



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS FÍSICAS Y MATEMÁTICAS
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA, BIOTECNOLOGÍA Y MATERIALES

ESTUDIO Y EVALUACIÓN DE LA COMUNICACIÓN CELULAR MEDIADA POR
VESÍCULAS EXTRACELULARES DE ADIPOCITOS (ADEVS) EN CÉLULAS RENALES
HUMANAS

MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE INGENIERA CIVIL EN BIOTECNOLOGÍA

MARÍA PAZ HERNÁNDEZ MEJÍAS

PROFESORA GUÍA:

ZIOMARA GERDTZEN HAKIM

MIEMBROS DE LA COMISIÓN:

CRISTIAN CARVAJAL MALDONADO

MARÍA ELENA LIENQUEO CONTRERAS

ALEJANDRA SANDOVAL BÓRQUEZ

Este trabajo ha sido financiado parcialmente por Fondecyt Regular N°1212006

Este trabajo ha sido realizado en cotutela con la Pontificia Universidad Católica de Chile

SANTIAGO DE CHILE

2023

**RESUMEN DE LA MEMORIA PARA OPTAR AL
TÍTULO DE: INGENIERA CIVIL EN BIOTECNOLOGÍA**

POR: MARÍA PAZ HERNÁNDEZ MEJÍAS

FECHA: 2023

PROF. GUÍA: ZIOMARA GERDTZEN HAKIM

**ESTUDIO Y EVALUACIÓN DE LA COMUNICACIÓN CELULAR MEDIADA POR
VESÍCULAS EXTRACELULARES DE ADIPOCITOS (ADEVS) EN CÉLULAS RENALES
HUMANAS**

La obesidad es una enfermedad de carácter mundial que afecta a un gran porcentaje de la población mundial. Esta se caracteriza por el aumento del tamaño del tejido adiposo, lo que genera un estado de inflamación crónica de baja intensidad, que aumenta la liberación de adipocinas que pueden alterar el funcionamiento de otros tejidos y órganos, generando diversas patologías, como diabetes, enfermedades cardiovasculares, etc.

Además, el tejido adiposo es capaz de liberar vesículas extracelulares (adEVs), las cuales también pueden ejercer un rol regulatorio a distancia. Por ello, en este trabajo, se propone que estas adEVs pudiesen contener factores que generen un efecto negativo en diversos órganos, como, por ejemplo, el riñón y así, provocar un estado de patología crónica. Así, se realiza un modelo de trabajo *in vitro* donde se estudie el efecto de las adEVs sobre células renales, buscando simular lo que ocurriría en un organismo y, evaluar si se genera un efecto mediante la medición de la expresión génica de marcadores de inflamación y fibrosis renal.

Para ello, se caracterizó de manera efectiva el proceso de adipogénesis *in vitro* de la línea celular de preadipocitos SW872 mediante cambios morfológicos y de expresión génica y proteica. Luego, mediante ultracentrifugación, se aisló las adEVs desde el medio de cultivo de adipocitos, las que se caracterizaron por su tamaño, morfología y cargo proteico.

Las adEVs se administraron a cultivos de células renales humana HCD por 24 horas. Se evaluó la expresión génica de un grupo de marcadores de inflamación y fibrosis, en presencia de adEVs, las que afectaron la expresión de IL-6, NGAL, COL1A1 y CTGF, y aumentaron en forma significativa la expresión de IL-1B.

Por último, se estudió la internalización de las adEVs en las células renales *in vitro* mediante microscopía de fluorescencia, donde se observó la efectiva captación de estas estructuras por parte de la célula renal.

En base a estos antecedentes, este estudio revela que las adEVs de la línea SW872 pueden ser aisladas y concentradas *in vitro* de manera efectiva mediante cultivos en escala de laboratorio. Además, las adEVs pueden interactuar con células de la línea celular renal HCD *in vitro*, siendo capaces de modificar su fenotipo. Este resultado es pionero y contribuye un aporte a la comprensión de la fisiopatología de la obesidad y su impacto en otros tejidos.

*Una vez descartado lo imposible, lo que queda,
por improbable que parezca, debe ser la verdad.*

-Sir Arthur Conan Doyle

AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer a todas las personas que, de alguna manera u otra, han formado parte de mi vida y me han ayudado a ser la persona que soy hoy en día.

En primer lugar, agradecerle a toda mi familia por todo lo que me han brindado. A mi mamá María y papá Juan Carlos por ser grandes guías y enseñarme como una persona debe ser. Por todo el amor y los valores entregados que me convirtieron en quien soy ahora. A mi hermana María José por ser mi acompañante en todas desde que somos pequeñas y siempre estar ahí cuando la necesito, ya sea para estupideces o cosas serias. A mi hermano Juan Pablo por todos los buenos momentos entregados y enseñarme de manera indirecta como es ser una persona responsable. Si bien no somos de expresar nuestros sentimientos muy seguido, ellos saben lo importante que son para mí y cuanto los quiero y estimo. Por ellos haría lo que sea cuando fuese necesario.

A los miembros gatunos de la familia que están y los que ya se fueron, Riko, Paty, Luciano, Jill, Kelly y Sabrina, que fueron y serán una de las principales motivaciones de mi vida y de mi proceso educativo, los cuales, gracias a un cariño, un maullido o ronroneo, lograban alegrarme y calmarme cuando más lo necesitaba.

También quiero agradecer a todos mis amigos, tanto los que me acompañaron en mi vida escolar como los que me han acompañado en la vida universitaria. Han sido un pilar fundamental a lo largo de todo este proceso y no creo haber podido lograrlo sin ustedes. Me acompañaron y ayudaron cuando sentía que el ámbito académico me iba a superar. También a los que estuvieron en un momento, pero que, por razones de la vida, ya no están.

Quiero agradecer también a todo el equipo de trabajo que forma el Laboratorio de Endocrinología UC, gracias a ustedes logré crecer como persona de una manera que pensé imposible para mí. Al profesor Cristian Carvajal por todo el conocimiento dado y por darme la oportunidad de integrarme a su equipo de trabajo, aunque la primera vez que nos vimos, yo pareciera una persona muy nerviosa y ansiosa. A los integrantes de “AdipoTeam” por ser parte fundamental en el desarrollo de esta tesis de investigación, a Alejandra Sandoval por ser una gran mentora y entregarme todo su conocimiento científico y a Pablo Carrión por ser el mejor compañero de experimentos que hubiera podido tener. A Jorge Pérez por toda la enseñanza y amistad que me entregó durante todo el tiempo que estuvo en el laboratorio. A Alejandra Tapia por todo el apoyo científico que me dio cuando lo necesitaba y a Héctor por toda la ayuda y los buenos momentos dados a lo largo del tiempo que llevo trabajando en el laboratorio.

Finalmente, agradezco al Proyecto FONDECYT 1212006, CETREN UC y THANI Biotechnologies por ser las fuentes de financiamiento que permitieron el desarrollo de esta tesis de investigación.

TABLA DE CONTENIDO

1. Introducción.....	1
2. Marco teórico	2
2.1. El tejido adiposo	2
2.2. Expansión del tejido adiposo	5
2.1. El tejido adiposo y su rol endocrino en otros tejidos	9
2.2. Tejido adiposo, obesidad y comorbilidades asociadas	11
2.3. Obesidad: diagnóstico y tratamiento.....	14
2.4. Vesículas Extracelulares (EVs).....	17
2.5. Tejido adiposo y las vesículas extracelulares derivadas de adipocitos (adEVs)	25
3. Motivación e hipótesis de estudio	26
3.1. Motivación del estudio	26
3.2. Modelo e hipótesis de estudio	26
4. Objetivos	27
4.1. Objetivo general:.....	27
4.2. Objetivos específicos:.....	27
5. Materiales y métodos	28
5.1. Caracterización de la adipogénesis en la línea celular SW872	28
5.2. Aislamiento y caracterización de adEVs.....	33
5.3. Estudio del efecto inflamatorio y/o fibrótico de adEVs sobre cultivos renales	35
5.4. Estudio internalización de adEVs en células renales.....	37
5.5. Partidores utilizados	39
6. Resultados	41
6.1. Caracterización adipogénesis en la línea celular adiposa SW872	41
6.2. Aislamiento y caracterización adEVs.....	50
6.3. Estudio del efecto inflamatorio y/o fibrótico de adEVs sobre células renales HCD. ..	53
6.4. Estudio internalización de adEVs en la línea celular renal HCD.....	56
7. Discusión.....	60
7.1. Fundamentos de discusión.....	60
7.2. Vesículas extracelulares y su potencial uso como biomarcadores	62

7.3. Caracterización adipogénesis en la línea celular adiposa SW872	63
7.4. Aislamiento y caracterización de adEVs desde un cultivo a escala de laboratorio de SW872 diferenciadas	65
7.5. Estudio del efecto proinflamatorio y/o fibrótico que los adEVs pueden generar sobre células renales HCD.....	66
7.6. Estudio internalización de adEVs en la línea celular renal HCD.....	69
7.7. Limitaciones y proyecciones del estudio.....	69
7.8. Impacto del estudio realizado	71
8. Conclusiones.....	73
Bibliografía.....	74
Anexos.....	81
Anexo A. Marcadores de adipogénesis	81
Anexo B. Protocolo Ultracentrifugación	84

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Adipocinas secretadas por WAT y su función fisiológica. Extraída de “Tejido adiposo: heterogeneidad celular y diversidad funcional- Esteve, M.” [6].....	10
Tabla 2: Partidores utilizados para evaluar la expresión de genes endógenos en los cultivos.	39
Tabla 3: Partidores utilizados para evaluar la expresión génica de marcadores de adipogenesis.....	39
Tabla 4: Partidores utilizados para evaluar la expresión génica de factores inflamatorios del cultivo.....	40
Tabla 5: Partidores utilizados para evaluar la expresión génica de factores fibróticos del cultivo.....	40
Tabla 6: Porcentaje de tinción Oil Red O en el cultivo a lo largo del proceso de diferenciación.	43
Tabla 7: Concentración, tamaño medio y moda de las nanopartículas aisladas mediante ultracentrifugación desde cultivo de adipocitos.....	52
Tabla 8: Concentración, tamaño medio y moda de las nanopartículas aisladas mediante ultracentrifugación desde cultivo de adipocitos.....	56

