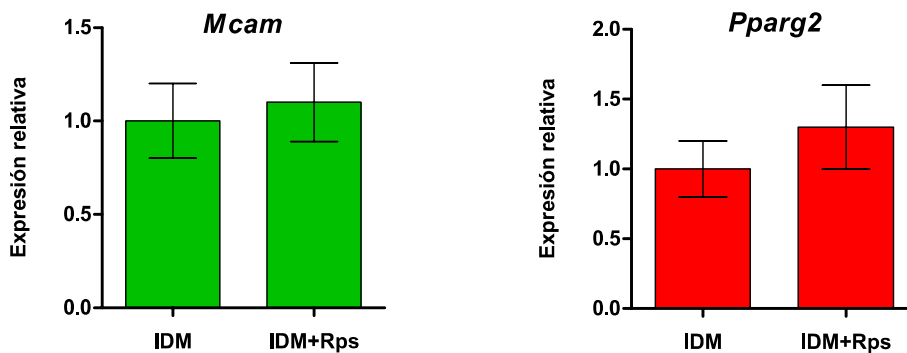


**Figura 26. Efecto de los inductores de la diferenciación sobre la expresión de MCAM y la adipogénesis.** (A, B) Fibroblastos 3T3-L1 con dos días de postconfluencia fueron tratados con DMEM+SFB solo (Control, C) o con el agregado de insulina (I), dexametasona (D) o MIX (M) solos o en diferentes combinaciones. Luego de siete días, los niveles del mRNA de MCAM fueron analizados por RT-qPCR y su expresión se normalizó utilizando *Rplp0* como referencia. Se muestran los resultados de un experimento representativo como media  $\pm$  DE relativos al tratamiento Control \*  $p < 0,05$  vs C, test *post hoc* de Bonferroni (A). Para evaluar el grado de diferenciación, las gotas de triglicéridos citosólicos se tiñeron con Oil-Red-O (B).

## Evaluación de la participación de PKA en la expresión de MCAM en células 3T3-L1

Como se mencionó en la Introducción de este capítulo, se ha visto que el tratamiento con agentes que aumentan AMPc inducen la expresión de MCAM en distintas líneas celulares y también se ha propuesto que la PKA mediaría este efecto [147-150]. Como ya hemos mencionado, en fibroblastos 3T3-L1 tratados sólo con MIX no se observaron cambios en los niveles del mRNA de MCAM, respecto de las células controles (Figura 26). Sin embargo, quisimos evaluar si en el aumento de la expresión de MCAM que se observa por tratamiento con los tres inductores de la mezcla de diferenciación no estaba involucrada la señalización a través de PKA. Encontramos que cuando las células fueron inducidas a diferenciar en presencia de los inhibidores de PKA, Rp-cAMPS y Rp-8-Br-cAMPS, la expresión de MCAM alcanzó niveles similares a los de las células inducidas sin inhibidores (Figura 27), en concordancia con la falta de efecto de estos compuestos sobre la diferenciación.

Estos resultados descartan la participación de la señalización de PKA en la activación de MCAM en la adipogénesis de los fibroblastos 3T3-L1.

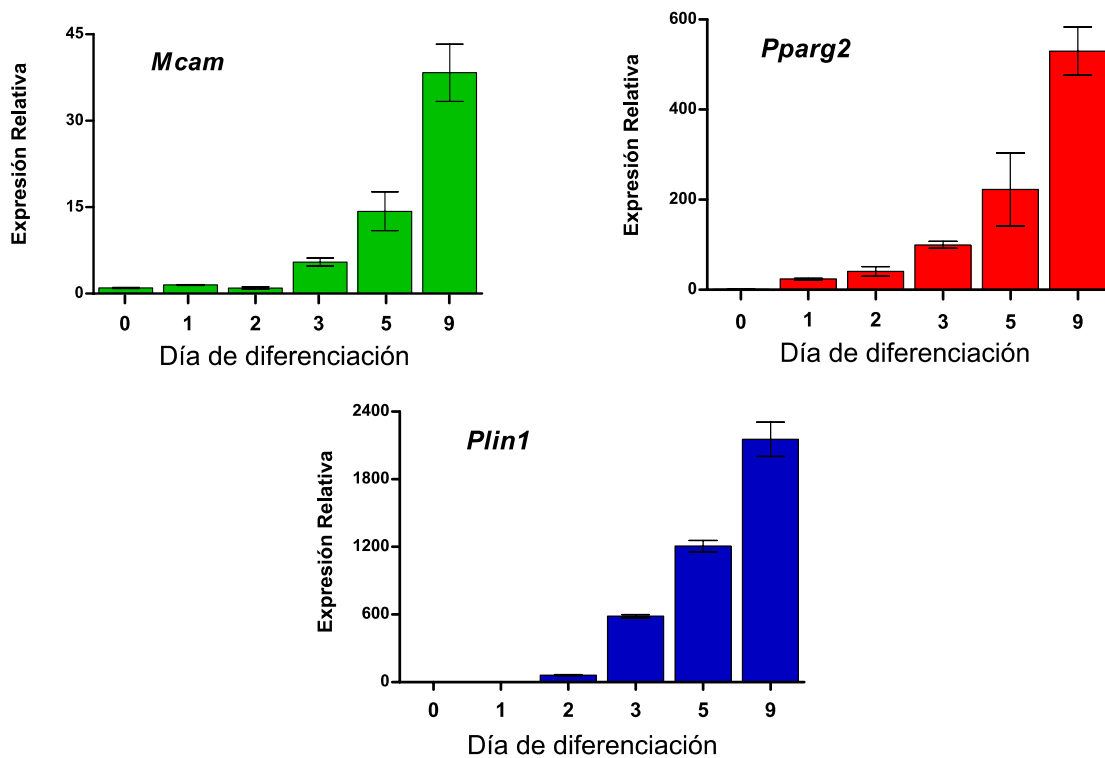


**Figura 27. Efecto de inhibidores de PKA sobre la expresión de MCAM.** Fibroblastos 3T3-L1 con dos días de postconfluencia fueron tratados con la mezcla de diferenciación en ausencia (IDM) o presencia de Rp-cAMPS 50  $\mu$ M y Rp-8-Br-cAMPS 50  $\mu$ M (IDM+Rps). 8 días luego de la inducción se evaluaron los niveles de los mRNA *Mcam* y *Pparg2* por RT-qPCR. La expresión de cada uno se normalizó utilizando *Rplp0* como referencia y se muestran los resultados de un experimento representativo como media  $\pm$  DE relativos al tratamiento IDM.

## Estudio de la expresión de MCAM durante la adipogénesis

Se quiso estudiar la variación temporal de la expresión de MCAM durante la adipogénesis y para ello determinamos los niveles de su mRNA por RT-qPCR, a

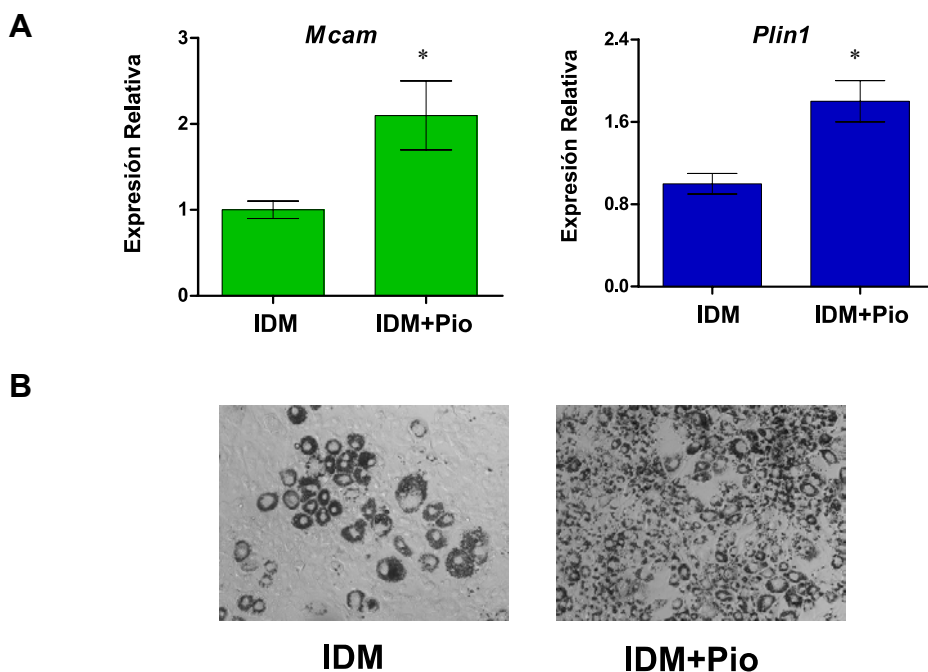
distintos tiempos luego de la inducción de la diferenciación. Observamos que el mRNA de MCAM aumenta gradualmente a partir del día 3 del tratamiento con inductores y luego sus niveles se mantienen elevados en los adipocitos maduros (Figura 28). También analizamos a distintos tiempos la expresión de PPAR $\gamma$  y de Perilipina (*Plin1*), un gen blanco de este factor de transcripción, y en contraste observamos que sus mRNA se encontraban aumentados a las 24 y 48 h posteriores a la inducción, respectivamente. Es decir, que MCAM se induce después que PPAR $\gamma$  y Perilipina.



**Figura 28. Análisis de la expresión de MCAM, PPAR $\gamma$  y Perilipina durante la diferenciación de los fibroblastos 3T3-L1.** Se trataron fibroblastos 3T3-L1 con dos días de postconfluencia con la mezcla de diferenciación y a distintos tiempos luego de la inducción los niveles de los mRNA *Mcama*, *Pparg2* and *Plin1* se analizaron por RT-qPCR. La expresión de cada uno se normalizó utilizando *Rplp0* como referencia y se muestran los resultados de un experimento representativo como media  $\pm$  DE relativos al día 0.

## Efecto del activador de PPAR $\gamma$ , pioglitazona, sobre la inducción de MCAM en las células 3T3-L1

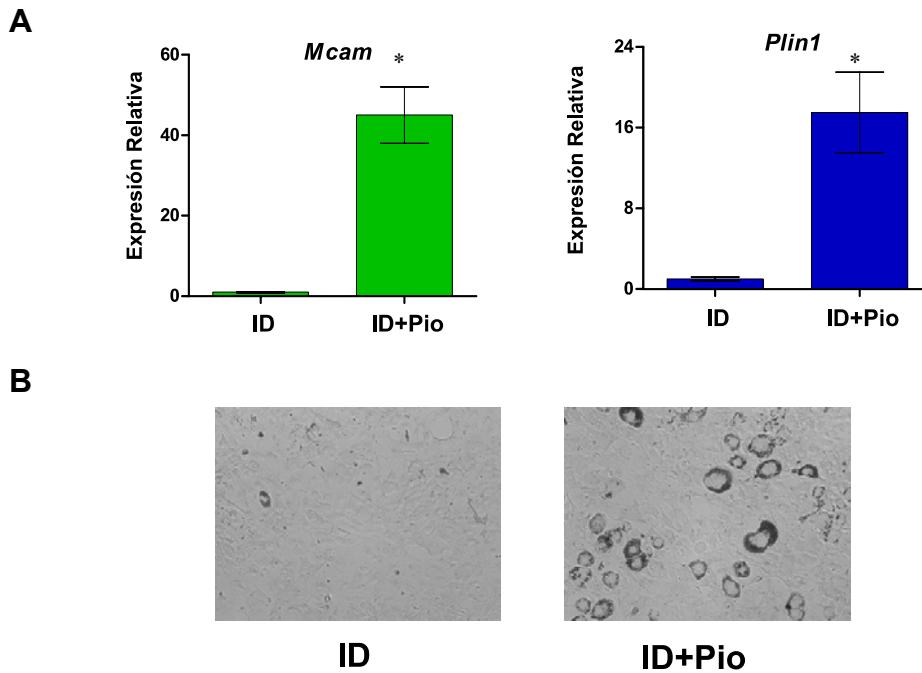
Dado que MCAM, de manera similar a Perilipina, se expresó con posterioridad a la inducción de PPAR $\gamma$ , quisimos investigar la relación entre la inducción de MCAM y la de PPAR $\gamma$ . Primero estudiamos el efecto de agregar a la mezcla de diferenciación pioglitazona (Pio), que induce la actividad transcripcional de PPAR $\gamma$  [106]. Observamos que el tratamiento con pioglitazona aumentó la acumulación de lípidos con respecto a la mezcla de diferenciación e indujo mayores niveles de los mRNA de MCAM y de Perilipina, este último se usó como control positivo de la activación de PPAR $\gamma$  (Figura 29).



**Figura 29. Efecto de Pioglitazona sobre la expresión de MCAM en células inducidas con IDM.** Fibroblastos 3T3-L1 con dos días de postconfluencia fueron inducidos a diferenciarse en ausencia (IDM) o presencia de pioglitazona 2  $\mu$ M (IDM+Pio). Luego de siete días los niveles de los mRNA *Mcam* y *Plin1* fueron analizados por RT-qPCR (**A**) o se tiñeron las gotas lipídicas con Oil-Red-O (**B**). La expresión de cada mRNA se normalizó utilizando *Rplp0* como referencia y se muestran los resultados de un experimento representativo como media  $\pm$  DE relativos al tratamiento IDM. \* $p < 0,05$ , t-test.

Como ya hemos comentado, los fibroblastos 3T3-L1 no se diferencian cuando son tratados sólo con ID [51, 173]. No obstante, observamos que cuando las células fueron inducidas con ID y pioglitazona se obtuvo diferenciación aunque ésta es menor que con IDM+Pio, lo cual concuerda con informes de otros autores [103]. Asociado a este

efecto se observó un aumento en los niveles de expresión de MCAM y de Perilipina (Figura 30).

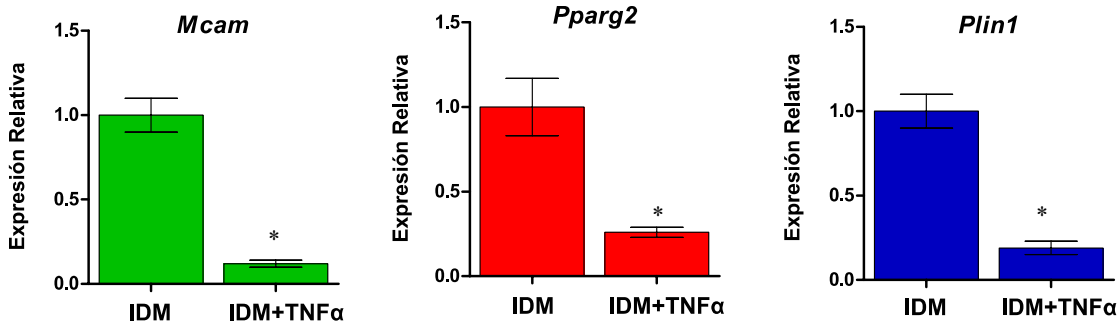


**Figura 30. Efecto de Pioglitazona sobre la expresión de MCAM en células inducidas con ID.** Fibroblastos 3T3-L1 con dos días de postconfluencia fueron tratados con insulina y dexametasona en ausencia (ID) o presencia de pioglitazona 2  $\mu$ M (ID+Pio). Luego de siete días los niveles de los mRNA *Mcam* y *Plin1* fueron analizados por RT-qPCR (**A**) o se tiñeron las gotas lipídicas con Oil-Red-O (**B**). La expresión de cada mRNA se normalizó utilizando *Rplp0* como referencia y se muestran los resultados de un experimento representativo como media  $\pm$  DE relativos al tratamiento IDM. \*  $p < 0,05$ , t-test.

### Efecto de la inhibición de la expresión de PPAR $\gamma$ sobre la inducción de MCAM en las células 3T3-L1

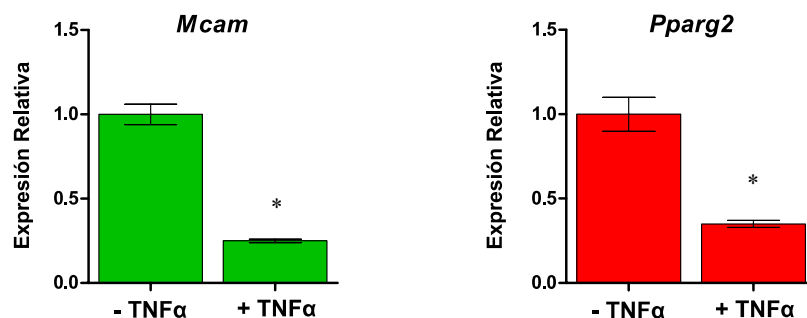
En un principio, para investigar el efecto de la inhibición de PPAR $\gamma$  sobre la inducción de MCAM, se quiso estudiar los efectos del tratamiento con el compuesto GW9662, el cual es un inhibidor de la actividad transcripcional de PPAR $\gamma$  [174] y por lo tanto impide la diferenciación y la expresión de genes blanco de este factor de transcripción. Se probaron dos lotes distintos del inhibidor (origen: Sigma) y diferentes concentraciones entre 5 y 200  $\mu$ M pero en ningún caso se logró una inhibición significativa de la diferenciación o de la expresión de Perilipina en su presencia.

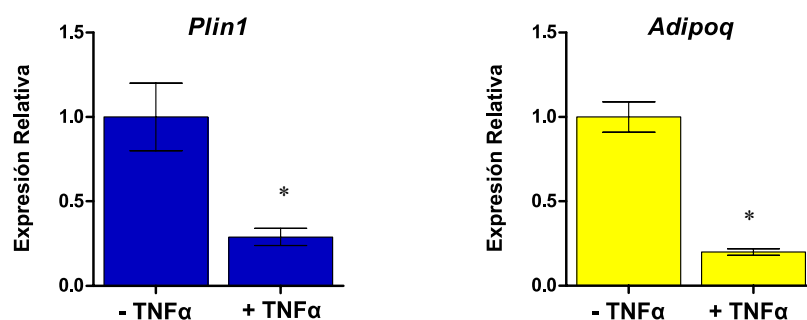
Por ello decidimos utilizar en otros ensayos la citoquina TNF $\alpha$  que es capaz de inhibir la expresión de PPAR $\gamma$  y la adipogénesis cuando se agrega junto con la mezcla de diferenciación [175]. Confirmamos que la presencia de TNF $\alpha$  durante la diferenciación de los fibroblastos 3T3-L1 produjo una inhibición en el aumento del mRNA de PPAR $\gamma$ , la cual estuvo acompañada por menores niveles del mRNA de Perilipina así como también del de MCAM (Figura 31).



**Figura 31. Efecto de TNF $\alpha$  sobre la expresión de MCAM durante la diferenciación.** Fibroblastos 3T3-L1 con dos días de postconfluencia fueron inducidos a diferenciarse en ausencia (IDM) o presencia de TNF $\alpha$  2 ng/ml (IDM+TNF $\alpha$ ). Luego de siete días los niveles de los mRNA *Mcama*, *Pparg2* y *Plin1* fueron analizados por RT-qPCR. La expresión de cada mRNA se normalizó utilizando *Rplp0* como referencia y se muestran los resultados de un experimento representativo como media  $\pm$  DE relativos al tratamiento IDM. \*  $p < 0,05$ , t-test.

Dado que también se sabe que TNF $\alpha$  altera la función del adipocito maduro y, entre otros efectos negativos, es capaz de disminuir la secreción de Adiponectina, una hormona con efectos sensibilizantes a insulina y cuyo gen es regulado por PPAR $\gamma$  [42, 175], se investigó su efecto en adipocitos. Observamos que el tratamiento de adipocitos 3T3-L1 maduros durante 48 h con TNF $\alpha$  produjo un descenso en los niveles del mRNA de PPAR $\gamma$  que fue acompañado por una disminución de los mRNAs de Adiponectina, Perilipina y MCAM (Figura 32).





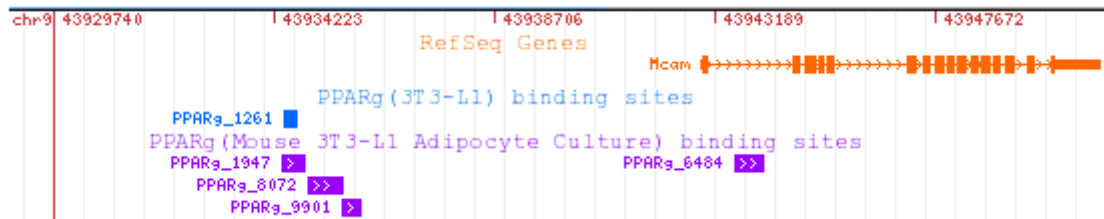
**Figura 32. Efecto de TNF $\alpha$  sobre la expresión de MCAM en adipocitos.** Adipocitos 3T3-L1 maduros (día 10) fueron tratados por 48 h con o sin TNF $\alpha$  25 ng/ml (+TNF $\alpha$  y -TNF $\alpha$ , respectivamente) y luego los niveles de los mRNA *Mcam*, *Pparg2*, *Plin1* y *Adipoq* fueron analizados por RT-qPCR. La expresión de cada mRNA se normalizó utilizando *Rplp0* como referencia y se muestran los resultados de un experimento representativo como media  $\pm$  DE relativos al tratamiento -TNF $\alpha$ . \*  $p < 0,05$ , t-test.

En conjunto, estos resultados sugieren una posible regulación de MCAM por PPAR $\gamma$ . Se busco confirmar estos resultados por experimentos de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP, por sus siglas en inglés). Durante los últimos años se han publicado varios trabajos donde se realizaron ensayos de ChIP para distintos factores de transcripción y a escala genómica durante la diferenciación [95, 96, 172]. A partir de los datos obtenidos del trabajo de Lefterova y col. [96] y de la base de datos ChIPBase (<http://deepbase.sysu.edu.cn/chipbase>) hemos encontrado que existen regiones donde PPAR $\gamma$  se podría unir dentro del primer intrón del gen *Mcam* y también a aproximadamente 8 kpb río arriba de su promotor (Figura 33). Además se ha informado que la mayoría de los sitios de unión de PPAR $\gamma$  se encuentran en intrones de sus genes blanco o en regiones intergénicas [96].

Con la idea de evaluar una posible regulación de MCAM por PPAR $\gamma$  se quiso determinar la unión de este factor de transcripción a estos sitios. Para eso se diseñaron varios pares de oligonucleótidos que abarcan distintas zonas de este intrón y la correspondiente al sitio de unión distal mencionada, así como otros para una región del gen *Fabp4* utilizada como control positivo, ya que se sabe que este gen es regulado por PPAR $\gamma$ . Se hicieron experimentos de ChIP-qPCR utilizando dos anticuerpos contra PPAR $\gamma$  disponibles en el laboratorio. Sin embargo, con ninguno de estos anticuerpos fue posible lograr una buena inmunoprecipitación de PPAR $\gamma$ , pues en el material inmunoprecipitado no se pudo detectar enriquecimiento de la región del gen *Fabp4* ni tampoco de los fragmentos del intrón de MCAM. Es importante destacar



que todos los oligonucleótidos fueron ensayados utilizando DNA genómico y se probó su capacidad de amplificar los fragmentos correspondientes de acuerdo a su diseño pese a lo cual no hemos podido demostrar la unión de PPAR $\gamma$  a sitios regulatorios del gen de MCAM en los experimentos hasta aquí realizados.



**Figura 33. Sitios de unión de PPAR $\gamma$  cercanos al gen *Mcam* de ratón.** Se muestra una captura de pantalla de la base de datos ChIPBase donde se representan regiones de unión de PPAR $\gamma$  detectadas por experimentos de ChIP-seq (indicadas como PPARg\_#####). En la zona superior derecha se muestra la estructura del gen *Mcam*, los rectángulos representan los exones y las líneas horizontales los intrones (<http://deepbase.sysu.edu.cn/chipbase>).

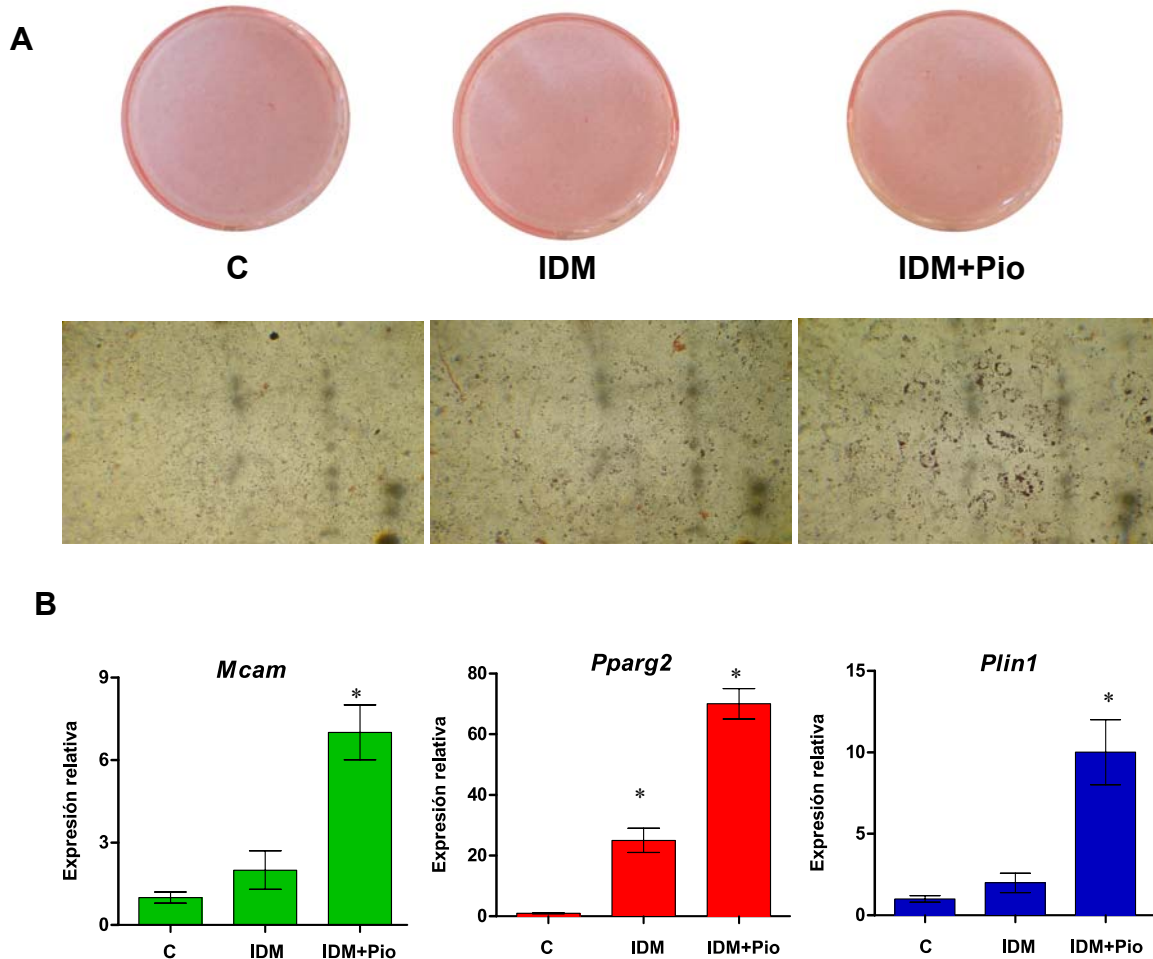
### Evaluación de los niveles de mRNA de MCAM en fibroblastos no adipogénicos

Con el fin de continuar evaluando la asociación que hasta aquí vimos entre la diferenciación y la expresión de MCAM, se utilizó la línea celular de fibroblastos NIH3T3 la cual no es capaz de diferenciar a adipocitos luego del agregado de la mezcla utilizada con las células 3T3-L1 [81]. De acuerdo con esto, cuando se utilizó el mismo protocolo de inducción de los fibroblastos 3T3-L1 en la línea NIH3T3, no pudimos observar células diferenciadas al cabo de 7 a 9 días (Figura 34). Cuando analizamos la expresión por RT-qPCR de MCAM o Perilipina, esta última fue utilizada como control positivo de diferenciación, tampoco pudimos observar aumento en los niveles de sus mRNA.