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Distribución del tejido adiposo blanco y pardo en el cuerpo humano.	3
Figura 2: Diferencias en la morfología de los distintos tipos de adipocitos que conforman el tejido adiposo. Adaptada desde “ <i>Adipose Tissue: Physiology to Metabolic Dysfunction- Allison J. et Al.</i> ” [3]	4
Figura 3: Vista general del proceso de adipogénesis. Adaptado desde “ <i>Adipogenesis and metabolic health- Ghaben, A. and Scherer, P.</i> ” [7]	7
Figura 4: Proceso de hipertrofia en el tejido adiposo. Adaptado desde “ <i>Adipogenesis and metabolic health- Ghaben, A. and Scherer, P.</i> ” [7]	8
Figura 5: Distribución de los túbulos que componen la nefrona, la unidad funcional del riñón. [26].....	13
Figura 6: Estructura y contenido de las vesículas extracelulares. Adaptada desde “ <i>Metabolomics of Extracellular Vesicles: A Future Promise of Multiple Clinical Applications- Wu, Y. et al.</i> ” [55].....	18
Figura 7: Formación y liberación de exosomas, microvesículas y cuerpos apoptóticos, los tres tipos de vesículas extracelulares. Adaptado desde “ <i>Role of microvesicles as biomarkers and future pharmacology targets of cardiovascular diseases-Carracedo, J. et Al.</i> ” [59]	20
Figura 8: Representación del proceso de ultracentrifugación diferencial.....	22
Figura 9: Representación del proceso de centrifugación de gradiente de densidad.....	22
Figura 10: Fundamento del Análisis de Seguimiento de Nanopartículas. Adaptado desde “ <i>NTA: Principles and methodology- Malvern Panalytical</i> [63]”	24
Figura 11: Diagrama de flujo resumen de la metodología realizada en el proyecto.	28
Figura 12: Metodología realizada para diferenciar preadipocitos SW872 a adipocitos por un período de 10 días.....	30
Figura 13: Distribución de las condiciones a evaluar a lo largo del proceso de diferenciación de los preadipocitos de la línea SW872 por un período de 10 días.....	31
Figura 14: Diagrama resumen de la metodología utilizada para evaluar el efecto inflamatorio y/o fibrótico de las adEVs sobre células renales HCD.	36
Figura 15: Fotografía de microscopio óptico realizadas a células de la línea SW872 a lo largo de 10 días de diferenciación a 400x.	42
Figura 16: Fotografías bajo microscopía óptica de la Tinción Oil Red O realizada en células de la línea SW872 a lo largo del proceso de diferenciación a 400x.....	43
Figura 17: Variación de la expresión génica relativa de distintos marcadores de diferenciación adiposa a lo largo de diez días de diferenciación, donde se evaluó a) Perilipina 1, b) Acetyl-CoA Carboxylase Alpha, c) Fatty acid synthase, d) Adiponectina, e) Peroxisome proliferator activated receptor Gamma y f) Fatty Acid-binding protein 4, con * $p < 0,05$	45
Figura 18: Resultados Western Blot y análisis de densitometría para la proteína PPAR γ realizados a muestras de preadipocitos y adipocitos durante el proceso de adipogénesis. ...	47

Figura 19: Resultados Western Blot y análisis de densitometría para la proteína PLIN1 realizados a muestras de preadipocitos y adipocitos durante el proceso de adipogénesis. ...	47
Figura 20: Resultados Western Blot y análisis de densitometría para la proteína ACACA realizados a muestras de preadipocitos y adipocitos durante el proceso de adipogénesis. ...	48
Figura 21: Resultados Western Blot y análisis de densitometría para la proteína FASN realizados a muestras de preadipocitos y adipocitos durante el proceso de adipogénesis. ...	49
Figura 22: Resultados Western Blot y análisis de densitometría para la proteína FABP4 realizados a muestras de preadipocitos y adipocitos durante el proceso de adipogénesis. ...	49
Figura 23: Resultados de la caracterización realizada a las muestras de adEVs aisladas desde el cultivo. A) Distribución de la concentración según el tamaño de partícula: B) Membranas de Western Blot obtenidas para CD9 y TSG101; c) Microscopía Electrónica de Transmisión.	51
Figura 24: Expresión génica de los marcadores de inflamación de a) IL-6, b) IL-1B, c) NGAL y d) PAI-1 en cultivos de células HCD que fueron co-cultivadas con PBS o con adEVs suspendidos en PBS por un periodo de 24 horas (*p<0,05).	54
Figura 25: Expresión génica de los marcadores de fibrosis de a) COL1A1, b) CTGF y c) FN1 en cultivos de células HCD que fueron co-cultivadas con PBS o con adEVs suspendidos en PBS por un periodo de 24 horas (*p<0,05).	55
Figura 26: Distribución de la concentración y tamaño de las adEVs aisladas que fueron marcadas con el reactivo PKH67.	57
Figura 27: Fotografías de la microscopía óptica y de fluorescencia realizadas al cultivo de células HCD co-cultivadas con el control negativo de tinción PKH67.	58
Figura 28: Fotografías de la microscopía óptica y de fluorescencia realizadas al cultivo de células HCD co-cultivadas con las adEVs marcadas previamente con el reactivo PKH67. ...	59
Figura 29: Diagrama general que resume la acción de las adEVs generadas desde adipocitos y su impacto en las células renales HCD en el modelo <i>in vitro</i> utilizado en este estudio.	72
Figura 30: Diagrama resumen del protocolo de aislamiento de adEVs desde medio de cultivo.	84

1. INTRODUCCIÓN

La obesidad se considera como una de las mayores problemáticas a la que la sociedad actual se ve enfrentada. Tanto así, que se ha definido como la pandemia del siglo XXI debido a su alto porcentaje de incidencia en la población mundial [1].

Es una enfermedad crónica no transmisible y de carácter mundial, que se define como la acumulación anormal o excesiva de grasa que aumenta el tamaño del tejido adiposo del organismo [2]. Esta, es perjudicial para la salud del individuo ya que ha sido asociada al aumento del desarrollo de distintos tipos de enfermedades metabólicas, tal como lo son las enfermedades cardiovasculares, diabetes, cáncer, entre otras [2]. Hoy en día, en una gran mayoría de países, las muertes por sobrepeso y obesidad representan un mayor número en comparación a las asociadas a desnutrición, lo que genera una alta preocupación en la población [3].

Según la Organización Mundial de Salud [2], en el año 2016, el 39% de la población mundial adulta eran consideradas como personas con sobrepeso y, el 13% de esta población, eran personas con obesidad. Esto implicaría que, en 2016, más del 50% de la población mundial presentaba un grado de obesidad.

En Chile el panorama observado no es distinto. Entre los años 2016 y 2017, el Ministerio de Salud realizó una encuesta a nivel nacional a más de 6.000 personas sobre los 15 años [4]. Así, se determinó que un 75% del grupo presentaba un grado de obesidad. En específico, el 40,2% tenía sobrepeso, el 31,4% obesidad y el 3,4% era obeso mórbido.

Esta gran incidencia de la enfermedad puede atribuirse a distintos factores de la actualidad, tal como el avance económico, la utilización de transportes mecanizados, la urbanización, crecimiento comercial, industrialización, la adopción progresiva de un estilo de vida sedentario y a la transición a una alimentación en base a alimentos procesados y dietas altas en calorías [5].

Así, dado que la obesidad presenta una alta prevalencia e impacto en patologías humanas, es importante el desarrollo e innovación en investigación biomédica (traslacional), la cual tiene como desafío actual innovar en conocimiento, desarrollar investigación de punta y evaluar nuevas tecnologías. En particular, el presente estudio evalúa el rol *in vitro* de las vesículas extracelulares derivadas de adipocitos o adEVs en inflamación y daño en otros tejidos, como el tejido renal, cuyos resultados serán relevantes en el conocimiento del circuito adiposo-renal mediado por EVs.

2. MARCO TEÓRICO

2.1. El tejido adiposo

El tejido adiposo está conformado principalmente por adipocitos, pero también por preadipocitos (células precursoras a los adipocitos), células madre, macrófagos, neutrófilos, linfocitos y células endoteliales [6].

Desde su descubrimiento hasta hace algunos años, se le había atribuido únicamente un rol en el almacenamiento de energía, amortiguación y termogénesis [7]. Sin embargo, en el último tiempo, se ha observado que el tejido adiposo tiene más formas de participación en el control del funcionamiento del organismo.

Se ha determinado que este tejido tiene un rol fundamental en la mantención de la homeostasis, ya que, posee funciones inmunológicas y endocrinas al ser capaz de secretar adipocinas y citoquinas, proteínas que actúan como reguladores de la respuesta inmune e inflamatoria en el organismo [8]. Además, se ha visto que los adipocitos del tejido adiposo tienen una alta sensibilidad a la insulina y están envueltos en la regulación de los niveles de la glucosa en la sangre [3].

2.1.1. Estructura del tejido adiposo

En mamíferos, el tejido adiposo ha sido clasificado en dos tipos, en tejido adiposo blanco (*White Adipose Tissue, WAT*) y en tejido adiposo pardo (*Brown Adipose Tissue, BAT*), los cuales pueden ser distinguidos basados en el color del tejido. En la Figura 1 se representa la variación en la distribución del tejido adiposo blanco y pardo en el cuerpo del humano.

El WAT es el tipo de tejido más abundante y está distribuido a lo largo de todo el organismo, teniendo varias áreas de depósito, tal como lo es el tejido subcutáneo, el perivascular y el área visceral. En esta última, ocupa los espacios entre los órganos abdominales y los mantiene en su lugar. Además, este tejido visceral tiene una alta relación con la génesis del síndrome metabólico y la patología asociada con la obesidad [9]. WAT también se encarga del almacenamiento del exceso de calorías del organismo en forma de triglicéridos, generando gotas lipídicas que usan gran parte del citosol de los adipocitos que lo conforman [7].

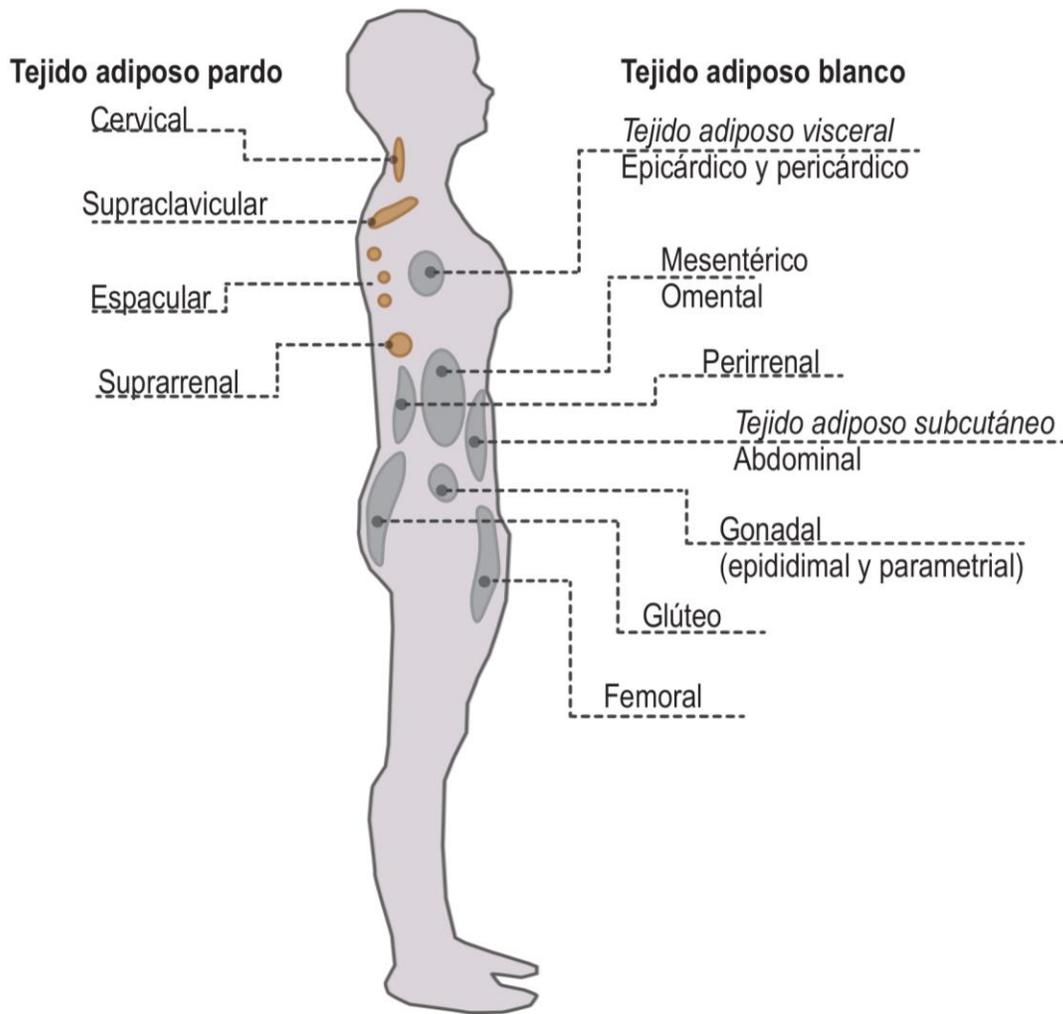


Figura 1: Distribución del tejido adiposo blanco y pardo en el cuerpo humano.