Es interesante señalar que cuando medimos el mRNA de PPAR $\gamma$  éste se encontraba elevado en las células NIH3T3 tratadas con la mezcla de inductores, pese a que no lograron diferenciar. Por ello nos preguntamos si esto podría deberse a la falta de activadores endógenos de PPAR $\gamma$  y quisimos evaluar el efecto de la adición de pioglitazona junto con la mezcla de diferenciación en estas células. Pudimos observar que en presencia del activador de PPAR $\gamma$  aunque hubo un aumento en los mensajeros de PPAR $\gamma$ , MCAM y Perilipina, estos fueron mucho menores que los que

se observan en las células 3T3-L1, y solamente un número muy bajo de células mostraron acumulación de lípidos en gotas citoplasmáticas (Figura 34).

Estos resultados confirman un rol importante de la adipogénesis en la inducción de MCAM.



**Figura 34. Expresión de MCAM en la línea no adipogénica NIH3T3.** Fibroblastos NIH3T3 con dos días de postconfluencia fueron tratados con DMEM+SFB o con el agregado de la mezcla de diferenciación en ausencia (IDM) o presencia de Pioglitazona 2  $\mu$ M (IDM+Pio). **A**) 7 días luego de la inducción se realizó tinción con Oil-Red-O. Se muestran imágenes de las placas completas y de un campo representativo observado al microscopio (Aumento 100X). **B**) 7 días luego de la inducción los niveles de los mRNA *Mcam*, *Pparg2* y *Plin1* se analizaron por RT-qPCR. La expresión de cada uno se normalizó utilizando *Rplp0* como referencia y se muestran los resultados de un experimento representativo como media  $\pm$  DE relativos al tratamiento C. \*  $p < 0,05$  vs. C, test *post hoc* de Bonferroni.

## Efecto del silenciamiento de MCAM por RNAi en la diferenciación de fibroblastos 3T3-L1 a adipocitos

Para empezar a caracterizar el rol de MCAM y estudiar la importancia del aumento de su expresión durante la diferenciación de las células 3T3-L1 decidimos analizar los efectos del silenciamiento de su expresión sobre este proceso. Con este fin hemos desarrollado vectores lentivirales basados en el sistema pLKO.1 con secuencias de shRNA contra el mRNA de *MCAM*, para inhibir su expresión por mecanismos de interferencia de RNA (RNAi). Estos vectores son de expresión constitutiva y pueden ser utilizados mediante transfección o transducción.

Primero intentamos estudiar los efectos del silenciamiento realizando transfecciones de los fibroblastos 3T3-L1 antes de inducir la diferenciación. Sin embargo, en estos experimentos no hemos podido confirmar la actividad silenciadora de las construcciones. Esto podría deberse a que el proceso de diferenciación se extiende durante varios días mientras que los efectos de la transfección suelen ser transitorios (1-3 días) y el número de células 3T3-L1 transfectadas es bajo.

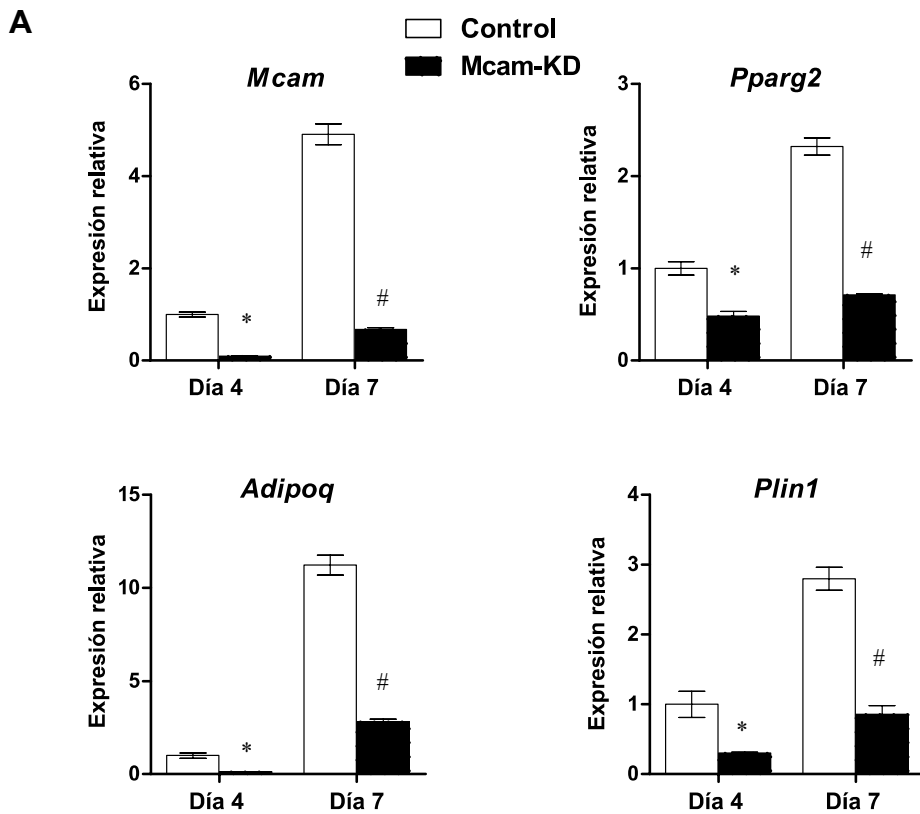
Por lo tanto, decidimos utilizar transducción mediante partículas lentivirales, técnica que es más eficiente y permite seleccionar un mayor número de células ya que incorporan el marcador de selección (resistencia a puromicina) presente en el vector. No obstante, fue necesario realizar varios ensayos para poder poner a punto el procedimiento y lograr una eficiencia de transducción adecuada.

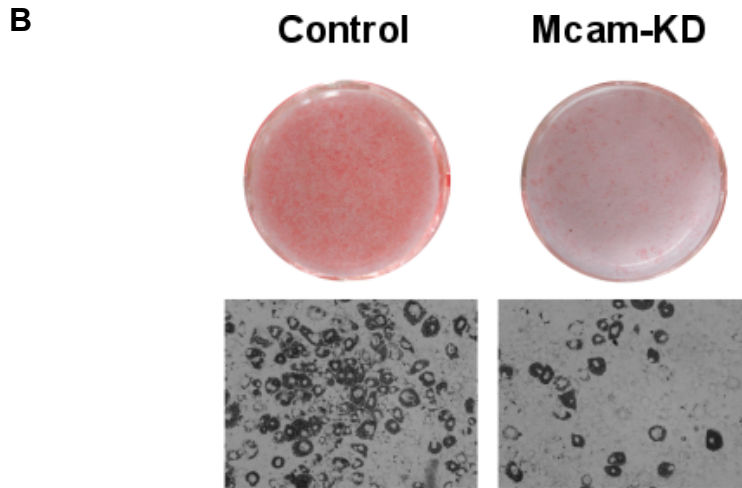
Mediante transducción con lentivirus generamos líneas de células 3T3-L1 que expresaban de manera estable un shRNA contra el mensajero de MCAM. Se ensayaron tres shRNAs, de todos ellos el que contiene la secuencia ID TRCN0000113082, fue el más eficiente para el silenciamiento de este mRNA. Se muestran los resultados obtenidos con este vector y se utilizó como control negativo el vector vacío sin la secuencia del *stuffer* ni del shRNA.

Analizamos los niveles del mRNA de MCAM en las células transducidas y observamos que en los días 4 y 7 luego de la inducción de la diferenciación sus niveles se encontraban reducidos en las células con shRNA en comparación con las células transducidas con vector control (Figura 35A). En cuanto a la capacidad de diferenciación de estas líneas, observamos que la acumulación de lípidos evaluada por tinción con OilRedO se encontraba inhibida en las células que expresan el shRNA (Figura 35B).

## Efecto del silenciamiento de MCAM por RNAi en la expresión de genes adipogénicos

A continuación estudiamos el efecto del silenciamiento de MCAM sobre la expresión de genes adipogénicos. Se investigó el efecto del silenciamiento de MCAM sobre los niveles de expresión de PPAR $\gamma$  4 y 7 días después de inducida la diferenciación y se encontró una inhibición de su expresión. Además se analizaron otros dos genes importantes en la fisiología del adipocito: Perilipina y Adiponectina. Ambos se inhibieron en las células silenciadas respecto de aquellas tratadas con el vector vacío (Figura 25A). En concordancia con la inhibición de la diferenciación, observamos que las células que expresan shRNA tenían menores niveles de mRNA de estos tres genes.



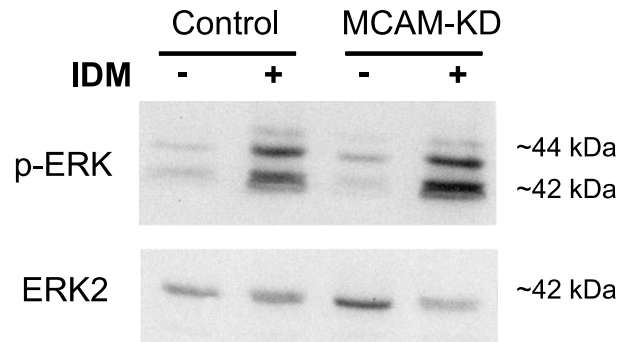


**Figura 35. Efecto del silenciamiento de MCAM sobre la diferenciación y la expresión de genes adipogénicos.** Fibroblastos 3T3-L1 transducidos con un shRNA contra MCAM (MCAM-KD) o el vector vacío (Control) fueron tratados con la mezcla de inductores (IDM) cuando alcanzaron los dos días de postconfluencia. **A)** En los días 4 y 7 luego de la inducción se evaluaron los niveles de los mRNA *Mcam*, *Pparg2*, *Plin1* y *Adipoq* por RT-qPCR. La expresión de cada mRNA se normalizó utilizando *Rplp0* como referencia y se muestran los resultados de un experimento representativo como media  $\pm$  DE relativos al día 4 de las células Control. \*  $p < 0,05$  vs C día 4, #  $p < 0,05$  vs C día 7, t-test. **B)** 7 días luego de la inducción se tiñeron los lípidos con Oil-Red-O y se muestran las placas completas y la foto de un campo representativo observado al microscopio (Aumento 100X).

### **Efecto del silenciamiento de MCAM por RNAi en la activación temprana de ERK**

De acuerdo a los resultados anteriores, el silenciamiento de MCAM inhibe la inducción de PPAR $\gamma$  y la diferenciación. Con el fin de investigar si las etapas tempranas en el proceso de diferenciación que anteceden la activación de PPAR $\gamma$  se afectan en las células silenciadas se estudiaron distintos eventos que tienen lugar en los primeros días de la diferenciación.

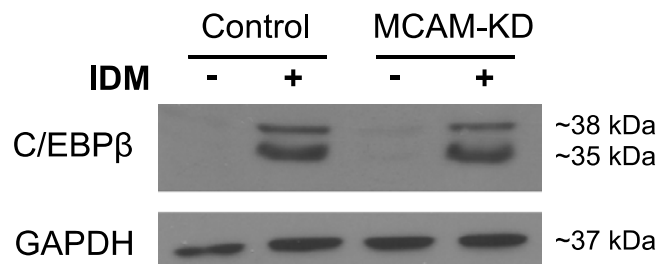
Se sabe que rápidamente después del agregado de la mezcla de diferenciación a los fibroblastos 3T3-L1, se produce la activación de ERK por fosforilación [56]. Teniendo esto en cuenta, se analizó la fosforilación de ERK por ensayos de *western blot*. Como puede verse en la figura 36 encontramos que 30 minutos después del agregado de la mezcla de diferenciación tanto en células silenciadas como controles, el tratamiento con mezcla de diferenciación indujo de manera similar la activación de ERK.



**Figura 36. Efecto del silenciamiento de MCAM sobre la activación de ERK.** Fibroblastos 3T3-L1 transducidos con un shRNA contra MCAM (MCAM-KD) o el vector vacío (Control) cuando alcanzaron los dos días de postconfluencia fueron tratados, o no, con la mezcla de inductores (IDM) y 30 minutos luego de la inducción se evaluaron los niveles de fosfo-ERK1/2 y ERK2 total por *western blot*.

### Efecto del silenciamiento de MCAM por RNAi en la expresión de C/EBP $\beta$

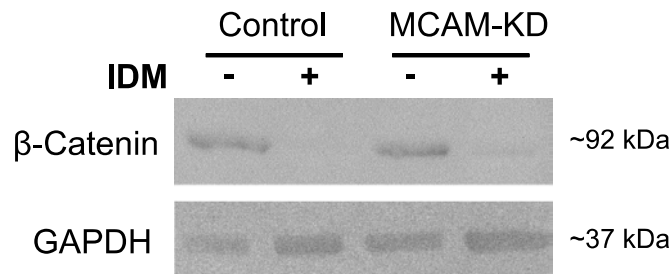
A continuación se evaluó la inducción de C/EBP $\beta$ , un factor de transcripción, que como se menciono anteriormente, aumenta su expresión en las primeras 24 h después de la inducción de la diferenciación y que es necesario para aumentar la expresión del mRNA de PPAR $\gamma$  [36]. Con este fin se analizaron por *western blot* los niveles del factor de transcripción temprano C/EBP $\beta$  en las células con shRNA tratadas o no con la mezcla de diferenciación, respecto de los mismos tratamientos en las células transducidas con el vector vacío. Observamos que el aumento de C/EBP $\beta$  a las 24 h posteriores a la inducción estaba presente tanto en las células con shRNA como en aquellas con vector vacío (Figura 37).



**Figura 37. Efecto del silenciamiento de MCAM sobre la inducción de C/EBP $\beta$ .** Fibroblastos 3T3-L1 transducidos con un shRNA contra MCAM (MCAM-KD) o el vector vacío (Control) cuando alcanzaron los dos días de postconfluencia fueron tratados, o no, con la mezcla de inductores (IDM). A las 24 h luego de la inducción se evaluaron los niveles de C/EBP $\beta$  por *western blot*. GAPDH se utilizó como control de carga.