En el último tiempo, se ha descubierto que WAT también tiene un rol endocrino, gracias a la capacidad que tiene de expresar y liberar diversos tipos de moléculas bioactivas, como lo son lípidos, factores de ácidos nucleicos y proteínas, en específico, la capacidad de secretar de adipocinas, lo que permite una comunicación endocrina y paracrina [3].

Los adipocitos relacionados al WAT o adipocitos blancos, tienen una morfología característica. En general son esféricos y contienen una gran y única gota lipídica, la que, por su tamaño, empuja a los demás organelos, incluyendo el núcleo, hacia un lado. Este tipo celular puede expandirse hasta un diámetro de 100 [µm] [3]. La representación de esta morfología puede observar en la Figura 2.

Por otro lado, el BAT se encarga de la termogénesis del organismo, lo que es crítico para la mantención de la temperatura corporal [8]. En mamíferos, se presenta en su mayoría en el periodo post natal y durante la hibernación y, se ha visto que la actividad del BAT es mayor durante épocas invernales y más baja durante el verano [3]. Los adipocitos que componen este tejido se denominan adipocitos pardos y, a diferencia de los adipocitos blancos, tienen una morfología elipsoidal, poseen múltiples gotas lipídicas dispersas a lo largo de todo el citoplasma y contienen un mayor número de mitocondrias [7]. La morfología descrita se puede observar en la Figura 2.

BAT difiere del WAT en la distribución capilar (vasos sanguíneos) del organismo, donde BAT tiene una mayor distribución (6 veces mayor) debido a la alta demanda de oxígeno que se genera. Esto para satisfacer los procesos de alta oxidación que ocurre en los adipocitos pardos y permitir la rápida eliminación y distribución del calor al resto del cuerpo [10].

Mediante disecciones anatómicas, se mostraron que WAT y BAT están organizados para formar una gran estructura en el organismo. Esto mediante depósitos de TA ubicados en compartimientos subcutáneos y viscerales (los cuales varían con el sexo y edad) [10].



Figura 2: Diferencias en la morfología de los distintos tipos de adipocitos que conforman el tejido adiposo. Adaptada desde “*Adipose Tissue: Physiology to Metabolic Dysfunction- Allison J. et Al.*” [3]

2.2. Expansión del tejido adiposo

Frente a aumento de nutrientes en el organismo, el tejido adiposo puede expandirse o aumentar su tamaño únicamente de dos maneras, mediante hiperplasia o mediante hipertrofia, las cuales están relacionadas directamente con los adipocitos del tejido.

Se debe tener un equilibrio o balance en el organismo entre la expansión por hiperplasia e hipertrofia, ya que una desregularización de estos puede tener efectos significativos en la salud metabólica del sujeto, tal como ocurre en la obesidad.

En estos casos, el consumo de nutrientes y calorías por parte del organismo es mayor que el gasto energético del mismo, lo que genera un exceso energético que debe ser almacenado expandiendo el tejido [7]. Así, estudiar y entender estos procesos de expansión son esenciales para poder dar respuestas a problemas relacionados al tejido adiposo tal como lo es la obesidad.

2.2.1. Hiperplasia: El proceso de Adipogénesis

La primera forma de expansión se caracteriza por el aumento del número de adipocitos del tejido mediante la formación de nuevos adipocitos a través de la diferenciación celular de los preadipocitos existentes o adipogénesis [7].

Este proceso ocurre en dos etapas, la primera determinada como *commitment step* o etapa de compromiso y la etapa de diferenciación. En la primera el fibroblasto se limita a la línea adiposa y se transforma en un preadipocito y en la etapa de diferenciación, los preadipocitos dejan de crecer, comienzan a acumular nutrientes en forma de triglicéridos y forman adipocitos maduros, con una morfología redonda y una gran gota lipídica.

En base a la información recopilada por Ghaben y Scherer [7] y, como se resume en la Figura 3, en un inicio de la diferenciación, en la etapa de compromiso, la célula precursora tipo-fibroblasto se restringe al linaje adiposo, pero no cambia su morfología, manteniéndose alargada. Esto ocurre luego de una detención de la proliferación inducida por el contacto entre células [6]. Así, se compromete a la línea de los preadipocitos.

Estudios *in vitro* de cultivos de fibroblastos, han determinado que se requiere de la proteína morfogenética ósea 2 y 4 (BMP2 y BMP4, *bone morphogenetic protein*) para iniciar la diferenciación y generar esta etapa de compromiso del fibroblasto. Estas se unen a receptores de BMP y estimulan la transcripción del factor SMAD4 que genera la estimulación de la transcripción de *Peroxisome proliferator activated receptor gamma* o PPAR-g, el cual es uno de los reguladores maestros de la adipogénesis al ser capaz de promover la diferenciación terminal del preadipocito a adipocito.

La liberación de PPAR-g tiene un efecto río debajo de gran importancia al activar la transcripción del factor *C/EBP α* (*CCAAT/enhancer-binding protein alpha*), que también se considera como una proteína de regulación de la adipogénesis [7]. Así, en la etapa temprana de diferenciación, el preadipocito comienza a expresar genes que son característicos de adipocitos, como lo son PPAR- γ , C/EBP α , C/EBP β , AP2 (*Adipocyte fatty-acid binding protein*) y GLUT4 (*Insuline-sensitive transporter*) e inicia la acumulación de lípidos en su interior [6, 7].

Finalmente, en la etapa de diferenciación, el preadipocito cambia su morfología a una redonda y se induce la transcripción de genes característicos de adipocitos maduros, tal como lo son la adiponectina, leptina, ATGL (*Lipases adipose triglyceride lipase*), LPL (*lipoprotein lipase*) y perilipina 1 [6, 7].

Se ha reportado una serie de biomoléculas secretadas por los adipocitos mientras está ocurriendo el proceso de diferenciación, las cuales son utilizadas como marcadores de expresión en la diferenciación. Así, al evaluarlas se puede determinar el nivel de maduración en el que se encuentra el adipocito.

Se han definido marcadores de diferenciación temprana del preadipocito y marcadores de adipocitos maduros. En el Anexo A se listan algunos de los marcadores más conocidos y su principal función en el proceso de adipogénesis.

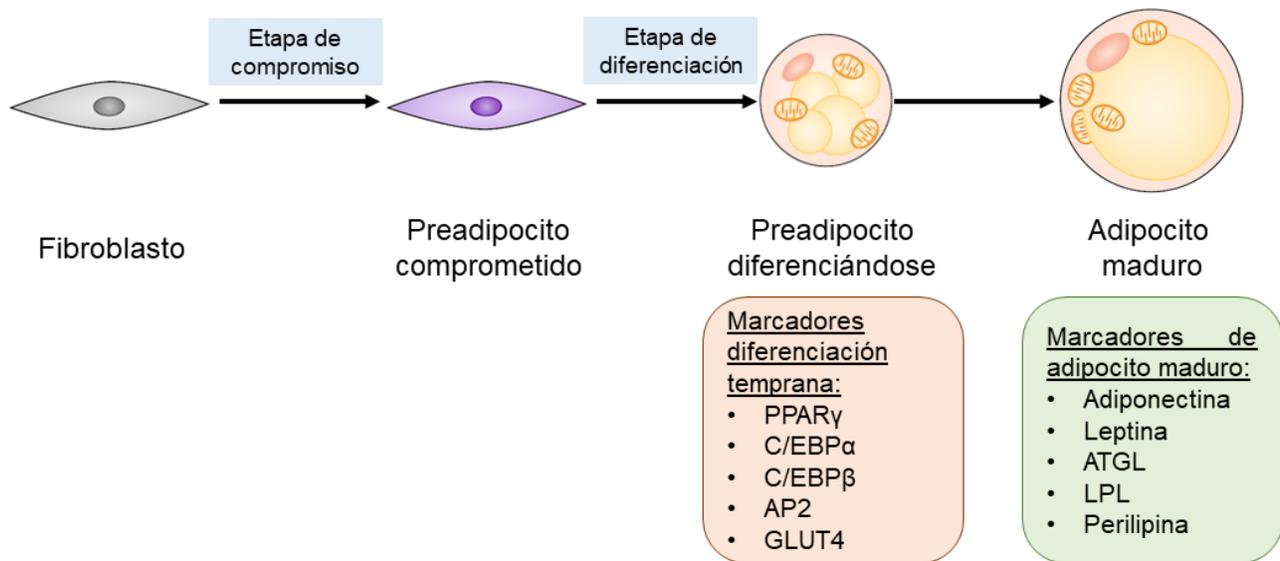


Figura 3: Vista general del proceso de adipogénesis. Adaptado desde “Adipogenesis and metabolic health- Ghaben, A. and Scherer, P.” [7]

2.2.2. Hipertrofia: Crecimiento e inflamación del tejido adiposo

A diferencia de la hiperplasia, la hipertrofia se caracteriza por el aumento del tamaño de los adipocitos ya existentes en el tejido por el almacenamiento de lípidos en la gota lipídica. Esto provoca una expansión del tejido mediante el aumento del tamaño celular [7].

Cuando la energía obtenida mediante la ingesta de nutrientes es mayor a la energía utilizada en el metabolismo basal, actividad física y termorregulación, se genera un excedente energético que debe ser almacenado en el tejido adiposo, en específico, en los adipocitos, lo que aumenta su tamaño [3]. Si este almacenamiento se mantiene en el tiempo, genera el aumento del tamaño del tejido adiposo que, a la larga, desencadena un estado de obesidad en el organismo [3, 7].

Se considera que este proceso de acumulación puede ser saludable en el caso que el aumento del almacenamiento sea provocado por la adipogénesis ya que contrarresta en parte la obesidad generada por el declive en la ingesta [11] y que además, se correlacionan con una disminución en la susceptibilidad de desarrollar diabetes [12]. Así, se considera que se genera una obesidad que es metabólicamente saludable y adaptativa, ya que el tejido mantiene niveles de vascularización adecuados para el correcto funcionamiento de este.

Por el contrario, se considera que la expansión del tejido adiposo mediante hipertrofia está asociado a procesos que generan estrés celular. Esto producto del incremento en el contacto entre membranas y matrices extracelulares gracias al aumento del tamaño celular del tejido. Esto genera hipoxia y contribuye a la iniciación de procesos de inflamación, fibrosis y muerte celular [7]. Este proceso de hipertrofia se ve representado en la Figura 4.