### Efecto del silenciamiento de MCAM por RNAi en los niveles de $\beta$ -catenina

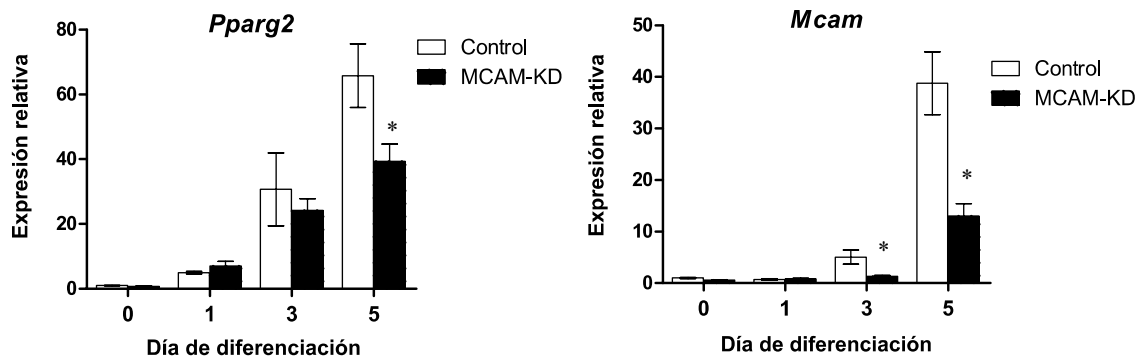
Por otro lado,  $\beta$ -catenina es una proteína involucrada en la vía canónica de Wnt, y sus niveles disminuyen durante la adipogénesis [30, 33, 34] antecediendo la inducción de PPAR $\gamma$ . Analizamos el contenido de  $\beta$ -catenina por *western blot* cuatro días después de inducir la diferenciación y en las células con vector control pudimos observar el descenso esperado en la cantidad de  $\beta$ -catenina luego del tratamiento con la mezcla de diferenciación. Dicho efecto también se vio en las células que expresaban el shRNA (Figura 38). Esto sugiere que la inhibición de la vía canónica Wnt/ $\beta$ -catenina, que es un requisito para la adipogénesis, no se pierde por el silenciamiento de MCAM.



**Figura 38. Efecto del silenciamiento de MCAM sobre el descenso de  $\beta$ -catenina.** Fibroblastos 3T3-L1 transducidos con un shRNA contra MCAM (MCAM-KD) o el vector vacío (Control) cuando alcanzaron los dos días de postconfluencia fueron tratados, o no, con la mezcla de inductores (IDM). A los 4 días luego de la inducción se evaluaron los niveles de  $\beta$ -catenina por *western blot*. GAPDH se utilizó como control de carga.

### Efecto del silenciamiento de MCAM por RNAi en la inducción temprana de PPAR $\gamma$

Los análisis de los eventos tempranos del proceso de adipogénesis indican que estos no se vieron afectados en las células que expresaban el shRNA. En vista de esto, y teniendo en cuenta además que C/EBP $\beta$  regula positivamente la expresión de PPAR $\gamma$ , decidimos investigar si la inducción de PPAR $\gamma$  que hemos visto que ocurre en las 24 h posteriores al inicio de la diferenciación (Figura 28) se encontraba alterada en las células con shRNA. Sin embargo, como se muestra en la figura 39, se encontró que el aumento de la expresión del mRNA de PPAR $\gamma$  que se produce 24 h después de inducida la diferenciación no se afectó en las células que expresaban el shRNA de MCAM y sólo resultó inhibido a tiempos más largos, a partir del día 3 de inducción, a posteriori del bloqueo de la expresión de MCAM (Figura 39).



**Figura 39. Efecto del silenciamiento de MCAM sobre la inducción temprana de PPAR $\gamma$ .** Fibroblastos 3T3-L1 transducidos con un shRNA contra MCAM (MCAM-KD) o el vector vacío (Control) fueron tratados con la mezcla de inductores (IDM) cuando alcanzaron los dos días de postconfluencia. A distintos tiempos luego de la inducción se evaluaron los niveles de mRNA de *Mcam* y *Pparg2* por RT-qPCR. La expresión de cada mRNA se normalizó utilizando *Rplp0* como referencia y se muestran los resultados de un experimento representativo como media  $\pm$  DE relativos al día 0 de las células Control. \*  $p < 0,05$  vs C del mismo día.



# Discusión

---

La diferenciación de células precursoras a adipocitos es un proceso complejo en el cual se integran múltiples señales extra e intracelulares y se activa de manera coordinada una red de factores de transcripción que regulan su progreso. En este trabajo de tesis primero se quiso investigar la contribución de la señal de AMPc-EPAC a la diferenciación de los fibroblastos 3T3-L1 a adipocitos.

Varios factores de transcripción han sido descriptos como relevantes en el proceso de adipogénesis, en este trabajo se analizó la expresión de dos de ellos C/EBP $\beta$  y PPAR $\gamma$ . C/EBP $\beta$  se induce en las primeras horas luego del agregado de la mezcla de los inductores de diferenciación a adipocitos para decaer al cabo de 48 h, y es por ello que está involucrado en la activación temprana de PPAR $\gamma$ , el gen maestro de la adipogénesis. Observamos que el aumento de la expresión de estos factores de transcripción es mayor cuando las células son tratadas con la mezcla completa de diferenciación (IDM) con respecto a aquellas tratadas sólo con ID. Dado que en ausencia de MIX en la mezcla de inductores, no ocurre la diferenciación, estos resultados sugieren que no sólo el aumento de la expresión de C/EBP $\beta$  y PPAR $\gamma$  es importante para que ocurra la adipogénesis sino también la magnitud de este aumento.

La falta de capacidad de ID para inducir la diferenciación así como la menor expresión de C/EBP $\beta$  y PPAR $\gamma$  en los fibroblastos 3T3-L1 después de este tratamiento está de acuerdo con lo informado en varios trabajos previos [54, 97, 173]. Por otro lado, cuando se reemplazó MIX en la mezcla de diferenciación con los análogos de AMPc, db-AMPc u 8CPT, observamos que en ambos casos se requiere un segundo agregado de estos 24 h después de la inducción para lograr un grado de diferenciación comparable al que se obtiene con la mezcla completa de diferenciación. La hidrólisis de los análogos de AMPc por las enzimas fosfodiesterasas que están presentes tanto en el interior de la célula como en el suero del medio de cultivo permitiría explicar estos resultados así como también observaciones de otros autores que han indicado que el agregado del agonista de EPAC junto con ID únicamente al inicio de la diferenciación, y en una concentración idéntica a la utilizada en este trabajo, no es capaz de inducir la diferenciación [54, 69].

Tanto la capacidad del agonista de EPAC de reemplazar a MIX en la mezcla de diferenciación, como también la falta de efecto de los inhibidores de PKA, Rp-cAMPS, en la adipogénesis concuerdan con otros trabajos en los cuales se informó que la actividad de la PKA no es necesaria para la diferenciación de los fibroblastos 3T3-L1 [68, 69, 167]. Incluso, se ha indicado que la PKA puede tener un efecto inhibitorio

sobre la diferenciación [67]. Por otro lado, el agregado de los análogos de AMPc recién a las 48 h del inicio del tratamiento con ID no fue capaz de inducir la diferenciación, resaltando la importancia de su presencia durante los primeros dos días de inducción. De acuerdo con esto, se ha informado que la respuesta de MIX a través de AMPc es necesaria para la producción de ligandos de PPAR $\gamma$ , lo cual ocurre dentro de las 48 h posteriores a la inducción de la diferenciación [73].

En este trabajo, vimos que la presencia de MIX en la mezcla de diferenciación indujo un aumento de los niveles del mRNA de PPAR $\gamma$  con respecto al tratamiento con ID. Resultados similares fueron obtenidos reemplazando a MIX con db-AMPc o el agonista de EPAC, en concordancia con su capacidad de inducir la diferenciación. Estos resultados indican que MIX o los análogos de AMPc, incluyendo un activador específico de EPAC, son necesarios para lograr un aumento en la expresión de PPAR $\gamma$  suficiente para lograr la formación de adipocitos.

Cabe señalar que ni ID ni MIX por separado fueron capaces de inducir un aumento del mRNA de PPAR $\gamma$  similar al que se obtiene con la mezcla completa de diferenciación, lo cual resalta la importancia de la presencia de los tres inductores para que ocurra la adipogénesis. De acuerdo con este resultado, hemos mostrado en la figura 26 que ni los inductores por separado ni ninguna de las combinaciones binarias de estos es capaz de lograr un nivel de diferenciación igual al que se logra con los tres compuestos, lo que corrobora la importancia de la presencia de los tres inductores en la mezcla de diferenciación.

A través del análisis con *microarrays*, hemos podido confirmar la capacidad del agonista de EPAC de reemplazar a MIX en la mezcla de diferenciación y aumentar la expresión de PPAR $\gamma$  y de otros genes que son blanco de este factor de transcripción, como por ejemplo el gen de Perilipina, que codifica para una proteína presente en las gotas lipídicas y que tiene un rol fundamental en el control del almacenamiento y movilización de lípidos en los adipocitos [87], o el gen G0/G1 switch 2, asociado al bloqueo de la proliferación celular que se requiere para la adipogénesis en los fibroblastos 3T3-L1 [176]. Además, diversos genes involucrados en el transporte y metabolismo de lípidos mostraron mayores niveles de expresión cuando las células se inducen a diferenciar en presencia de MIX o de 8CPT. Muchos de los genes que encontramos regulados cuando está presente MIX, coinciden con resultados de un trabajo anterior donde también mediante *microarrays* se estudiaron diferencias en la expresión génica de fibroblastos 3T3-L1 inducidos en ausencia o presencia de MIX [173].

Nuestros resultados contribuyen a probar la capacidad de la estimulación de EPAC de sustituir a MIX en la diferenciación de fibroblastos 3T3-L1 a adipocitos. Se ha informado que ratones *knockout* para EPAC1 no tendrían afectada la adipogénesis pese a tener menor adiposidad [135]. Dado los resultados contrapuestos con lo observado en células, esto podría indicar la presencia en estos animales de mecanismos compensatorios. No obstante, tanto en fibroblastos 3T3-L1 como en células mesenquimales provenientes de tejido adiposo humano se ha observado un rol importante de la señalización de AMPc a través de EPAC en la adipogénesis. En células 3T3-L1, se ha informado que el silenciamiento de la expresión de EPAC por RNAi, inhibe la expresión del mRNA de PPAR $\gamma$  e impide la diferenciación de estos fibroblastos [54, 69].

En conclusión, nuestros resultados indican que la respuesta de MIX a través de AMPc-EPAC está involucrada en la regulación de genes adipogénicos durante la diferenciación de fibroblastos 3T3-L1 y que la señalización por EPAC, junto con las vías activadas por insulina y dexametasona son necesarias y suficientes para la adipogénesis. De esta manera, este trabajo contribuye a dilucidar el rol del AMPc en el proceso de adipogénesis

En la segunda parte de este trabajo de tesis hemos descrito el aumento de la expresión de MCAM durante la adipogénesis de los fibroblastos 3T3-L1, que no había sido previamente informado. Además, vimos que sus niveles se mantienen elevados en los adipocitos. Este aumento de MCAM en las células diferenciadas fue confirmado a nivel de mRNA y también a nivel de proteína mediante ensayos tanto de *western blot* como de inmunofluorescencia.

Luego se investigó si alguno de los inductores de la mezcla era capaz por sí sólo de aumentar el mRNA de MCAM pero con ninguno de ellos se obtuvo este efecto. Si bien se ha informado que el aumento del AMPc intracelular estimula la expresión de MCAM en células de melanoma no metastático y en la línea PC12 donde la respuesta estaría mediada por PKA [147-150], en el presente trabajo el tratamiento sólo con el inhibidor de fosfodiesterasas, MIX, no fue capaz de activar su expresión en fibroblastos 3T3-L1. Tampoco la inhibición de la vía AMPc-PKA impidió el aumento del mRNA de MCAM que se obtiene en presencia de IDM, por lo tanto la vía de PKA no afecta la expresión de MCAM durante la adipogénesis. Dado que en el tratamiento con MIX solo también se activa la vía AMPc-EPAC, estos resultados indicarían que esta

señalización tampoco es suficiente para activar la expresión de MCAM, y que se necesitaría el contexto de la diferenciación y por ende la activación de PPAR $\gamma$  para la inducción de MCAM en los fibroblastos 3T3-L1.

De este modo, los tratamientos con las combinaciones binarias de inductores que no son capaces de inducir adipogénesis (ID e IM) no aumentaron el mRNA de MCAM. Además de la mezcla completa de inductores (IDM) sólo la combinación de dexametasona y MIX (DM) pudo inducir, aunque en menor grado, la diferenciación y los niveles del mRNA de MCAM. En concordancia con esta asociación entre diferenciación e inducción de MCAM, el tratamiento de células de la línea no adipogénica NIH3T3 con la mezcla de diferenciación no fue capaz de activar la expresión de MCAM ni la de Perilipina como ocurre en las células 3T3-L1. Es importante señalar que aunque en presencia de pioglitazona, que estimula la actividad transcripcional de PPAR $\gamma$ , se observó la aparición de lípidos en el citosol en algunas células, ésta fue muy inferior a la que se obtiene en los adipocitos 3T3-L1. Si bien se encontró un aumento del mRNA de PPAR $\gamma$  con este tratamiento, dicho efecto no se vio reflejado en el aumento de Perilipina, el cual fue muy bajo en comparación con lo que se suele observar en adipocitos 3T3-L1. Esto refuerza los resultados mostrados en la primera parte de este trabajo que indican la importancia de la magnitud del aumento de PPAR $\gamma$  para obtener diferenciación. Además, este resultado está de acuerdo con lo informado en un trabajo anterior donde se encontró que el tratamiento con IDM+Pio de células NIH3T3 sólo produce una importante adipogénesis cuando se sobreexpresa PPAR $\gamma$  en estas células, es decir que no sería suficiente la activación con pioglitazona del PPAR $\gamma$  endógeno [81].