Así, cuando el estrés celular se mantiene de manera prolongada, tal como ocurre en la obesidad, el tejido adiposo entra en un estado de inflamación crónica, lipólisis y de remodelación y deterioro de la matriz extracelular (ECM). En conjunto, esto conduce a la secreción alterada de adipocinas que comprende una variedad de hormonas, citocinas, complementos y factores de crecimiento, proteínas ECM y factores vasoactivos, que promueven la inflamación. Esto gracias a que existen sistemas de comunicación celular, humoral y otros asociados a estructuras de transporte como las vesículas extracelulares, que permitirían a estas adipocinas proinflamatorias afectar a diversos tejidos cercanos y lejanos del organismo [13-18].

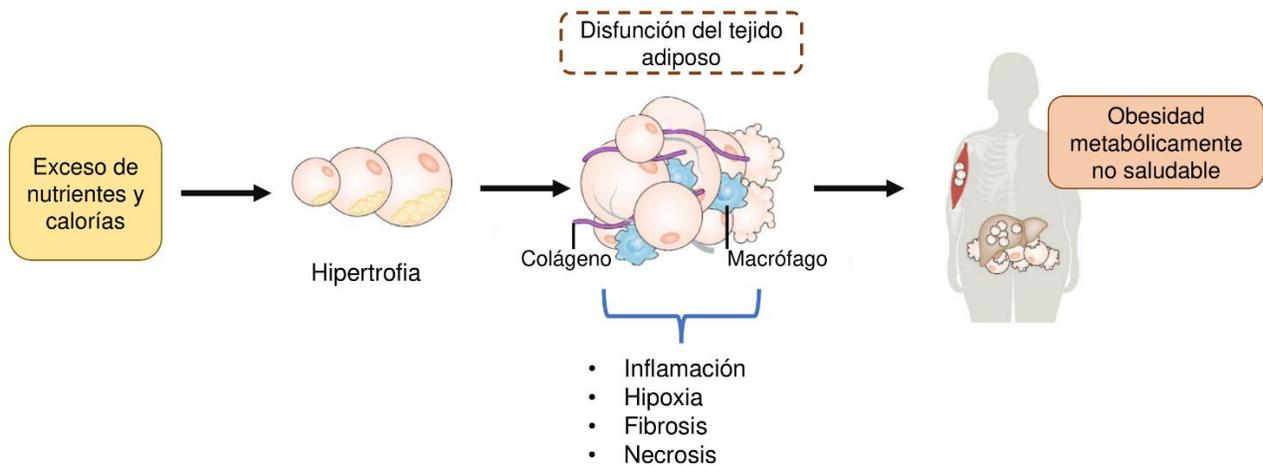


Figura 4: Proceso de hipertrofia en el tejido adiposo. Adaptado desde "Adipogenesis and metabolic health- Ghaben, A. and Scherer, P." [7]

2.1. El tejido adiposo y su rol endocrino en otros tejidos

En el pasado, se asociaba que el único rol del tejido adiposo era el de almacenamiento de energía en forma de lípidos. Pero, recientemente, se ha descubierto que también actúa como sistema endocrino, aportando en el control de la homeostasis de organismo al secretar numerosos factores con funciones autocrinas, paracrinas y endocrinas.

En específico, se ha observado que el tejido adiposo blanco, principalmente, libera distintas moléculas bioactivas denominadas como adipocinas, siendo un tipo de citocina que es de exclusiva secreción del WAT. Estas tienen efecto sobre distintos procesos fisiológicos como en la ingesta de alimentos, la regulación del equilibrio energético, la acción de la insulina, el metabolismo de la glucosa, en la remodelación de la vascularización, regulación de la presión arterial y la coagulación [8].

Además, se ha observado que muchas de estas biomoléculas tienen relación con el sistema inmune del organismo. Ya que se pueden observar citocinas no exclusivas del WAT como lo son TNF- α , interleucina 1 β o IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-13 y MCP-1, lo que puede implicar la existencia de una conexión o comunicación entre la inflamación y la obesidad, en donde existe un aumento en la secreción de adipocinas proinflamatorias [6].

Así, el tejido adiposo, mediante la liberación de adipocinas, es capaz de comunicarse con diversos tejidos del organismo, como lo es el tejido endotelial, renal, muscular, cardíaco, cerebral, entre otros [19-22]. Con esto, establecería relaciones de comunicación cruzada que pueden tener un impacto negativo en el funcionamiento normal de los tejidos blanco cuando existe un estado de inflamación crónica en el tejido adiposo, tal como ocurre en la obesidad. Así, la obesidad se puede ligar al desarrollo de distintos tipos de comorbilidades en el organismo.

En la Tabla 1, se representa un listado de las adipocinas de mayor relevancia que el WAT secreta y su principal función en el organismo [6].

Tabla 1: Adipocinas secretadas por WAT y su función fisiológica. Extraída de “Tejido adiposo: heterogeneidad celular y diversidad funcional- Esteve, M.” [6]

Función	Adipocina
Control de la ingesta, deposición de grasa e inflamación	Leptina
Proliferación de preadipocitos	Neuropéptido Y (NPY)
Sensibilidad a la insulina, inflamación	Adiponectina
	Resistina
	Visfatina
Sensibilidad a la insulina	Omentina
	Vaspina
Homeostasis vascular (vasodilatación)	Apelina
Inflamación	Adipsina
Metabolismo lipídico	Proteína transferidora de ésteres de colesterol (CETP)
	Lipoproteína lipasa (LPL)
	Lipasa sensible a las hormonas (HSL)
	Apolipoproteína E (ApoE)
	Proteína ligadora de retinol-4 (RBP-4)
Homeostasis vascular	Angiotensinógeno
	Angiotensina II
	Enzima convertidora de angiotensina (ACE)
	Inhibidor del activador del plasminógeno (PAI-1)
Inflamación	Interleucinas (IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12, IL-18)
Inflamación	Proteína C reactiva (CRP)
Inflamación, sensibilidad a la insulina	Factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α)
Incorporación de macrófagos al tejido	Proteína quimioatrayente de monocitos-1 (MCP-1)
Activación de macrófagos	Molécula de adhesión intercelular-1 (ICAM-1)
Angiogénesis	Factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF)
Migración y adhesión celular, crecimiento y diferenciación tisular	Factor de crecimiento transformante beta (TGF β)
Metabolismo lipídico, sensibilidad a la insulina	Factor de crecimiento insulínico de tipo I (IGF-I)
Crecimiento y diferenciación tisular	Factor de crecimiento nervioso (NGF)
Proliferación y diferenciación, angiogénesis	Factor de crecimiento de fibroblastos (FGF)
Homeostasis vascular, inflamación	Prostaglandina E2 e I2

2.2. Tejido adiposo, obesidad y comorbilidades asociadas

En la obesidad, aumenta en una gran medida el riesgo de morbilidad y de mortalidad de distintas patologías tales como enfermedades renales, hipertensión, enfermedades cardiovasculares, cerebrales, daño hepático, discapacidad, depresión, insulino resistencia, diabetes tipo 2 y ciertos tipos de cáncer [17, 18, 23, 24].

Se conocen ciertas vías metabólicas que se activan en la obesidad, y generan alteraciones del funcionamiento del organismo. Por ejemplo, cuando se está en un estado de obesidad, existe un aumento en la lipólisis, lo que causa que se liberen de manera excesiva ácidos grasos no esterificados producto de la reacción a la circulación, pudiendo afectar distintos tejidos. Su incremento intracelular, junto al aumento de diacilgliceroles (DAG), activan a la proteína quinasa C (PKC), la cual, está involucrada en la inhibición de las señales intracelulares de la insulina.

PKC también es capaz de activar a la enzima NADH oxidasa, que incrementa la producción de especies reactivas de oxígeno e inhibe la producción de óxido nítrico (NO). Estos cambios son dañinos para las células endoteliales, porque se estaría generando una sobrecarga en la función reguladora de la presión arterial ya que estos cambios disminuyen la vasodilatación e incrementa la hipertensión arterial del organismo [17, 25].

Este efecto no es menor, ya que la hipertensión arterial es una enfermedad de alto impacto e incidencia mundial (aprox. 40% población adulta mundial sobre 25 años) y que está relacionada a un mayor riesgo de padecer otro tipo de patologías como ataques cerebrovasculares, infarto de miocardio, insuficiencia cardiaca y enfermedad renal terminal [26]

En este contexto, se puede identificar que diversos metabolitos liberados por los adipocitos, como ácidos grasos, adipoquinas y también vesículas extracelulares, conforman parte del secretoma que podría afectar otros tejidos como endotelio, riñón, entre otros, lo que promueve un estado pro-patológico crónico.

2.2.1. Obesidad y su relación con enfermedades renales

Entre patologías asociadas a la obesidad y al tejido renal, se encuentra la enfermedad crónica renal, en inglés, *chronic kidney disease* (CKD), hipertensión arterial, nefrolitiasis y neoplasias renales. Estas pueden generar efectos perjudiciales en la salud del organismo y mayores tasas de comorbilidad [27].

Se ha observado, mediante estudios poblacionales, que existe una asociación entre la obesidad y el desarrollo y progresión de CKD, así, un alto IMC es un factor de riesgo a considerar para el diagnóstico de esta enfermedad [27].

En individuos obesos, podría generarse un mecanismo de hiperfiltración compensatorio en el riñón para satisfacer la alta demanda metabólica generada por el aumento de la masa corporal en la obesidad. Así, el aumento de la presión intraglomerular podría generar lesiones renales en la estructura de órgano e incrementar el riesgo de desarrollar CKD a largo plazo [27].

También, en pacientes obesos, se ha asociado la liberación de adipocinas como adiponectina, leptina, resistina y visfatina, como posibles causantes en la generación de anomalías metabólicas y fallos en el funcionamiento del riñón gracias al desarrollo de inflamación, estrés oxidativo, metabolismo lipídico anormal, activación del sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA), incremento en la producción de insulina, una mayor resistencia a esta última y el aumento del cortisol [27-35].

En particular, la activación SRAA y el aumento en el cortisol tienen gran importancia en el desarrollo de la hipertensión arterial en el organismo. Esta enfermedad está asociada a cambios en el funcionamiento del túbulo colector de la nefrona, la unidad funcional del riñón. En la Figura 5, se representa la nefrona y su estructura correspondiente, donde se destaca la ubicación de los distintos túbulos que la componen.

Esta estructura ha sido objeto de estudio ya que es susceptible a moléculas vasoactivas como la aldosterona, hormona mineralocorticoide que genera una acción no genómica, activando a los receptores de mineralocorticoides (MR) de las células del túbulo colector, que pueden incrementar el transporte de sodio, aumentar la captación de agua, el volumen sanguíneo y, finalmente, elevar la presión arterial [26]. Así, tiene una gran relación con el desarrollo y progresión de hipertensión arterial.

Sin embargo, el mecanismo exacto en el que la obesidad puede empeorar o generar hipertensión, CKD y otras enfermedades renales, no es completamente claro, lo que abre las puertas al desarrollo de investigaciones enfocadas en determinar los procesos fisiológicos o fisiopatológicos que puedan estar generando este fenómeno.

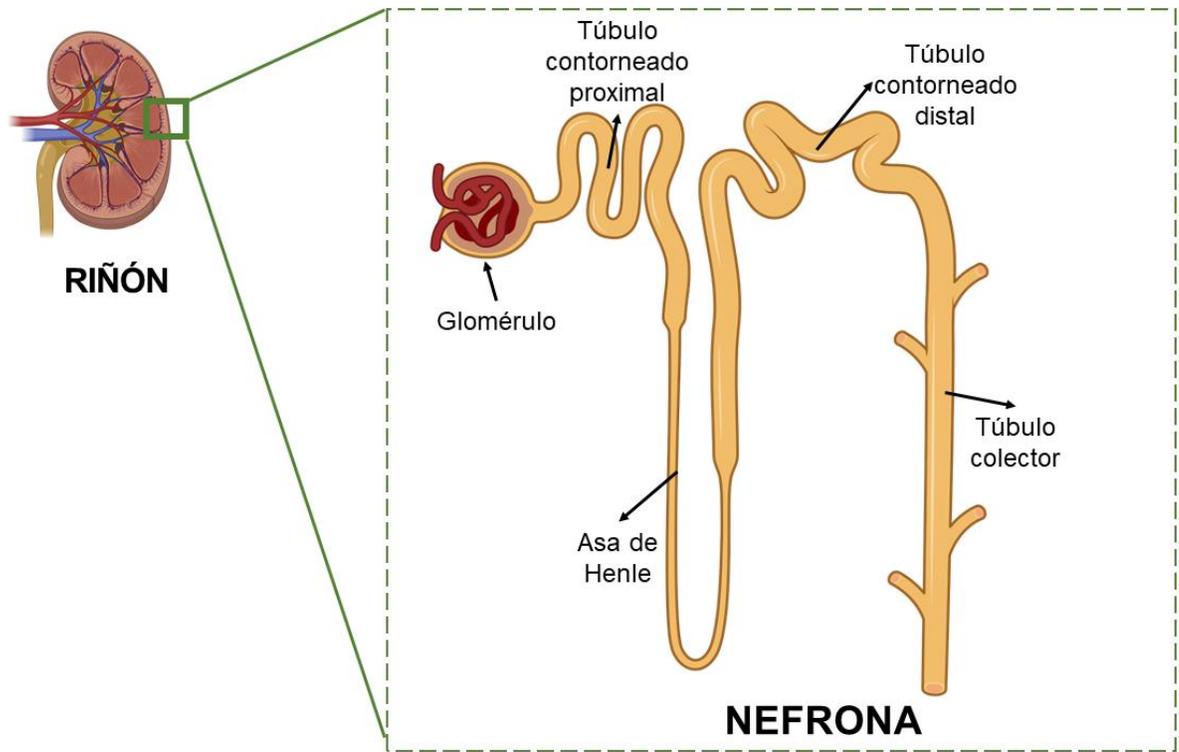


Figura 5: Distribución de los túbulos que componen la nefrona, la unidad funcional del riñón. [26].

2.3. Obesidad: diagnóstico y tratamiento

Ya que la obesidad es una enfermedad de alta incidencia y ha sido relacionada al aumento en el desarrollo de otras patologías, se hace necesario desarrollar estrategias de diagnóstico y tratamiento que permitan disminuir su avance en la población.

2.3.1. Diagnóstico de la obesidad

Actualmente, para poder identificar si una persona presenta un peso corporal saludable o no el parámetro más utilizado es el Índice de Masa Corporal o IMC. Este es un indicador simple y fácil de determinar, que relaciona el peso corporal de una persona con su altura. Se calcula como la división del peso de la persona, en kilogramos, por el cuadrado de su altura, en metros, así, su unidad es $[\text{kg}/\text{m}^2]$.

En adultos mayores a 20 años, se definen cuatro grandes categorías para especificar el estado de salud de un individuo, la primera es de bajo peso, con un IMC de bajo 18,5. La segunda como normopeso, con un IMC entre 18,5 y 24,9. Como tercera categoría se define una persona con sobrepeso, con un IMC entre 25 y 29,9. Y, finalmente, se considera a una persona como obesa cuando su IMC es mayor o igual a 30. No se hace distinción con el sexo del individuo [36].

Sin embargo, aún existen limitaciones cuando se está evaluando el estado nutricional de una persona utilizando únicamente el IMC como indicador, ya que este es un índice que no incluye en sus parámetros el porcentaje de grasa o de músculo que el individuo tenga y, se asume que todos poseen un porcentaje similar. Tampoco se consideran parámetros de importancia como el sexo, edad o etnia de la persona evaluada.

Así, personas con una gran cantidad de musculatura en lugar de una mayor grasa corporal, como son los deportistas, son mal clasificados ya que presentan valores de IMC que pueden considerarlos como personas con sobrepeso u obesidad, aun cuando su nivel de grasa corporal no represente un problema médico. En estos casos particulares, se deben realizar evaluaciones medicas personalizadas para determinar la salud del individuo, como la medición de pliegues o la impedanciometría [37]. Así, el IMC puede no ser el método más eficaz para caracterizar el estado nutricional de la población mundial, pero si es un índice que es capaz de brindar una idea preliminar de esta.

Otro parámetro que es utilizado y complementa en parte al IMC, es el Índice cintura-cadera. Este tiene en cuenta las medidas antropométricas del sujeto según la localización o distribución de la grasa corporal, así podría medir de manera indirecta el exceso de grasa corporal [38].

Técnicas como la impedanciometría pueden ser utilizadas para poder determinar la composición corporal de una persona, ya que permite conocer información sobre la cantidad de músculo, grasa, hueso y agua en el cuerpo adulto [39].

2.3.2. Tratamientos de la obesidad

La OMS, propone como método de tratamiento de la obesidad el cambio en el estilo de vida de la personas, pasando a uno que no sea sedentario. Se recomiendan cambios en la alimentación, disminuyendo la ingesta calórica diaria y optar por alimentos bajos en grasas. Además, sugiere realizar cualquier tipo de actividad física de manera periódica (60 minutos diarios para los jóvenes y 150 minutos semanales para los adultos) [2].

Sin embargo, esta estrategia podría no ser suficiente para lograr erradicar la alta prevalencia de la obesidad en la población, por ello, se han desarrollado otro tipo de métodos que tienen como objetivo generar la pérdida de peso de la persona. Entre estas, está la realización de procedimientos quirúrgicos, tal como lo son las cirugías de manga gástrica, *bypass* gástrico, balón gástrico, entre otras. Sin embargo, este tipo de procedimientos puede ser invasivo y doloroso, además de que conlleva cambios en el estilo de vida de la persona que pudieran afectarlo de manera psicológica [40, 41].

Otra de las estrategias utilizadas es la farmacoterapia. En esta, se busca aumentar la adherencia del paciente a los cambios del estilo de vida y adaptaciones biológicas a la que se ve enfrentado durante un proceso de pérdida de peso, disminuyendo el apetito, vaciamiento gástrico, nutrientes o aumento de la saciedad [42].

Entre estos tratamientos farmacológicos se destaca la utilización de semaglutida y la liraglutida. Estos compuestos nacieron como un tratamiento para la diabetes mellitus tipo 2 (DM2) y son agonistas al péptido similar al glucagón-1 o GLP-1, la cual es una hormona que regula la secreción de insulina que es dependiente a la glucosa y reduce la concentración de glucagón en el plasma [43-45]. Estudios han revelado que estos tratamientos generan una pérdida de peso considerable, por ejemplo, una dosis semanal de 2,4 [mg] inyectada de semaglutida en

individuos obesos y sin diabetes, generó una pérdida de peso promedio entre 14,9% y 17,4% [44]. Sin embargo, existen algunos efectos secundarios negativos que deben ser considerados a la hora de utilizar estos tipos de tratamientos. Por ejemplo, las reacciones adversas más observadas al utilizar estos agonistas de GLP-1, son síntomas gastrointestinales, como náuseas, vómitos, diarrea, etc. y aumento en la frecuencia cardíaca de los pacientes con DM2 [46, 47].

La biotecnología también ha intentado ser parte de la solución al problema de la obesidad, en específico, busca tratar el problema mediante el control de la calidad nutricional de la alimentación de la población y, el desarrollo de fármacos enfocados en promover la pérdida de peso.

La ingeniería genética ha sido un factor clave en la industria del desarrollo de alimentos. Ya que busca aumentar la calidad nutricional de las especies vegetales, investigando y manipulando las vías metabólicas de macro y micronutrientes, además de estudiar su biodisponibilidad, es decir, la cantidad de nutrientes absorbidos y utilizados por el organismo [48].

Sin embargo, este puede ser un tratamiento no tan efectivo como se espera ya que existe un pensamiento negativo de la sociedad frente a los alimentos de origen transgénico lo que disminuye su consumo.

Entre los fármacos desarrollados, se encuentran drogas que inducen la pérdida de peso mediante la supresión del apetito o la alteración de la absorción de los nutrientes, sin embargo, su prescripción es principalmente para diabetes mal controladas y pueden aumentar el riesgo de padecer otras patologías (Ej. Cáncer de tiroides, pancreatitis, entre otras) [49].

2.3.3. Búsqueda de nuevas herramientas de diagnóstico y tratamiento

Existe una problemática con respecto a los métodos de diagnóstico y tratamiento mencionados y es que estos están enfocados, en general, a tratar la obesidad no de una manera preventiva. Lo cual dificulta en su tratamiento y las comorbilidades asociadas a esta.

Por esto, la investigación debe enfocarse en la búsqueda de nuevas estrategias y herramientas de un diagnóstico temprano. Así se podría enfrentar la enfermedad antes de que se genere un riesgo en la salud de la persona y podría disminuir los niveles de incidencia de la obesidad a nivel mundial a largo plazo. Para ello, se ha enfatizado en estudiar los mecanismos de acumulación de energía y de comunicación metabólica y endocrina del tejido adiposo. En particular asociado a

la acumulación de grasas y calorías, como también múltiples procesos proinflamatorios observados en la obesidad.

Además de la comunicación mediante adipocinas previamente descrita, se ha observado que el tejido adiposo también tiene un mecanismo de comunicación celular que está asociado a la liberación de vesículas extracelulares al torrente sanguíneo. Enfocar los estudios a este tipo de comunicación podría ampliar el conocimiento actual que se tiene del desarrollo del proceso inflamatorio crónico característico de la obesidad y su efecto sobre otros tejidos. Por ello, en los últimos años, distintos grupos de investigación han enfocado sus trabajos en determinar el rol y efectos desconocidos a la fecha de las vesículas extracelulares en el organismo.

2.4. Vesículas Extracelulares (EVs)

Las vesículas extracelulares son estructuras delimitadas por una bicapa lipídica y que son liberadas al espacio extracelular de forma nativa por las células [50] y están presentes en distintos fluidos biológicos del cuerpo humano, tales como la sangre, saliva, fluido cerebroespinal y la orina [51]. Su origen o biogénesis está asociada a la membrana plasmática de la célula o desde compartimientos endosomales. Tienen la capacidad de incorporar biomoléculas desde la célula de la cual originan, tal como son ácidos nucleicos, proteínas y lípidos [51].

Inicialmente, la secreción de EVs fue relacionada únicamente con la capacidad de eliminar desechos innecesarios de la célula. En la actualidad, se conoce que estas vesículas, en particular las EVs pequeñas, juegan un rol importante en la comunicación celular, ya que son capaces de intercambiar componentes entre células. Esto implica que los EVs actuarían como vehículos de señalización en los procesos normales de homeostasis o en los procesos patológicos a los que se enfrenta el microorganismo [52-54].