Por otro lado, de acuerdo con informes previos [81, 165], encontramos que 24 h luego del inicio de la diferenciación de las células 3T3-L1 los niveles del mRNA de PPAR $\gamma$  ya se encontraban aumentados, y posteriormente aumentaron los mRNA de Perilipina, cuyo gen es regulado por PPAR $\gamma$ , y de MCAM. No sólo vimos que los niveles del mRNA de MCAM se incrementaron con posterioridad a la inducción de PPAR $\gamma$ , sino también que los tratamientos con agentes que activan o inhiben PPAR $\gamma$  los elevaban aún más o los reducían, respectivamente. Así, observamos que pioglitazona, indujo mayores niveles de MCAM. Incluso, si bien la mezcla con insulina y dexametasona no es capaz de inducir la diferenciación o la expresión de MCAM por sí misma, el agregado de pioglitazona junto con estos dos inductores produjo la acumulación de lípidos en las células 3T3-L1 y un aumento en los niveles del mensajero de MCAM. Este efecto de ID de inducir la diferenciación en presencia de

pioglitazona apoya un informe anterior donde se propuso que la señalización de AMPc es importante para la generación de activadores de PPAR $\gamma$  [73], que en ausencia de MIX estarían siendo reemplazados por la pioglitazona. Por el contrario, TNF $\alpha$  inhibe la expresión de PPAR $\gamma$  durante la diferenciación y también en adipocitos maduros [175], y pudimos observar que esto estaba asociado a una menor expresión de MCAM en ambas condiciones.

Estos resultados sugieren que PPAR $\gamma$  podría participar en la inducción de MCAM. En el promotor de MCAM se ha descrito la existencia de distintos elementos regulatorios, como por ejemplo sitios para la unión de los factores de transcripción CREB, Sp1 y AP-2, entre otros [138, 145]. Sin embargo, su regulación transcripcional no es totalmente comprendida y se ha visto que varía de acuerdo al tejido en el cual se expresa [138]. Si bien hemos intentado hacer experimentos de ChIP para evaluar la unión de PPAR $\gamma$  a la cromatina, no hemos logrado inmunoprecipitar con los anticuerpos disponibles los fragmentos de cromatina a los que se podría unir este factor de transcripción para regular la expresión de MCAM, como tampoco aquellos descritos para la proteína Ap2 usada como control positivo. Pese a esto, cabe señalar que a favor de una posible regulación de MCAM por PPAR $\gamma$  en análisis de ChIP-seq se han encontrado potenciales sitios de unión de PPAR $\gamma$  en el primer intrón del gen de MCAM así como en una zona distante río arriba. En este último caso el sitio está próximo a un sitio de unión de C/EBP $\alpha$  y se ha informado que muchos genes adipogénicos están regulados por ambos factores de transcripción [96, 117].

Con el fin de investigar la importancia de la expresión de MCAM durante la adipogénesis, analizamos el efecto de su silenciamiento en células 3T3-L1. Observamos que las células que expresaban un shRNA contra MCAM tenían menor capacidad de diferenciar. En concordancia, en un estudio previo se informó que el silenciamiento de MCAM en células madre multipotentes de médula ósea humana (hBM-MSCs) redujo el potencial de estas células para diferenciar a los linajes adipogénicos y osteogénicos [162]. Además, en un trabajo reciente [177] se aislaron células madre a partir de la fracción estromal-vascular de tejido adiposo abdominal humano y se separaron las que eran MCAM(+) de las MCAM(-). Se observó, que las células MCAM(+) tenían mayor capacidad adipogénica y aquellas inducidas a diferenciar expresaban mayores niveles de Adiponectina y Leptina.

En contraste con estos resultados, en un trabajo previo donde se analizan por citometría de flujo distintos marcadores de células precursoras, se indica que MCAM disminuiría durante la adipogénesis de células precursoras aisladas de tejido adiposo humano [178]. Esto estaría apoyando aquellos trabajos que asocian la existencia de mayores niveles de MCAM en células precursoras. En el laboratorio utilizamos las células 3T3-L1 por ser el modelo celular más empleado para estudiar adipogénesis pues se ha visto que los resultados obtenidos se pueden extender a otras células precursoras. En el caso de las células 3T3-L1, como en algunas otras señaladas anteriormente, encontramos que MCAM no sólo aumenta sino que la inhibición de este aumento está asociada a una inhibición de la diferenciación. Si bien no conocemos las causas de estas diferencias, podrían deberse a variaciones en los niveles endógenos de esta proteína en las distintas células precursoras y/o la presencia de otras moléculas que cumplan su rol.

La inhibición de la diferenciación observada en las células en que se silenció MCAM se encontró asociada a una menor expresión de PPAR $\gamma$  y de dos genes regulados por este factor de transcripción e importantes para la función del adipocito, Perilipina y Adiponectina. Tanto la contribución positiva de MCAM a la adipogénesis como a la expresión de Adiponectina asociada a la diferenciación está de acuerdo con lo informado recientemente por Lauvrud y col. [177].

Sin embargo, eventos que ocurren en las etapas tempranas del proceso de diferenciación, como la inducción de C/EBP $\beta$  y la activación de ERK no se vieron afectados por el silenciamiento de MCAM, lo que sugiere que no se requiere el aumento de la expresión de MCAM para dichos eventos. Por otra parte, es bien sabido que la vía Wnt/ $\beta$ -catenina actúa regulando negativamente la expresión de PPAR $\gamma$ , y por lo tanto su inhibición es necesaria para permitir la activación de PPAR $\gamma$  durante la adipogénesis. El silenciamiento de MCAM tampoco afectó la disminución de los niveles de  $\beta$ -catenina que tiene lugar durante la diferenciación. Es interesante observar que un trabajo reciente sugiere que C/EBP $\beta$  está involucrado en la inhibición de la vía de Wnt durante la diferenciación de los fibroblastos 3T3-L1 [33]. Esto podría, en parte, explicar la falta de efecto del silenciamiento de MCAM en la disminución de  $\beta$ -catenina pues tampoco se afectó la inducción de C/EBP $\beta$ .

Nuestros resultados sugieren que MCAM no tendría un rol importante en las primeras etapas, sino en las etapas tardías de la adipogénesis. Esto concuerda con la observación de que la expresión de MCAM aumenta luego de tres días de inducida la diferenciación, posteriormente a la inducción de PPAR $\gamma$ .

Como se ha indicado, PPAR $\gamma$  es reconocido como el factor de transcripción maestro de la adipogénesis pero también un regulador fundamental de la fisiología de los adipocitos ya que modula la expresión de diversas proteínas importantes para la función de estas células. Así, C/EBP $\alpha$  es inducido por PPAR $\gamma$  y a la vez participa en un mecanismo de retroalimentación positiva para mantener la expresión de PPAR $\gamma$  durante las etapas tardías de la diferenciación y en los adipocitos [42].

De este modo, la menor expresión de PPAR $\gamma$  y genes regulados por éste en las células en que silenciamos MCAM, podría deberse a la participación de MCAM en los mecanismos que permiten mantener la expresión de PPAR $\gamma$  luego de la disminución de C/EBP $\beta$ . En concordancia con esto, por un lado hemos visto que el mRNA de MCAM aumenta recién 3 días después de inducida la diferenciación y que el silenciamiento de MCAM no afectó la inducción de C/EBP $\beta$ , que es necesaria para activar la expresión de PPAR $\gamma$  en las etapas tempranas de la diferenciación [36], ni el aumento de los niveles del mRNA de PPAR $\gamma$  que ocurre a las 24 h posteriores a la inducción. Lipin 1 es otra proteína inducida de forma tardía en la adipogénesis, a continuación de la activación de PPAR $\gamma$  y cuya expresión se mantiene en los adipocitos. De manera similar a MCAM, en células en que se ha silenciado Lipin la adipogénesis y la expresión de PPAR $\gamma$  se encuentran inhibidas, pero no son afectadas las etapas tempranas del proceso. Se ha demostrado que Lipin 1 actúa como un regulador transcripcional que es inducido por C/EBP $\alpha$  y contribuye a la activación de PPAR $\gamma$ , y de esta manera refuerza el mecanismo de regulación recíproca entre C/EBP $\alpha$  y PPAR $\gamma$  en la diferenciación de fibroblastos 3T3-L1 [165].

En el caso de MCAM, no se ha informado que esta proteína pueda llegar al núcleo y regular directamente la expresión de genes. Sin embargo, se ha descrito que MCAM contribuiría a la capacidad de invasión y metástasis de células de melanoma a través de una señalización intracelular que modifica la expresión de los factores de transcripción Id-1 y ATF3. En estas células, MCAM inhibe la expresión de ATF3, que actúa como represor de Id-1 y así este último aumenta la expresión de la metaloproteasa de matriz extracelular MMP2, lo que favorece la invasión y metástasis [179]. ATF3 es un factor de transcripción que aumenta en respuesta al stress y que puede ser activado a través de la vía de la quinasa p38 [180]. Resulta interesante señalar que recientemente se ha encontrado que ATF3 tiene efectos antiadipogénicos en fibroblastos 3T3-L1 y actuaría por inhibición del aumento de PPAR $\gamma$  y C/EBP $\alpha$  [181]. Teniendo en cuenta estos antecedentes, sería posible que MCAM también estuviera actuando a través de la represión de ATF3 en estas células. En próximos



estudios se investigará esta posibilidad, pero serán necesarios aún más estudios para poder determinar la secuencia de mecanismos involucrados en la señalización desde la superficie celular por los que MCAM contribuye a la expresión de PPAR $\gamma$  y otros genes adipogénicos.

En conclusión, nuestros resultados indican que la expresión de MCAM aumenta luego de tres días de inducida la diferenciación de los fibroblastos 3T3-L1 y se mantiene elevada en los adipocitos maduros. Por ello no actúa sobre el aumento inicial del mRNA de PPAR $\gamma$  sino que sería necesaria para mantener su inducción en las etapas tardías de la adipogénesis de las células 3T3-L1. De allí que su silenciamiento en células 3T3-L1 produjo una inhibición de la adipogénesis lo que indica la importancia de la expresión de MCAM en este proceso.

Todos estos estudios fueron realizados con el fin de aportar nuevos conocimientos que permitan identificar moléculas importantes y describir los mecanismos involucrados en la adipogénesis y en el funcionamiento de los adipocitos, lo cuál puede mejorar nuestra capacidad para desarrollar nuevas terapias para el tratamiento de la obesidad y las patologías asociadas a ella.

# Conclusiones

---

- La presencia de MIX en la mezcla de diferenciación permite activar la señalización a través de AMPc-EPAC que está involucrada en la inducción de un gen temprano, C/EBP $\beta$  y otro más tardío PPAR $\gamma$ , que participan en la diferenciación a adipocitos.
- La señal AMPc-EPAC también es necesaria en la activación de genes que determinan el fenotipo del adipocito.
- Hemos identificado la proteína MCAM que aumenta su expresión durante la diferenciación de los fibroblastos 3T3-L1 a adipocitos y se mantiene elevada en el adipocito terminal.
- El aumento de esta proteína en los fibroblastos 3T3-L1 ocurre asociado a la adipogénesis a partir del tercer día posterior a su inducción y después de la activación de PPAR $\gamma$  y de una proteína regulada por este factor de transcripción la Perilipina.
- La inducción de MCAM es mayor en presencia de activadores de PPAR $\gamma$  en la mezcla de diferenciación a adipocitos y se reduce en presencia de inhibidores como TNF $\alpha$ .
- El aumento de MCAM no se observa en ausencia de adipogénesis).
- El silenciamiento de MCAM por RNAi inhibe la diferenciación y la expresión de PPAR $\gamma$ , y dos proteínas importantes en la fisiología del adipocito: Perilipina y Adiponectina pero no los eventos tempranos de este proceso: activación de ERK, inducción de C/EBP $\beta$  y disminución de  $\beta$ -catenina ni el aumento temprano de PPAR $\gamma$ .
- Estos resultados sugieren que MCAM sería necesaria para mantener aumentado PPAR $\gamma$  después de tres días de inducida la diferenciación en las etapas tardías de la adipogénesis.

# **Bibliografía**

---

- [1] World Health Organization. Obesity and overweight fact sheet. Actualizado 2016. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>
- [2] Avram MM, Avram AS, James WD. Subcutaneous fat in normal and diseased states 3. Adipogenesis: from stem cell to fat cell. *J Am Acad Dermatol.* 2007; 56(3):472-92.
- [3] Rey RH, Rostan MG. Obesidad y síndrome metabólico. En: Lerman J, Iglesias R. Enfoque Integral del Síndrome Metabólico 2da ed. Buenos Aires: Intermédica 2009, p 113-129.
- [4] Bergman G. Bases fisiopatológicas del síndrome metabólico. En: Lerman J, Iglesias R. Enfoque Integral del Síndrome Metabólico. 2ª ed. Buenos Aires: Intermédica, 2009, p 25-44.
- [5] Lean, ME. Pathophysiology of obesity. *Proc Nutr Soc.* 2000; 59: 331-36.
- [6] Withrow D, Alter DA. The economic burden of obesity worldwide: a systematic review of the direct costs of obesity. *Obes Rev.* 2011; 12(2):131-41.
- [7] Arner P, Spalding KL. Fat cell turnover in humans. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010; 396(1):101-4.
- [8] Encuesta Nacional de Factores de Riesgo. 2013. Capítulo 7: Peso Corporal. [http://www.msal.gob.ar/ent/images/stories/vigilancia/pdf/2015-1\\_enfr\\_cap7\\_peso-corporal.pdf](http://www.msal.gob.ar/ent/images/stories/vigilancia/pdf/2015-1_enfr_cap7_peso-corporal.pdf)
- [9] Harwicz P. Tratamiento farmacológico y quirúrgico de la obesidad. En: Lerman J, Iglesias R. Enfoque Integral del Síndrome Metabólico 2da ed. Buenos Aires: Intermédica 2009, p 186-208.
- [10] Lafontan M. Historical perspectives in fat cell biology: the fat cell as a model for the investigation of hormonal and metabolic pathways. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2012; 302(2):C327-59.
- [11] Spalding KL, Arner E, Westermark PO, Bernard S, Buchholz BA, Bergmann O, Blomqvist L, Hoffstedt J, Näslund E, Britton T, Concha H, Hassan M, Rydén M, Frisén J, Arner P. Dynamics of fat cell turnover in humans. *Nature.* 2008; 453(7196):783-7.
- [12] Anghel SI, Wahli W. Fat poetry: a kingdom for PPAR gamma. *Cell Res.* 2007; 17(6):486-511.
- [13] Duncan RE, Ahmadian M, Jaworski K, Sarkadi-Nagy E, Sul HS. Regulation of Lipolysis in Adipocytes. *Annu Rev Nutr.* 2007; 27:79-101.
- [14] Krahmer N, Guo Y, Farese RV Jr, Walther TC. SnapShot: Lipid Droplets. *Cell.* 2009; 139(5):1024-1024.e1
- [15] Rosen ED, Spiegelman BM. What we talk about when we talk about fat. *Cell.* 2014; 156(1-2):20-44.
- [16] Gesta S, Tseng YH, Kahn CR. Developmental origin of fat: tracking obesity to its source. *Cell.* 2007; 131(2):242-56.
- [17] Lizcano F, Vargas D. Biology of Beige Adipocyte and Possible Therapy for Type 2 Diabetes and Obesity. *Int J Endocrinol.* 2016; 2016:9542061.
- [18] Tang QQ, Lane MD. Adipogenesis: from stem cell to adipocyte. *Annu Rev Biochem.* 2012; 81:715-36.
- [19] Rosen ED, MacDougald OA. Adipocyte differentiation from the inside out. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2006; 7(12):885-96.

- [20] Park KW, Halperin DS, Tontonoz P. Before they were fat: adipocyte progenitors. *Cell Metab.* 2008; 8(6):454-7.
- [21] Cristancho AG, Lazar MA. Forming functional fat: a growing understanding of adipocyte differentiation. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2011; 12(11):722-34.
- [22] Huang H, Song TJ, Li X, Hu L, He Q, Liu M, Lane MD, Tang QQ. BMP signaling pathway is required for commitment of C3H10T1/2 pluripotent stem cells to the adipocyte lineage. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009; 106(31):12670-5.
- [23] James AW, Leucht P, Levi B, Carre AL, Xu Y, Helms JA, Longaker MT. Sonic Hedgehog influences the balance of osteogenesis and adipogenesis in mouse adipose-derived stromal cells. *Tissue Eng Part A.* 2010; 16(8):2605-16.
- [24] Tanaka SS, Kojima Y, Yamaguchi YL, Nishinakamura R, Tam PP. Impact of WNT signaling on tissue lineage differentiation in the early mouse embryo. *Dev Growth Differ.* 2011; 53(7):843-56.
- [25] Bennett CN, Longo KA, Wright WS, Suva LJ, Lane TF, Hankenson KD, MacDougald OA. Regulation of osteoblastogenesis and bone mass by Wnt10b. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005; 102(9):3324-9.
- [26] Kang S, Bennett CN, Gerin I, Rapp LA, Hankenson KD, Macdougald OA. J Wnt signaling stimulates osteoblastogenesis of mesenchymal precursors by suppressing CCAAT/enhancer-binding protein alpha and peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *Biol Chem.* 2007; 282(19):14515-24.
- [27] Shang YC, Wang SH, Xiong F, Zhao CP, Peng FN, Feng SW, Li MS, Li Y, Zhang C. Wnt3a signaling promotes proliferation, myogenic differentiation, and migration of rat bone marrow mesenchymal stem cells. *Acta Pharmacol Sin.* 2007 Nov;28(11):1761-74.
- [28] Kirton JP, Crofts NJ, George SJ, Brennan K, Canfield AE. Wnt/beta-catenin signaling stimulates chondrogenic and inhibits adipogenic differentiation of pericytes: potential relevance to vascular disease? *Circ Res.* 2007; 101(6):581-9.
- [29] Laudes M. Role of WNT signalling in the determination of human mesenchymal stem cells into preadipocytes. *J Mol Endocrinol.* 2011; 46(2):R65-72.
- [30] Ross SE, Hemati N, Longo KA, Bennett CN, Lucas PC, Erickson RL, MacDougald OA. Inhibition of adipogenesis by Wnt signaling. *Science* 2000; 289:950-3.
- [31] Bennett CN, Ross SE, Longo KA, Bajnok L, Hemati N, Johnson KW, Harrison SD, MacDougald OA. Regulation of Wnt signaling during adipogenesis. *J Biol Chem* 2002; 277:30998-1004.
- [32] Gerhold DL, Liu F, Jiang G, Li Z, Xu J, Lu M, Sachs JR, Bagchi A, Fridman A, Holder DJ, Doebber TW, Berger J, Elbrecht A, Moller DE, Zhang BB. Gene Expression Profile of Adipocyte Differentiation and Its Regulation by Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- $\gamma$  Agonists. *Endocrinology.* 2002; 143(6):2106-2118.
- [33] Chung SS, Lee JS, Kim M, Ahn BY, Jung HS, Lee HM, Kim JW, Park KS. Regulation of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling by CCAAT/enhancer binding protein  $\beta$  during adipogenesis. *Obesity.* 2012; 20(3):482-7.
- [34] Moldes M, Zuo Y, Morrison RF, Silva D, Park BH, Liu J, Farmer SR. Peroxisome-proliferator activated receptor gamma suppresses Wnt/beta-catenin signalling during adipogenesis. *Biochem J.* 2003; 376:607-13.
- [35] Poulos SP, Dodson MV, Hausman GJ. Cell line models for differentiation: preadipocytes and adipocytes. *Exp Biol.* 2010; 235(10):1185-93.

- [36] Farmer SR. Transcriptional control of adipocyte formation. *Cell Metab.* 2006; 4(4):263-73.
- [37] Green H, Kehinde O. Sublines of mouse 3T3 cells that accumulate lipid. *Cell.* 1974; 1(3):113–116.
- [38] Green H, Kehinde O. Spontaneous heritable changes leading to increased adipose conversion in 3T3 cells. *Cell.* 1976; 7(1):105–113.
- [39] Rosen ED, Spiegelman BM. Molecular regulation of adipogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2000; 16:145-71.
- [40] Zebisch K, Voigt V, Wabitsch M, Brandsch M. Protocol for effective differentiation of 3T3-L1 cells to adipocytes. *Anal Biochem.* 2012; 425(1):88-90.
- [41] Cowherd RM, Lyle RE, McGehee RE Jr. Molecular regulation of adipocyte differentiation. *Semin Cell Dev Biol.* 1999; 10(1):3-10.
- [42] Tontonoz P, Spiegelman BM. Fat and beyond: the diverse biology of PPARgamma. *Annu Rev Biochem.* 2008; 77:289-312.
- [43] Gregoire FM, Smas CM, Sul HS. Understanding adipocyte differentiation. *Physiol Rev.* 1998; 78(3):783-809.
- [44] Smith PJ, Wise LS, Berkowitz R, Wan C, Rubin CS. Insulin-like growth factor-I is an essential regulator of the differentiation of 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem.* 1988; 263(19):9402-8.
- [45] Xu J, Liao K. Protein kinase B/AKT 1 plays a pivotal role in insulin-like growth factor-1 receptor signaling induced 3T3-L1 adipocyte differentiation. *J Biol Chem.* 2004; 279(34):35914-22.
- [46] Tomiyama K, Nakata H, Sasa H, Arimura S, Nishio E, Watanabe Y. Wortmannin, a specific phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor, inhibits adipocytic differentiation of 3T3-L1 cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1995; 212(1):263-9.
- [47] Yun SJ, Kim EK, Tucker DF, Kim CD, Birnbaum MJ, Bae SS. Isoform-specific regulation of adipocyte differentiation by Akt/protein kinase Balpha. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008; 371(1):138-43.
- [48] Nakae J, Kitamura T, Kitamura Y, Biggs WH 3rd, Arden KC, Accili D. The forkhead transcription factor Foxo1 regulates adipocyte differentiation. *Dev Cell.* 2003; 4(1):119-29.
- [49] Menghini R, Marchetti V, Cardellini M, Hribal ML, Mauriello A, Lauro D, Sbraccia P, Lauro R, Federici M. Phosphorylation of GATA2 by Akt increases adipose tissue differentiation and reduces adipose tissue-related inflammation: a novel pathway linking obesity to atherosclerosis. *Circulation.* 2005; 111(15):1946-53.
- [50] Kim SP, Ha JM, Yun SJ, Kim EK, Chung SW, Hong KW, Kim CD, Bae SS. Transcriptional activation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma requires activation of both protein kinase A and Akt during adipocyte differentiation. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010 Aug 13;399(1):55-9.
- [51] Qiu Z, Wei Y, Chen N, Jiang M, Wu J, Liao K. DNA synthesis and mitotic clonal expansion is not a required step for 3T3-L1 preadipocyte differentiation into adipocytes. *J Biol Chem.* 2001; 276(15):11988-95.
- [52] Liu K, Guan Y, MacNicol MC, MacNicol AM, McGehee RE Jr. Early expression of p107 is associated with 3T3-L1 adipocyte differentiation. *Mol Cell Endocrinol.* 2002; 194(1-2):51-61.

- [53] Tang QQ, Otto TC, Lane MD. Mitotic clonal expansion: a synchronous process required for adipogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003; 100(1):44-9.
- [54] Petersen RK, Madsen L, Pedersen LM, Hallenborg P, Hagland H, Viste K, Døskeland SO, Kristiansen K. Cyclic AMP (cAMP)-mediated stimulation of adipocyte differentiation requires the synergistic action of Epac- and cAMP-dependent protein kinase-dependent processes. *Mol Cell Biol*. 2008; 28(11):3804-16.
- [55] Tang QQ, Grønborg M, Huang H, Kim JW, Otto TC, Pandey A, Lane MD. Sequential phosphorylation of CCAAT enhancer-binding protein beta by MAPK and glycogen synthase kinase 3beta is required for adipogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005; 102(28):9766-71
- [56] Prusty D, Park BH, Davis KE, Farmer SR. Activation of MEK/ERK signaling promotes adipogenesis by enhancing peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) and C/EBPalpha gene expression during the differentiation of 3T3-L1 preadipocytes. *J Biol Chem*. 2002; 277(48):46226-32.
- [57] Hu E, Kim JB, Sarraf P, Spiegelman BM. Inhibition of adipogenesis through MAP kinase-mediated phosphorylation of PPARgamma. *Science*. 1996; 274(5295):2100-3.
- [58] Oakley RH, Cidlowski JA. The biology of the glucocorticoid receptor: new signaling mechanisms in health and disease. *J Allergy Clin Immunol*. 2013; 132(5):1033-44.
- [59] Steger DJ, Grant GR, Schupp M, Tomaru T, Lefterova MI, Schug J, Manduchi E, Stoeckert CJ Jr, Lazar MA. Propagation of adipogenic signals through an epigenomic transition state. *Genes Dev*. 2010; 24(10):1035-44.
- [60] Asada M, Rauch A, Shimizu H, Maruyama H, Miyaki S, Shibamori M, Kawasome H, Ishiyama H, Tuckermann J, Asahara H. DNA binding-dependent glucocorticoid receptor activity promotes adipogenesis via Krüppel-like factor 15 gene expression. *Lab Invest*. 2011; 91(2):203-15.
- [61] Yeh WC, Cao Z, Classon M, McKnight SL. Cascade regulation of terminal adipocyte differentiation by three members of the C/EBP family of leucine zipper proteins. *Genes Dev*. 1995; 9(2):168-81.
- [62] Tomlinson JJ, Boudreau A, Wu D, Atlas E, Haché RJ. Modulation of early human preadipocyte differentiation by glucocorticoids. *Endocrinology*. 2006; 147(11):5284-93.
- [63] Siersbæk R, Nielsen R, John S, Sung MH, Baek S, Loft A, Hager GL, Mandrup S. Extensive chromatin remodelling and establishment of transcription factor 'hotspots' during early adipogenesis. *EMBO J*. 2011; 30(8):1459-72.
- [64] Wiper-Bergeron N, Salem HA, Tomlinson JJ, Wu D, Haché RJ. Glucocorticoid-stimulated preadipocyte differentiation is mediated through acetylation of C/EBPbeta by GCN5. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007; 104(8):2703-8.
- [65] Zhang YY, Li X, Qian SW, Guo L, Huang HY, He Q, Liu Y, Ma CG, Tang QQ. Down-regulation of type I Runx2 mediated by dexamethasone is required for 3T3-L1 adipogenesis. *Mol Endocrinol*. 2012; 26(5):798-808.
- [66] Smas CM, Chen L, Zhao L, Latasa MJ, Sul HS. Transcriptional repression of pref-1 by glucocorticoids promotes 3T3-L1 adipocyte differentiation. *J Biol Chem*. 1999; 274(18):12632-41.
- [67] Li F, Wang D, Zhou Y, Zhou B, Yang Y, Chen H, Song J. Protein kinase A suppresses the differentiation of 3T3-L1 preadipocytes. *Cell Res*. 2008; 18(2):311-23.



- [68] Martini CN, Plaza MV, Vila Mdel C. PKA-dependent and independent cAMP signaling in 3T3-L1 fibroblasts differentiation. *Mol Cell Endocrinol.* 2009; 298(1-2):42-7.
- [69] Ji Z, Mei FC, Cheng X. Epac, not PKA catalytic subunit, is required for 3T3-L1 preadipocyte differentiation. *Front Biosci.* 2010; 2:392-8.
- [70] Xiao H, Leblanc SE, Wu Q, Konda S, Salma N, Marfella CG, Ohkawa Y, Imbalzano AN. Chromatin accessibility and transcription factor binding at the PPAR $\gamma$ 2 promoter during adipogenesis is protein kinase A-dependent. *J Cell Physiol.* 2011; 226(1):86-93.
- [71] Toneatto J, Guber S, Charó NL, Susperreguy S, Schwartz J, Galigniana MD, Piwien-Pilipuk G. Dynamic mitochondrial-nuclear redistribution of the immunophilin FKBP51 is regulated by the PKA signaling pathway to control gene expression during adipocyte differentiation. *J Cell Sci.* 2013; 126(Pt 23):5357-68.
- [72] Gloerich M, Bos JL. Epac: defining a new mechanism for cAMP action. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2010; 50:355-75.
- [73] Tzamelis I, Fang H, Ollero M, Shi H, Hamm JK, Kievit P, Hollenberg AN, Flier JS. 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; 279:36093-36102.
- [74] MacDougald OA, Lane MD. Transcriptional regulation of gene expression during adipocyte differentiation. *Annu Rev Biochem.* 1995; 64:345-73.
- [75] Tang QQ, Otto TC, Lane MD. CCAAT/enhancer-binding protein beta is required for mitotic clonal expansion during adipogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003; 100(3):850-5.
- [76] Zhang JW, Tang QQ, Vinson C, Lane MD. Dominant-negative C/EBP disrupts mitotic clonal expansion and differentiation of 3T3-L1 preadipocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004; 101(1):43-7.
- [77] Zhang JW, Klemm DJ, Vinson C, Lane MD. Role of CREB in transcriptional regulation of CCAAT/enhancer-binding protein beta gene during adipogenesis. *J Biol Chem.* 2004; 279(6):4471-8.
- [78] Tanaka T, Yoshida N, Kishimoto T, Akira S. Defective adipocyte differentiation in mice lacking the C/EBP $\beta$  and/or C/EBP $\delta$  gene. *EMBO J.* 1997; 16(24):7432-43.
- [79] Descombes P, Schibler U. A liver-enriched transcriptional activator protein, LAP, and a transcriptional inhibitory protein, LIP, are translated from the same mRNA. *Cell.* 1991; 67(3):569-79.
- [80] Lefterova MI, Lazar MA. New developments in adipogenesis. *Trends Endocrinol Metab.* 2009; 20(3):107-14.
- [81] Tontonoz P, Hu E, Spiegelman BM. Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR gamma 2, a lipid-activated transcription factor. *Cell.* 1994 Dec; 79(7):1147-56.
- [82] Gurnell M, Wentworth JM, Agostini M, Adams M, Collingwood TN, Provenzano C, Browne PO, Rajanayagam O, Burris TP, Schwabe JW, Lazar MA, Chatterjee VK. A dominant-negative peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR gamma) mutant is a constitutive repressor and inhibits PPARgamma-mediated adipogenesis. *J Biol Chem.* 2000; 275:5754-9.
- [83] Berger J, Patel HV, Woods J, Hayes NS, Parent SA, Clemas J, Leibowitz MD, Elbrecht A, Rachubinski RA, Capone JP, Moller DE. A PPARgamma mutant serves as a dominant negative inhibitor of PPAR signaling and is localized in the nucleus. *Mol Cell Endocrinol.* 2000; 162(1-2):57-67.