El cargo de una EV puede variar dependiendo de su tipo celular de origen y, en general, son influenciados por el estado fisiológico y patológico, los estímulos que modulan la producción de la EV y el tipo de biosíntesis [51]. En general, su cargo está conformado por metabolitos, aminoácidos, ácidos nucleicos (como DNA, RNA, ARNm y miRNA), lípidos y proteínas, tanto en el interior como en la membrana de esta [55]. La representación de la estructura de una vesícula extracelular se encuentra en la Figura 6.

Entre sus proteínas de membrana, se destacan CD9, CD63 y CD81, que se relacionan con el tráfico de vesículas endosomales y son utilizadas como marcadores de identificación de EVs [50]. Otras proteínas de interés y también utilizadas como marcadoras de EVs son TSG101 y Alix, las cuales son proteínas relacionadas al complejo ESCRT, el cual es responsable del transporte de proteínas ubiquitinadas para la degradación lisosomal y el reciclaje de proteínas [50].

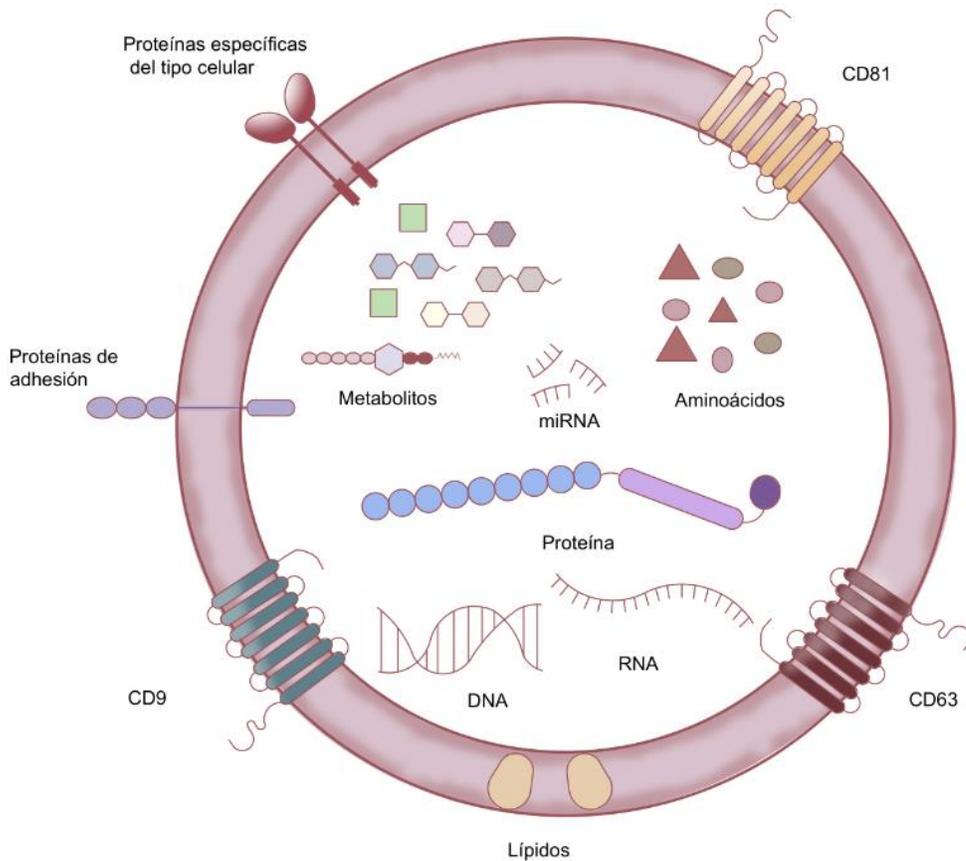


Figura 6: Estructura y contenido de las vesículas extracelulares. Adaptada desde “*Metabolomics of Extracellular Vesicles: A Future Promise of Multiple Clinical Applications- Wu, Y. et al.*” [55]

2.4.1. Biogénesis y tamaño de las vesículas extracelulares

Si bien, cualquier vesícula de membrana secretada por una célula se considera como EV, existe una amplia variedad en sus composiciones y características. Esa heterogeneidad permite que puedan efectuar distintas funciones [51]. Por esto, se ha buscado determinar distintas características y/o propiedades que permitan clasificar estas estructuras, tal como sería su biogénesis y/o el tamaño de estas. Así, se han clasificado tres tipos de EVs como exosomas, microvesículas y cuerpos apoptóticos. Estos se encuentran representados en la Figura 7, donde en A se representan exosomas, en B microvesículas y en C, cuerpos apoptóticos.

Los exosomas o vesículas extracelulares pequeñas se caracterizan por tener un tamaño de diámetro entre los 50-150 [nm] y una biogénesis de tipo endosomal [56]. Con respecto a su biogénesis, esas se forman mediante una gemación interna de la membrana de endosomas tempranos denominándose vesículas intraluminales (ILVs), que luego maduran a cuerpos multivesiculares o MVB, los que tienen funciones de transporte y de endocitosis. Así pueden ser enviados al lisosoma para ser degradados y eliminados o, pueden ser enviados a la membrana plasmática para fusionarse con ella y así liberar su contenido junto a los exosomas al espacio extracelular [51, 57, 58].

Las microvesículas o EVs grandes tienen un tamaño de diámetro de 150 [nm] a 1.000 [nm] y son derivadas de la membrana plasmática de la célula. Se forman mediante la gemación y la fisión hacia el exterior de la membrana plasmática, que luego es liberada en el espacio extracelular [51, 57].

Los cuerpos apoptóticos son vesículas que son secretadas al espacio extracelular cuando una célula entra en apoptosis y tienen un diámetro de entre 50-5000 [nm]. Cuando la célula entra en muerte celular, contrae su estructura, lo que genera un aumento de la presión hidrostática que separa la membrana plasmática del citoesqueleto de la célula, formando este tipo de vesícula [57].

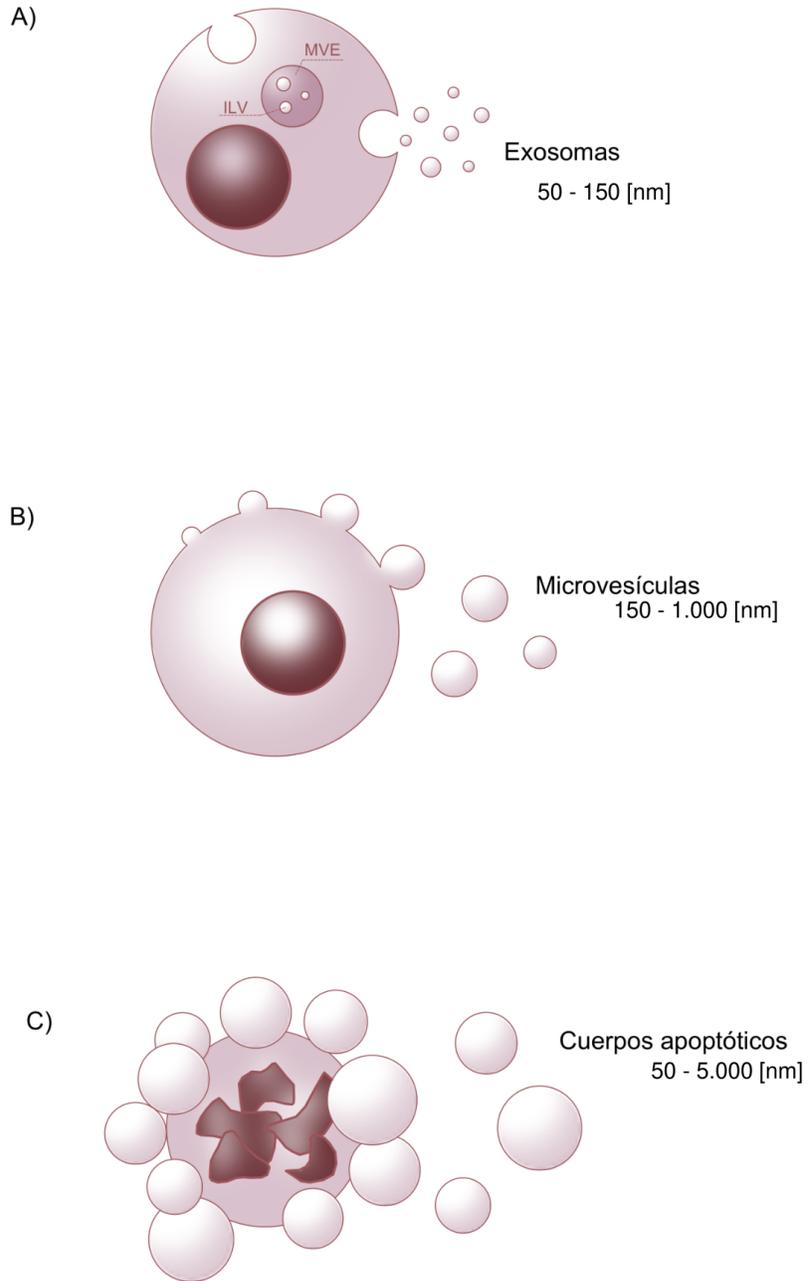


Figura 7: Formación y liberación de exomas, microvesículas y cuerpos apoptóticos, los tres tipos de vesículas extracelulares. Adaptado desde *“Role of microvesicles as biomarkers and future pharmacology targets of cardiovascular diseases-Carracedo, J. et Al.”* [59]

2.4.1. Métodos de aislación de exosomas

A lo largo de los años, se han diseñado distintas metodologías con el objetivo de aislar de manera efectiva los exosomas desde fluidos corporales debido a su potencial de investigación y de aplicación clínica.

Inicialmente, los métodos estándar de aislación estaban basados en la separación por ultracentrifugación [60]. Si bien, estos métodos siguen siendo utilizados, se han desarrollado métodos alternativos para la obtención de EVs pequeños, los cuales se basan en la separación por tamaño, captura por inmunoafinidad y precipitación.

Estos nuevos métodos presentan distintos niveles de recuperación, purificación, eficiencia, velocidad y volumen de trabajo. Parámetros claves para determinar la capacidad de aislación de exosomas. Así, podría ocurrir que ciertos métodos no logren aislar de manera exclusiva exosomas, obteniendo mezclas de vesículas extracelulares y componentes del espacio extracelular que podrían no tener interés en el estudio realizado [54, 61].

Así, se tiene como desafío diseñar y desarrollar técnicas y/o protocolos de trabajo que permitan optimizar los parámetros de separación y aislación del método a utilizar, buscando obtener una muestra lo más purificada posible, con bajos costos de operación en el menor tiempo posible.

Con respecto a las técnicas basadas en la ultracentrifugación, usadas como estándares de aislamiento y de mayor importancia para esta investigación, se encuentran la Ultracentrifugación diferencial y la Centrifugación de gradiente de densidad.

La ultracentrifugación diferencial se caracteriza en que la separación de los EVs depende de la densidad, tamaño y forma de las partículas, donde las más grandes y densas precipitan primero al ser enfrentadas a una rotación de elevada velocidad angular (sobre los 100.000 g), lo que origina una fuerza centrífuga altamente superior a la gravitatoria [57]. Así, las partículas precipitan y quedan concentradas en la parte inferior del contenedor.