- [84] Barak Y, Nelson MC, Ong ES, Jones YZ, Ruiz-Lozano P, Chien KR, Koder A, Evans RM. PPAR gamma is required for placental, cardiac, and adipose tissue development. *Mol Cell*. 1999; 4(4):585-95.
- [85] Kubota N, Terauchi Y, Miki H, Tamemoto H, Yamauchi T, Komeda K, Satoh S, Nakano R, Ishii C, Sugiyama T, Eto K, Tsubamoto Y, Okuno A, Murakami K, Sekihara H, Hasegawa G, Naito M, Toyoshima Y, Tanaka S, Shiota K, Kitamura T, Fujita T, Ezaki O, Aizawa S, Ryoza Nagai, Tobe K, Kimura S, Kadowaki T. PPAR gamma mediates high-fat diet-induced adipocyte hypertrophy and insulin resistance. *Mol Cell*. 1999; 4(4):597-609.
- [86] Rosen ED, Hsu CH, Wang X, Sakai S, Freeman MW, Gonzalez FJ, Spiegelman BM. C/EBPalpha induces adipogenesis through PPARgamma: a unified pathway. *Genes Dev*. 2002; 16(1):22-6.
- [87] Nagai S, Shimizu C, Umetsu M, Taniguchi S, Endo M, Miyoshi H, Yoshioka N, Kubo M, Koike T Identification of a functional peroxisome proliferator-activated receptor responsive element within the murine Perilipin gene. *Endocrinology*. 2004; 145: 2346-56.
- [88] 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.
- [89] Frohnert BI, Hui TY, Bernlohr DA. Identification of a functional peroxisome proliferator-responsive element in the murine fatty acid transport protein gene. *J Biol Chem*. 1999; 274(7):3970-7.
- [90] Martin G, Schoonjans K, Lefebvre AM, Staels B, Auwerx J. Coordinate regulation of the expression of the fatty acid transport protein and acyl-CoA synthetase genes by PPARalpha and PPARgamma activators. *J Biol Chem*. 1997; 272(45):28210-7.
- [91] Wu Z, Rosen ED, Brun R, Hauser S, Adelmant G, Troy AE, McKeon C, Darlington GJ, Spiegelman BM. Cross-regulation of C/EBP alpha and PPAR gamma controls the transcriptional pathway of adipogenesis and insulin sensitivity. *Mol Cell*. 1999; 3(2):151-8.
- [92] Iwaki M, Matsuda M, Maeda N, Funahashi T, Matsuzawa Y, Makishima M, Shimomura I. Induction of adiponectin, a fat-derived antidiabetic and antiatherogenic factor, by nuclear receptors. *Diabetes*. 2003; 52(7):1655-63.
- [93] Zhu Y, Qi C, Korenberg JR, Chen XN, Noya D, Rao MS, Reddy JK. Structural organization of mouse peroxisome proliferator-activated receptor gamma (mPPAR gamma) gene: alternative promoter use and different splicing yield two mPPAR gamma isoforms. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995; 92(17):7921-5.
- [94] Fajas L, Auboeuf D, Raspé E, Schoonjans K, Lefebvre AM, Saladin R, Najib J, Laville M, Fruchart JC, Deeb S, Vidal-Puig A, Flier J, Briggs MR, Staels B, Vidal H, Auwerx J. The organization, promoter analysis, and expression of the human PPARgamma gene. *J Biol Chem*. 1997; 272(30):18779-89.
- [95] Siersbaek R, Nielsen R, Mandrup S. PPARgamma in adipocyte differentiation and metabolism--novel insights from genome-wide studies. *FEBS Lett*. 2010; 584(15):3242-9.
- [96] Lefterova MI, Zhang Y, Steger DJ, Schupp M, Schug J, Cristancho A, Feng D, Zhuo D, Stoeckert CJ Jr, Liu XS, Lazar MA. PPARgamma and C/EBP factors orchestrate adipocyte biology via adjacent binding on a genome-wide scale. *Genes Dev*. 2008; 22(21):2941-52.
- [97] Wu Z, Bucher NL, Farmer SR. Induction of peroxisome proliferator-activated receptor gamma during the conversion of 3T3 fibroblasts into adipocytes is mediated by C/EBPbeta, C/EBPdelta, and glucocorticoids. *Mol Cell Biol*. 1996; 16(8):4128-36.
- [98] Ahmadian M, Suh JM, Hah N, Liddle C, Atkins AR, Downes M, Evans RM. PPAR signaling and metabolism: the good, the bad and the future. *Nat Med*. 2013; 19(5):557-66.

- [99] Oishi Y, Manabe I, Tobe K, Tsushima K, Shindo T, Fujiu K, Nishimura G, Maemura K, Yamauchi T, Kubota N, Suzuki R, Kitamura T, Akira S, Kadowaki T, Nagai R. Krüppel-like transcription factor KLF5 is a key regulator of adipocyte differentiation. *Cell Metab.* 2005; 1(1):27-39.
- [100] Fajas L, Schoonjans K, Gelman L, Kim JB, Najib J, Martin G, Fruchart JC, Briggs M, Spiegelman BM, Auwerx J. Regulation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma expression by adipocyte differentiation and determination factor 1/sterol regulatory element binding protein 1: implications for adipocyte differentiation and metabolism. *Mol Cell Biol.* 1999; 19(8):5495-503.
- [101] Banerjee SS, Feinberg MW, Watanabe M, Gray S, Haspel RL, Denkinger DJ, Kawahara R, Hauner H, Jain MK. The Krüppel-like factor KLF2 inhibits peroxisome proliferator-activated receptor-gamma expression and adipogenesis. *J Biol Chem.* 2003; 278(4):2581-4.
- [102] Tong Q, Tsai J, Tan G, Dalgin G, Hotamisligil GS. Interaction between GATA and the C/EBP family of transcription factors is critical in GATA-mediated suppression of adipocyte differentiation. *Mol Cell Biol.* 2005; 25(2):706-15.
- [103] Hamm JK, Park BH, Farmer SR. A role for C/EBP $\beta$  in regulating peroxisome proliferator-activated receptor gamma activity during adipogenesis in 3T3-L1 preadipocytes. *J Biol Chem.* 2001; 276:18464-71.
- [104] Kim JB, Wright HM, Wright M, Spiegelman BM. ADD1/SREBP1 activates PPARgamma through the production of endogenous ligand. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998; 95(8):4333-7.
- [105] Kliewer SA, Lenhard JM, Willson TM, Patel I, Morris DC, Lehmann JM. A prostaglandin J2 metabolite binds peroxisome proliferator-activated receptor gamma and promotes adipocyte differentiation. *Cell.* 1995; 83(5):813-9.
- [106] Soccio RE, Chen ER, Lazar MA. Thiazolidinediones and the Promise of Insulin Sensitization in Type 2 Diabetes. *Cell Metab.* 2014; 20:573-91.
- [107] Werman A, Hollenberg A, Solanes G, Bjorbaek C, Vidal-Puig AJ, Flier JS. Ligand-independent activation domain in the N terminus of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma). Differential activity of PPARgamma1 and -2 isoforms and influence of insulin. *J Biol Chem.* 1997; 272(32):20230-5.
- [108] van Beekum O, Fleskens V, Kalkhoven E. Posttranslational modifications of PPAR-gamma: fine-tuning the metabolic master regulator. *Obesity.* 2009; 17(2):213-9.
- [109] Choi JH, Banks AS, Estall JL, Kajimura S, Boström P, Laznik D, Ruas JL, Chalmers MJ, Kamenecka TM, Blüher M, Griffin PR, Spiegelman BM. Anti-diabetic drugs inhibit obesity-linked phosphorylation of PPARgamma by Cdk5. *Nature.* 2010; 466(7305):451-6.
- [110] Lin J, Handschin C, Spiegelman BM. Metabolic control through the PGC-1 family of transcription coactivators. *Cell Metab.* 2005; 1(6):361-70.
- [111] Gelman L, Zhou G, Fajas L, Raspé E, Fruchart JC, Auwerx J. p300 interacts with the N- and C-terminal part of PPARgamma2 in a ligand-independent and -dependent manner, respectively. *J Biol Chem.* 1999; 274(12):7681-8.
- [112] Ge K, Guermah M, Yuan CX, Ito M, Wallberg AE, Spiegelman BM, Roeder RG. Transcription coactivator TRAP220 is required for PPAR gamma 2-stimulated adipogenesis. *Nature.* 2002; 417(6888):563-7.
- [113] Picard F, Kurtev M, Chung N, Topark-Ngarm A, Senawong T, Machado De Oliveira R, Leid M, McBurney MW, Guarente L. Sirt1 promotes fat mobilization in white adipocytes by repressing PPAR-gamma. *Nature.* 2004 Jun 17; 429(6993):771-6.

- [114] Yoo EJ, Chung JJ, Choe SS, Kim KH, Kim JB. Down-regulation of histone deacetylases stimulates adipocyte differentiation. *J Biol Chem*. 2006; 281(10):6608-15.
- [115] Yu C, Markan K, Temple KA, Deplewski D, Brady MJ, Cohen RN. The nuclear receptor corepressors NCoR and SMRT decrease peroxisome proliferator-activated receptor gamma transcriptional activity and repress 3T3-L1 adipogenesis. *J Biol Chem*. 2005; 280(14):13600-5.
- [116] Schmidt SF, Jørgensen M, Chen Y, Nielsen R, Sandelin A, Mandrup S. Cross species comparison of C/EBP $\alpha$  and PPAR $\gamma$  profiles in mouse and human adipocytes reveals interdependent retention of binding sites. *BMC Genomics*. 2011; 12:152.
- [117] Madsen MS, Siersbæk R, Boergesen M, Nielsen R, Mandrup S. Peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  and C/EBP $\alpha$  synergistically activate key metabolic adipocyte genes by assisted loading. *Mol Cell Biol*. 2014; 34(6):939-54.
- [118] Linhart HG, Ishimura-Oka K, DeMayo F, Kibe T, Repka D, Poindexter B, Bick RJ, Darlington GJ. C/EBP $\alpha$  is required for differentiation of white, but not brown, adipose tissue. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001; 98(22):12532-7.
- [119] de Rooij J, Zwartkruis FJ, Verheijen MH, Cool RH, Nijman SM, Wittinghofer A, Bos JL. Epac is a Rap1 guanine-nucleotide-exchange factor directly activated by cyclic AMP. *Nature*. 1998; 396(6710):474-7.
- [120] Kawasaki H, Springett GM, Mochizuki N, Toki S, Nakaya M, Matsuda M, Housman DE, Graybiel AM. A family of cAMP-binding proteins that directly activate Rap1. *Science*. 1998; 282(5397):2275-9.
- [121] Banerjee U, Cheng X. Exchange protein directly activated by cAMP encoded by the mammalian rapgef3 gene: Structure, function and therapeutics. *Gene*. 2015; 570(2):157-67.
- [122] Rehmann H, Arias-Palomo E, Hadders MA, Schwede F, Llorca O, Bos JL. Structure of Epac2 in complex with a cyclic AMP analogue and RAP1B. *Nature*. 2008; 455(7209):124-7.
- [123] López De Jesús M, Stope MB, Oude Weernink PA, Mahlke Y, Börgermann C, Ananaba VN, Rimmbach C, Roskopf D, Michel MC, Jakobs KH, Schmidt M. Cyclic AMP-dependent and Epac-mediated activation of R-Ras by G protein-coupled receptors leads to phospholipase D stimulation. *J Biol Chem*. 2006; 281(31):21837-47.
- [124] Hochbaum D, Tanos T, Ribeiro-Neto F, Altschuler D, Coso OA. Activation of JNK by Epac is independent of its activity as a Rap guanine nucleotide exchanger. *J Biol Chem*. 2003; 278(36):33738-46.
- [125] Bos JL. Epac proteins: multi-purpose cAMP targets. *Trends Biochem Sci*. 2006; 31(12):680-6.
- [126] Cheng X, Ji Z, Tsalkova T, Mei F. Epac and PKA: a tale of two intracellular cAMP receptors. *Acta Biochim Biophys Sin*. 2008; 40(7):651-62.
- [127] Holz GG, Chepurny OG, Schwede F. Epac-selective cAMP analogs: new tools with which to evaluate the signal transduction properties of cAMP-regulated guanine nucleotide exchange factors. *Cell Signal*. 2008; 20(1):10-20.
- [128] Mediero A, Perez-Aso M, Cronstein BN. Activation of EPAC1/2 is essential for osteoclast formation by modulating NF $\kappa$ B nuclear translocation and actin cytoskeleton rearrangements. *FASEB J*. 2014; 28(11):4901-13.

- [129] Monaghan TK, Mackenzie CJ, Plevin R, Lutz EM. PACAP-38 induces neuronal differentiation of human SH-SY5Y neuroblastoma cells via cAMP-mediated activation of ERK and p38 MAP kinases. *J Neurochem.* 2008; 104(1):74-88.
- [130] Bacallao K, Monje PV. Opposing roles of PKA and EPAC in the cAMP-dependent regulation of schwann cell proliferation and differentiation. *PLoS One.* 2013; 8(12):e82354.
- [131] Fritz AL, Adil MM, Mao SR, Schaffer DV. cAMP and EPAC Signaling Functionally Replace OCT4 During Induced Pluripotent Stem Cell Reprogramming. *Mol Ther.* 2015; 23(5):952-63.
- [132] Kang G, Chepurny OG, Holz GG. cAMP-regulated guanine nucleotide exchange factor II (Epac2) mediates Ca<sup>2+</sup>-induced Ca<sup>2+</sup> release in INS-1 pancreatic beta-cells. *J Physiol.* 2001; 536(Pt 2):375-85.
- [133] Ozaki N, Shibasaki T, Kashima Y, Miki T, Takahashi K, Ueno H, Sunaga Y, Yano H, Matsuura Y, Iwanaga T, Takai Y, Seino S. cAMP-GEFII is a direct target of cAMP in regulated exocytosis. *Nat Cell Biol.* 2000; 2:805-811.
- [134] Komai AM, Brännmark C, Musovic S, Olofsson CS. PKA-independent cAMP stimulation of white adipocyte exocytosis and adipokine secretion: modulations by Ca<sup>2+</sup> and ATP. *J Physiol.* 2014; 592(23):5169-86.
- [135] Yan J, Mei FC, Cheng H, Lao DH, Hu Y, Wei J, Patrikeev I, Hao D, Stutz SJ, Dineley KT, Motamedi M, Hommel JD, Cunningham KA, Chen J, Cheng X. Enhanced leptin sensitivity, reduced adiposity, and improved glucose homeostasis in mice lacking exchange protein directly activated by cyclic AMP isoform 1. *Mol Cell Biol.* 2013; 33(5):918-26.
- [136] Fukuda M, Williams KW, Gautron L, Elmquist JK. Induction of leptin resistance by activation of cAMP-Epac signaling. *Cell Metab.* 2011; 13(3):331-9.
- [137] Lehmann JM, Holzmann B, Breitbart EW, Schmiegelow P, Riethmüller G, Johnson JP. Discrimination between benign and malignant cells of melanocytic lineage by two novel antigens, a glycoprotein with a molecular weight of 113,000 and a protein with a molecular weight of 76,000. *Cancer Res.* 1987; 47(3):841-5.
- [138] Wang Z, Yan X. CD146, a multi-functional molecule beyond adhesion. *Cancer Lett.* 2013; 2:150-62.
- [139] Russell KC, Phinney DG, Lacey MR, Barrilleaux BL, Meyertholen KE, O'Connor In vitro high-capacity assay to quantify the clonal heterogeneity in trilineage potential of mesenchymal stem cells reveals a complex hierarchy of lineage commitment. *KC Stem Cells.* 2010; 28(4):788-98.
- [140] Lei X, Guan CW, Song Y, Wang H. The multifaceted role of CD146/MCAM in the promotion of melanoma progression. *Cancer Cell Int.* 2015; 15(1):3.
- [141] Dye DE, Karlen S, Rohrbach B, Staub O, Braathen LR, Eidne KA, Coombe DR. hShroom1 links a membrane bound protein to the actin cytoskeleton. *Cell Mol Life Sci.* 2009; 66(4):681-96.
- [142] Guezguez B, Vigneron P, Lamerant N, Kieda C, Jaffredo T, Dunon D. Dual role of melanoma cell adhesion molecule (MCAM)/CD146 in lymphocyte endothelium interaction: MCAM/CD146 promotes rolling via microvilli induction in lymphocyte and is an endothelial adhesion receptor. *J Immunol.* 2007; 179(10):6673-85.
- [143] Taira E, Nagino T, Tsukamoto Y, Okumura S, Muraoka O, Sakuma F, Miki N. Cytoplasmic domain is not essential for the cell adhesion activities of gicerin, an Ig-superfamily molecule. *Exp Cell Res.* 1999; 253(2):697-703.

- [144]Daniel L, Bardin N, Moal V, Dignat-George F, Berland Y, Figarella-Branger D. Tubular CD146 expression in nephropathies is related to chronic renal failure. *Nephron Exp Nephrol.* 2005; 99(4):e105-11.
- [145]Mintz-Weber CS, Johnson JP. Identification of the elements regulating the expression of the cell adhesion molecule MCAM/MUC18. Loss of AP-2 is not required for MCAM expression in melanoma cell lines. *J Biol Chem.* 2000; 275(44):34672-80.
- [146]Lenhard B, Sandelin A, Carninci P. Metazoan promoters: emerging characteristics and insights into transcriptional regulation. *Nat Rev Genet.* 2012; 13(4):233-45.
- [147]Rummel MM, Sers C, Johnson JP. Phorbol ester and cyclic AMP-mediated regulation of the melanoma-associated cell adhesion molecule MUC18/MCAM. *Cancer Res.* 1996; 56(9):2218-23.
- [148]Kohama K, Tsukamoto Y, Furuya M, Okamura K, Tanaka H, Miki N, Taira E. Molecular cloning and analysis of the mouse gicerin gene. *Neurochem Int.* 2005; 46(6):465-70.
- [149]Karlen S, Braathen LR. Regulation of the melanoma cell adhesion molecule gene in melanoma: modulation of mRNA synthesis by cyclic adenosine monophosphate, phorbol ester, and stem cell Factor/c-kit signaling. *J Invest Dermatol.* 1999; 113(5):711-9.
- [150]Karlen S, Braathen LR. Role of the initiator element in the regulation of the melanoma cell adhesion molecule gene. *J Invest Dermatol.* 2000; 115(4):668-73.
- [151]Hilger-Eversheim K, Moser M, Schorle H, Buettner R. Regulatory roles of AP-2 transcription factors in vertebrate development, apoptosis and cell-cycle control. *Gene.* 2000; 260(1-2):1-12.
- [152]Leigh O'Connor, Jane Gilmour, and Constanze Bonifer. The Role of the Ubiquitously Expressed Transcription Factor Sp1 in Tissue-specific Transcriptional Regulation and in Disease. *Yale J Biol Med.* 2016; 89(4): 513–525.
- [153]Jean D, Gershenwald JE, Huang S, Luca M, Hudson MJ, Tainsky MA, Bar-Eli M. Loss of AP-2 results in up-regulation of MCAM/MUC18 and an increase in tumor growth and metastasis of human melanoma cells. *J Biol Chem.* 1998; 273(26):16501-8.
- [154]Williams B, Schneider RJ, Jamal S. Akt and PI3K-dependent but CREB-independent upregulation of MCAM by endothelin-3 in human melanocytes. *Melanoma Res.* 2014; 24(4):404-7.
- [155]Bardin N, Anfosso F, Massé JM, Cramer E, Sabatier F, Le Bivic A, Sampol J, Dignat-George F. Identification of CD146 as a component of the endothelial junction involved in the control of cell-cell cohesion. *Blood.* 2001; 98(13):3677-84.
- [156]Mills L, Tellez C, Huang S, Baker C, McCarty M, Green L, Gudas JM, Feng X, Bar-Eli M. Fully human antibodies to MCAM/MUC18 inhibit tumor growth and metastasis of human melanoma. *Cancer Res.* 2002; 62(17):5106-14.
- [157]Jiang T, Zhuang J, Duan H, Luo Y, Zeng Q, Fan K, Yan H, Lu D, Ye Z, Hao J, Feng J, Yang D, Yan X. CD146 is a coreceptor for VEGFR-2 in tumor angiogenesis. *Blood.* 2012; 120(11):2330-9.
- [158]Li G, Kalabis J, Xu X, Meier F, Oka M, Bogenrieder T, Herlyn M. Reciprocal regulation of MelCAM and AKT in human melanoma. *Oncogene.* 2003; 22(44):6891-9.
- [159]Anfosso F, Bardin N, Vivier E, Sabatier F, Sampol J, Dignat-George F. Outside-in signaling pathway linked to CD146 engagement in human endothelial cells. *J Biol Chem.* 2001; 276(2):1564-9.

- [160]Luo Y, Zheng C, Zhang J, Lu D, Zhuang J, Xing S, et al. Recognition of CD146 as an ERM-binding protein offers novel mechanisms for melanoma cell migration. *Oncogene*. 2012; 3:306–21.
- [161]Yannarelli G, Pacienza N, Cuniberti L, Medin J, Davies J, Keating A. Brief report: The potential role of epigenetics on multipotent cell differentiation capacity of mesenchymal stromal cells. *Stem Cells*. 2013; 31(1):215-20.
- [162]Stopp S, Bornhäuser M, Ugarte F, Wobus M, Kuhn M, Brenner S, Thieme S. Expression of the melanoma cell adhesion molecule in human mesenchymal stromal cells regulates proliferation, differentiation, and maintenance of hematopoietic stem and progenitor cells. *Haematologica*. 2013; 98(4):505-13.
- [163]Maijenburg MW, Kleijer M, Vermeul K, Mul EP, van Alphen FP, van der Schoot CE, Voermans C. The composition of the mesenchymal stromal cell compartment in human bone marrow changes during development and aging. *Haematologica*. 2012; 97(2):179-83.
- [164]Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970; 227(5259):680-5.
- [165]Koh YK, Lee MY, Kim JW, Kim M, Moon JS, Lee YJ, Ahn YH, Kim KS. Lipin1 is a key factor for the maturation and maintenance of adipocytes in the regulatory network with CCAAT/enhancer-binding protein alpha and peroxisome proliferator-activated receptor gamma 2. *J Biol Chem*. 2008; 283(50):34896-906.
- [166]Zhang L, Paddon C, Lewis MD, Grennan-Jones F, Ludgate M. Gsalpha signalling suppresses PPARgamma2 generation and inhibits 3T3L1 adipogenesis. *J Endocrinol*. 2009;202(2):207-15.
- [167]Kato Y, Ozaki N, Yamada T, Miura Y, Oiso Y. H-89 potentiates adipogenesis in 3T3-L1 cells by activating insulin signaling independently of protein kinase A. *Life Sci*. 2007; 80(5):476-83.
- [168]Murray AJ. Pharmacological PKA inhibition: all may not be what it seems. *Sci Signal*. 2008; 1(22):re4.
- [169]Noguchi M, Hosoda K, Fujikura J, Fujimoto M, Iwakura H, Tomita T, Ishii T, Arai N, Hirata M, Ebihara K, Masuzaki H, Itoh H, Narumiya S, Nakao K. Genetic and pharmacological inhibition of Rho-associated kinase II enhances adipogenesis. *J Biol Chem*. 2007; 282(40):29574-83.
- [170]Soukas A, Socci ND, Saatkamp BD, Novelli S, Friedman JM. Distinct transcriptional profiles of adipogenesis in vivo and in vitro. *J Biol Chem*. 2001; 276(36):34167-74.
- [171]Hackl H, Burkard TR, Sturn A, Rubio R, Schleiffer A, Tian S, Quackenbush J, Eisenhaber F, Trajanoski Z. Molecular processes during fat cell development revealed by gene expression profiling and functional annotation. *Genome Biol*. 2005; 6(13):R108.
- [172]Mikkelsen TS, Xu Z, Zhang X, Wang L, Gimble JM, Lander ES, Rosen ED. Comparative epigenomic analysis of murine and human adipogenesis. *Cell*. 2010; 143(1):156-69.
- [173]Liu J, DeYoung SM, Zhang M, Zhang M, Cheng A, Saltiel AR. Changes in integrin expression during adipocyte differentiation. *Cell Metab*. 2005; 2(3):165-77.
- [174]Leesnitzer LM, Parks DJ, Bledsoe RK, Cobb JE, Collins JL, Consler TG, Davis RG, Hull-Ryde EA, Lenhard JM, Patel L, Plunket KD, Shenk JL, Stimmel JB, Therapontos C, Willson TM, Blanchard SG. Functional consequences of cysteine modification in the ligand binding sites of peroxisome proliferator activated receptors by GW9662. *Biochemistry*. 2002; 41(21):6640-50.

- [175]Cawthorn WP, Sethi JK. TNF-alpha and adipocyte biology. *FEBS Lett.* 2008; 582(1):117-31.
- [176]Zandbergen F, Mandard S, Escher P, Tan NS, Patsouris D, Jatkoe T, Rojas-Caro S, Madore S, Wahli W, Tafuri S, Müller M, Kersten S. The G0/G1 switch gene 2 is a novel PPAR target gene. *Biochem J.* 2005; 392(Pt 2):313-24.
- [177]Lauvrud AT, Kelk P, Wiberg M, Kingham PJ. Characterization of human adipose tissue-derived stem cells with enhanced angiogenic and adipogenic properties. *J Tissue Eng Regen Med.* 2016. doi: 10.1002/term.2147.
- [178]Mohsen-Kanson T, Hafner AL, Wdziekonski B, Villageois P, Chignon-Sicard B, Dani C. Expression of cell surface markers during self-renewal and differentiation of human adipose-derived stem cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2013; 430(3):871-5.
- [179]Zigler M, Villares GJ, Dobroff AS, Wang H, Huang L, Braeuer RR, Kamiya T, Melnikova VO, Song R, Friedman R, Alani RM, Bar-Eli M. Expression of Id-1 is regulated by MCAM/MUC18: a missing link in melanoma progression. *Cancer Res.* 2011; 71(10):3494-504.
- [180]Lu D, Chen J, Hai T. The regulation of ATF3 gene expression by mitogen-activated protein kinases. *Biochem J.* 2007; 401:559–67.
- [181]Jang MK, Jung MH. ATF3 represses PPAR $\gamma$  expression and inhibits adipocyte differentiation. *Biochem Biophys Res Commun.* 2014; 454(1):58-64.