Ultracentrifugación diferencial

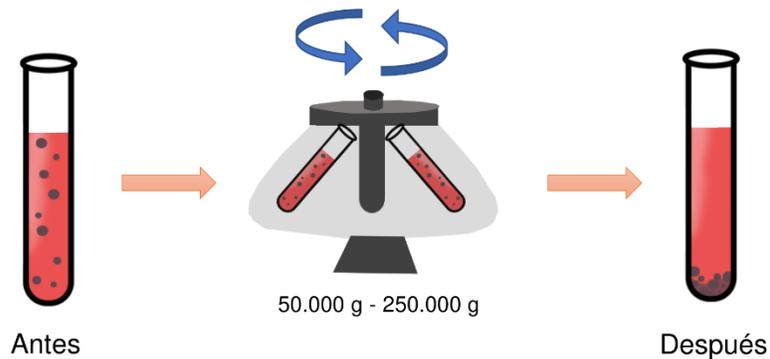


Figura 8: Representación del proceso de ultracentrifugación diferencial.

Cuando se quiere aislar exosomas, en este método de ultracentrifugación se agrega una etapa de filtración de 0,22 μm que permite el paso de estas vesículas extracelulares que tienen un tamaño entre los 50 y 150 nm .

Al igual que la ultracentrifugación, la centrifugación de gradiente separa las partículas en base a sus propiedades físicas. Sin embargo, este tipo de separación ocurre con la presencia de un gradiente de densidad preconstruido, generalmente realizado con iodoxinol o sacarosa en el tubo de trabajo. Así, la muestra se coloca en la parte superior del gradiente (donde es más denso) y cuando la fuerza de centrifugación es aplicada, las partículas pasan a través de este y son separadas en fracciones, tal como se representa en la Figura 9 [57].

Centrifugación de gradiente de densidad

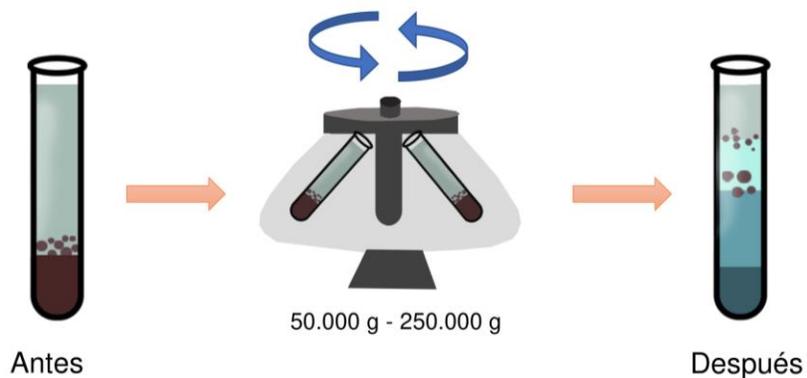


Figura 9: Representación del proceso de centrifugación de gradiente de densidad.

Existen otras técnicas que se basan únicamente en el tamaño de partícula y en base a eso, separan los componentes de la muestra de trabajo para aislar EVs. Entre estas se encuentra la ultrafiltración, los kits de aislamiento de exosomas comerciales, la filtración secuencial, la cromatografía de exclusión de tamaño, entre otras [57].

Las técnicas de separación que se basan en la inmunoafinidad utilizan anticuerpos que capturan exosomas en función de la expresión de un antígeno conocido en la superficie de la vesícula. Para esto, anticuerpos pueden ser fijados a placas, perlas magnéticas o resinas. La principal ventaja de esta técnica es que permite el aislamiento de exosomas que sean derivados de una fuente celular específica utilizando anticuerpos correspondientes a ese tipo celular [57].

2.4.2. *Nanoparticle tracking analysis* (NTA) como método de estudio de exosomas

En un inicio, los EVs eran caracterizados únicamente por su concentración proteica, sin embargo, este valor podía ser sobreestimado debido a la presencia de agentes contaminantes en la muestra aislada de EVs y no se consideraba la variabilidad en el contenido proteico que podía contener cada tipo de EV [61]. Así se necesitó desarrollar nuevas tecnologías que permitieran caracterizar las muestras de EVs aislados.

En la actualidad, existen dos categorías de análisis que pueden ser realizados a las muestras de vesículas aisladas para poder caracterizarlas. Se tiene el análisis físico y el químico/bioquímico. En la primera categoría se destacan el *Nanoparticle tracking analysis* o análisis de rastreo de nanopartículas, la dispersión de luz dinámica (DLS) y la microscopía electrónica de transmisión. Los análisis realizados que caen en la segunda categoría, por lo general, son realizados mediante tinciones, inmunotransferencia y análisis de proteínas que entregan información sobre el contenido de las vesículas aisladas [57].

La tecnología de NTA es una de las más utilizadas para caracterizar el tamaño y concentración de las nanopartículas estudiadas, en este caso, de los EVs. Esta utiliza la dispersión de la luz para medir, en tiempo real, el tamaño y la concentración de partículas de la muestra [62].

El NTA puede determinar el tamaño de partícula utilizando la ecuación de Stokes-Einstein, donde el coeficiente de difusión se basa en el movimiento browniano de las partículas dentro de la cámara de visión. Dentro de esta, incide un rayo de luz láser que interactúa con las partículas que fluyen por un capilar, dispersándolo. Esta variación del haz de luz es detectada por una cámara dentro del equipo y es registrada en vídeo [62]. En la Figura 10 se representa de manera gráfica el fundamento del funcionamiento del NTA.

El software NTA es capaz de analizar los vídeos capturados cuadro por cuadro, visualizando el movimiento browniano de cada partícula, estima el valor del coeficiente de difusión de la partícula y con ello, determinar el tamaño y concentración de la muestra analizada [57, 62, 63].

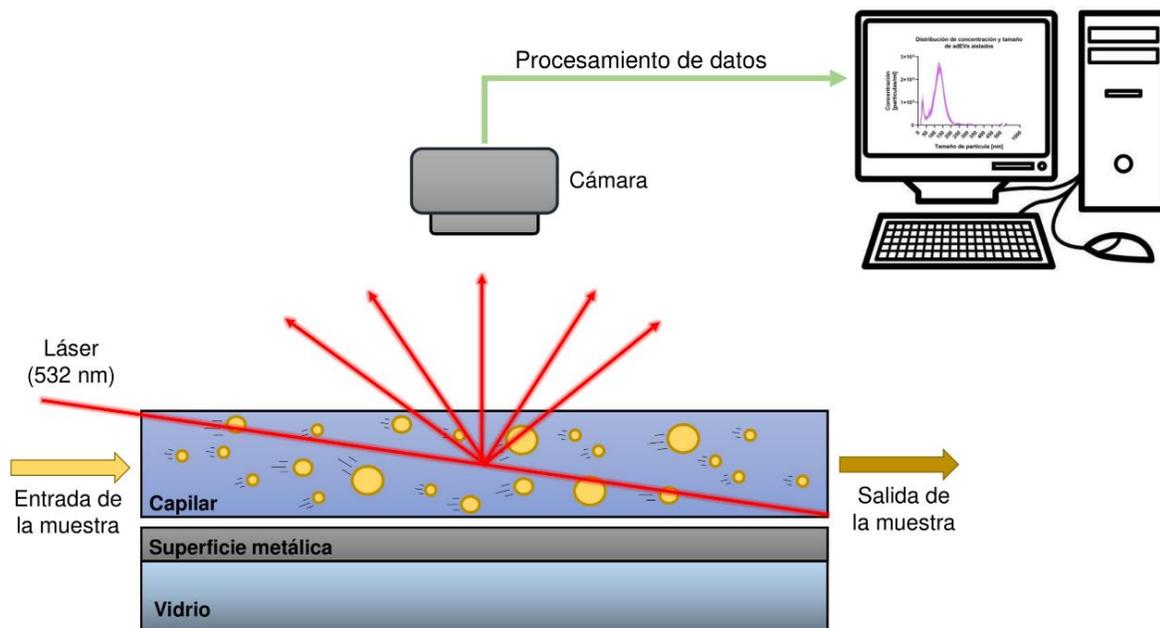


Figura 10: Fundamento del Análisis de Seguimiento de Nanopartículas. Adaptado desde “NTA: Principles and methodology- Malvern Panalytical [63]”.

2.5. Tejido adiposo y las vesículas extracelulares derivadas de adipocitos (adEVs)

El tejido adiposo además de cumplir un importante rol endocrino mediante la liberación de adipocinas y citoquinas, también libera vesículas extracelulares que participan en la regulación del organismo. En específico, los adipocitos del WAT liberan vesículas extracelulares denominadas adEVs que participan en la comunicación autocrina, paracrina y endocrina del organismo [64].

2.5.1. adEVs y su potencial rol como agente de comunicación fisiopatológica

El rol emergente de los adEVs como agente de comunicación, y su conexión a comorbilidades asociadas a obesidad, ha sido reconocido gracias a la capacidad de los EVs transportar diversos cargos derivados de su célula parental [35].

Estudios han mostrado que, bajo condiciones de obesidad, los exosomas derivados de adipocitos juegan un rol crucial en la mediación de la patogénesis de diversas enfermedades [35]. Además, la obesidad está asociada a un incremento en la liberación de adEVs, lo que puede estar relacionado a complicaciones metabólicas en el organismo [65].

Así, se está haciendo énfasis en determinar si, en la obesidad, se está generando cambios en el cargo de las adEVs liberadas. Esto con el objetivo de determinar si existe algún factor genético o proteico de la célula parental que podría ser transportado a través del organismo gracias a las adEVs, generando un efectos patológicos sobre algún tejido u órgano.

Hasta la fecha, aún no se conoce de manera certera, si la obesidad en humanos genera algún cambio en la biogénesis de los adEVs o en el empaquetamiento de su cargo. Es así, como en este último tiempo, se han publicado diversos estudios relacionados a los adipocitos y la liberación de adEVs en un estado de obesidad [25].

3. MOTIVACIÓN E HIPÓTESIS DE ESTUDIO

3.1. Motivación del estudio

La obesidad es una enfermedad de alto interés por su incidencia en la población humana y a su relación a otras patologías metabólicas. Así, se hace necesario desarrollar estrategias que permitan abordar y erradicar esta enfermedad, con el objetivo de mejorar la calidad y expectativas de vida de la población.

Ya que las acciones de prevención, diagnóstico y tratamiento (P.D.T) propuestas por las organizaciones de la salud no son suficientes para disminuir incidencia de la enfermedad, es necesario estudiar la obesidad a mayor detalle, buscando determinar los procesos metabólicos claves asociados al inicio y progresión de la obesidad, como los asociados al secretoma del tejido adiposo y mecanismos de comunicación paracrina y endocrina, afectándose tejidos como el hígado, corazón, endotelio, riñón, entre otros.

Uno de estos mecanismos es la comunicación mediada por vesículas extracelulares, estructuras de interés por su capacidad de representación de la célula de origen. La enfermedad renal, incluyendo la hipertensión arterial, estarían asociadas a la obesidad. Si bien se asume que el daño es generado por una sobrecarga en el funcionamiento del riñón por el aumento de masa corporal, o por las distintas sustancias secretadas por el tejido adiposo, incluyendo las adEVs y su impacto en enfermedad renal y control de la presión arterial.

3.2. Modelo e hipótesis de estudio

Dado que las EVs, gracias a su cargo, representarían el estado fisiológico de la célula de origen, serían capaces de transmitir factores inflamatorios y/o de fibrosis si provienen de tejido adiposo hipertrófico e inflamado, tal como ocurre en la obesidad.

Esto podría inducir respuestas inflamatorias y/o fibróticas en otros órganos reguladores de la homeostasis, tal como lo es el riñón, afectando su control homeostático y alterando la presión arterial del individuo.

Así, se propone como hipótesis de estudio que las vesículas extracelulares derivadas de adipocito son capaces de inducir una respuesta inflamatoria y fibrótica en células renales humanas en un modelo *in vitro*.

Para responder esta pregunta de investigación se buscó realizar un modelo de estudio *in vitro*, con el objetivo de evaluar la respuesta celular renal al tratamiento con vesículas extracelulares derivadas de adipocitos en un estado basal, es decir, sin inducir algún factor inflamatorio. Esto mediante la producción de adEVs y luego la evaluación de la expresión génica de marcadores de inflamación y fibrosis renal. Además, evaluará la internalización de las adEVs en las células renales por fluorescencia.

4. OBJETIVOS

Para lograr desarrollar la investigación planteada y evaluar la hipótesis planteada, se plantearon los siguientes objetivos

4.1. Objetivo general:

Evaluar el rol comunicador de vesículas extracelulares provenientes de adipocitos (adEVs) en la generación de una respuesta inflamatoria y/o fibrótica en otro tipo celular, utilizando un modelo de interacción *in vitro* de células de origen adiposo y renal.

4.2. Objetivos específicos:

1. Caracterizar un modelo *in vitro* de diferenciación celular de preadipocitos a adipocitos humanos.
2. Evaluar si la adición de vesículas extracelulares provenientes de adipocitos (adEVs) promueve una respuesta inflamatoria y/o fibrótica en células renales humanas.
3. Evaluar la interacción mediante la internalización de adEVs en células renales humanas.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

Con el objetivo de completar los objetivos específicos planteados en el proyecto de trabajo y así, completar el objetivo general establecido, se desarrolló la metodología representada en el diagrama de la Figura 11.

En esta, se separan las actividades generales que fueron realizadas para cumplir cada uno de los objetivos específicos propuestos para el trabajo.

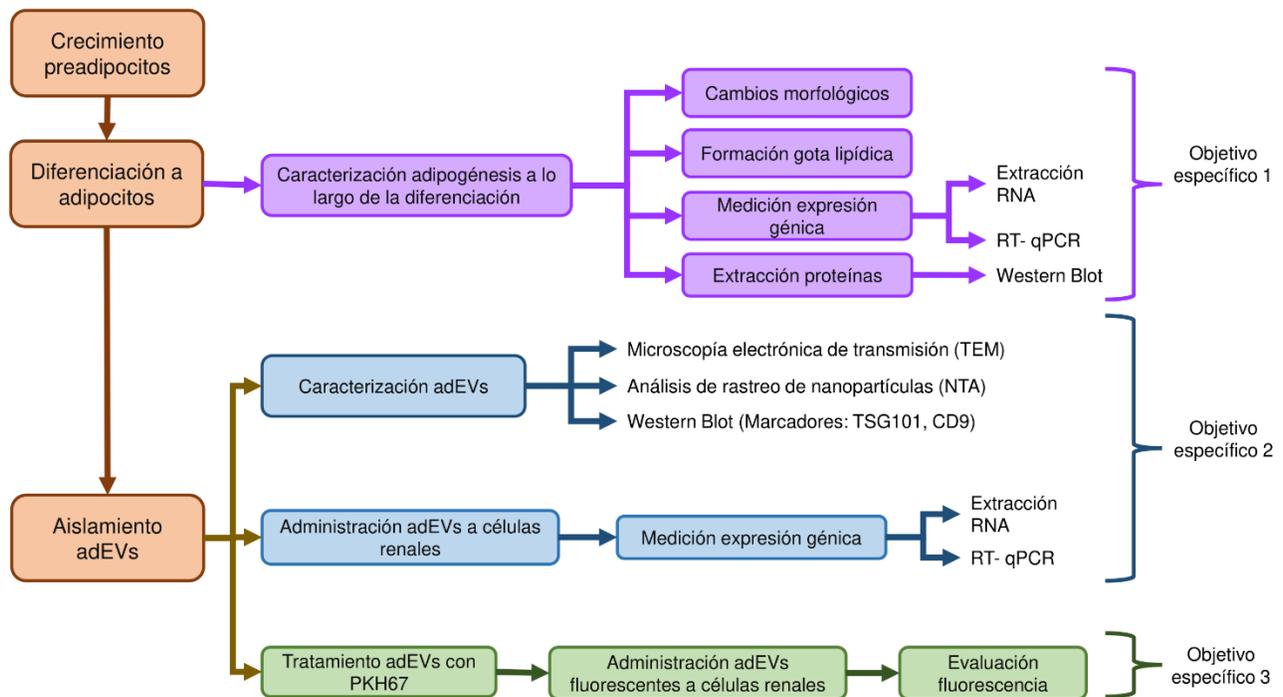


Figura 11: Diagrama de flujo resumen de la metodología realizada en el proyecto.

5.1. Caracterización de la adipogénesis en la línea celular SW872

Estudios previos, han demostrado que es posible utilizar células adiposas en modelos de experimentación y diferenciación, en específico, la línea LS14, derivada de un liposarcoma humano [66]. Con el objetivo de caracterizar el proceso de adipogénesis *in vitro* de la línea SW872, también derivada de un liposarcoma humano, se diseñó un experimento que buscó evaluar cambios morfológicos, la formación de la gota lipídica y determinar la expresión génica y proteica de distintos marcadores moleculares asociados al proceso adipogénesis a lo largo del tiempo de diferenciación de los preadipocitos a adipocitos.

Para ello, se realizó el cultivo *in vitro* de células de preadipocitos SW872, derivados de liposarcoma humano, adquiridos desde ATCC. Para esta línea celular, se utilizó el medio de cultivo “*Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12*” (DMEM/F12), alto en glucosa (HG), con un 10% de suero fetal bovino (FBS).

Para realizar el experimento, se utilizó cuatro placas de 6 pocillos, donde se sembró 200.000 células SW872 en cada uno de estos pocillos. Para mantener el cultivo, se usó un volumen total de 2 [mL] de medio de cultivo por pocillos. Cuando se alcanzó una confluencia celular cercana al 90-100% en cada uno, se inició el protocolo de diferenciación de preadipocitos, con una duración total de 10 días.

Para promover la diferenciación de los preadipocitos, se utilizó el coctel o medio de diferenciación, compuesto por DMEM/F12, HG, con un 1% de FBS y como factores de diferenciación se utilizó insulina a 10 [$\mu\text{g/ml}$], dexametasona a 1 [μM], 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX) a 0,5 [mM] y rosiglitazona a 1 [μM].

Cada uno de los factores agregados al medio de cultivo buscan inducir la diferenciación de los preadipocitos. En general lo hacen utilizando tiazolidinedionas (TZDs), induciendo la activación de PPAR-g y/o utilizando agonistas de esta [67]. Se utiliza insulina ya que activa la transcripción río abajo de PPAR-g a través de la activación de los receptores IGF1 (“*Insuline-like growth factor 1*”) [68]. En la línea murina 3T3-L1, se regula y promueve a PPAR-g utilizando una combinación de IBMX y Dexametasona, promoviendo la adipogénesis [69]. La dexametasona es una molécula glucocorticoideantiinflamatoria que estimula la diferenciación osteogénica y adipogénica de una manera dependiente de las células, el tiempo y la concentración [70, 71]. IBMX es un inhibidor competitivo no selectivo de la fosfodiesterasa que aumenta el AMPc intracelular y la proteína quinasa A cuya vía de señalización necesaria para la activación transcripcional de PPAR-g [72]. Además, tanto la dexametasona como el IBMX son inductores de C/EBPd y C/EBPb, que son factores de transcripción para el crecimiento y la diferenciación [73]. Rosiglitazona es un tipo de TZD agonista de PPAR-g, por lo que es capaz de activar su vía [69].

En el primer día de diferenciación, se lavó cada placa con Phosphate-buffered saline (PBS) dos veces y luego, se administró el coctel de diferenciación preparado en el momento. En los días 3, 6 y 9 del proceso, se desechó el medio gastado y se agregó medio de diferenciación nuevo. El proceso se ve representado en la Figura 12.

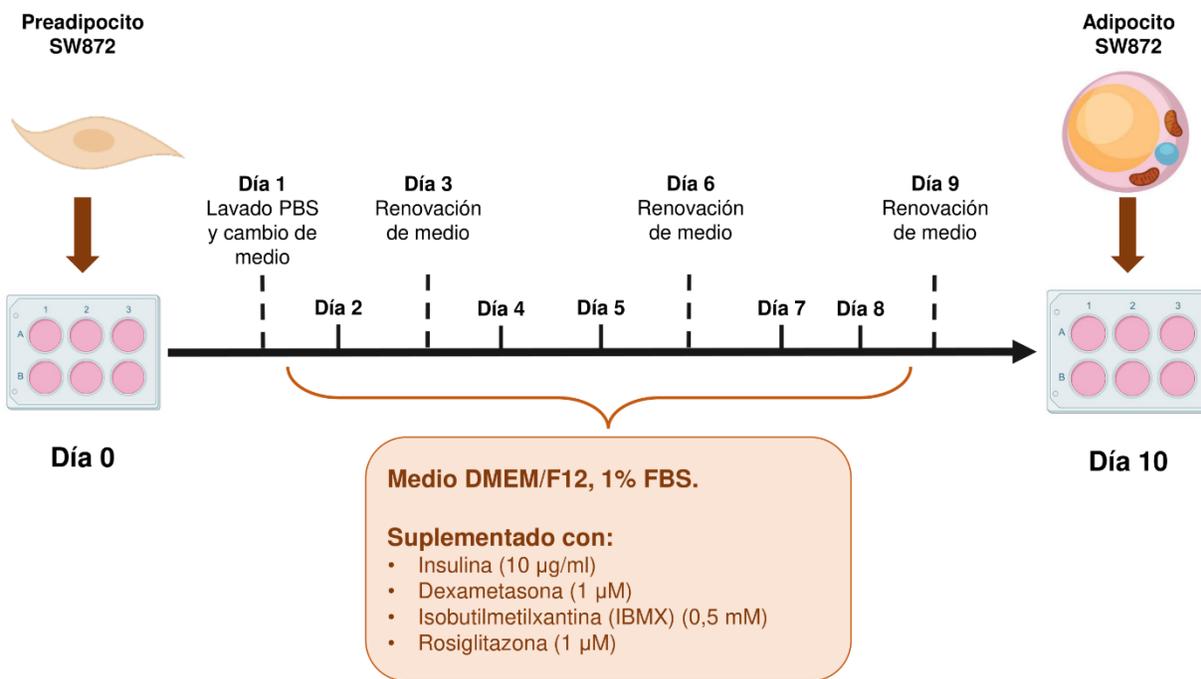


Figura 12: Metodología realizada para diferenciar preadipocitos SW872 a adipocitos por un período de 10 días.

Cada una de las placas utilizadas fue destinada a evaluar una condición en la diferenciación. Así, se obtuvo RNA y proteínas desde los cultivos en los días 1, 3, 7 y 10 del proceso de diferenciación. De cada placa se destinó tres pocillos para la extracción de RNA y otros tres para proteínas, así, se logró obtener tres replicados técnicos para cada condición. Esta distribución de condiciones se observa en la Figura 13.

Se observó y fotografió el cultivo bajo microscopía óptica a lo largo del proceso de diferenciación. Esto con el objetivo de determinar el avance de diferenciación en el cultivo mediante la observación del cambio morfológico de los preadipocitos relacionados al proceso de adipogénesis, pasando de una figura alargada a una redonda.

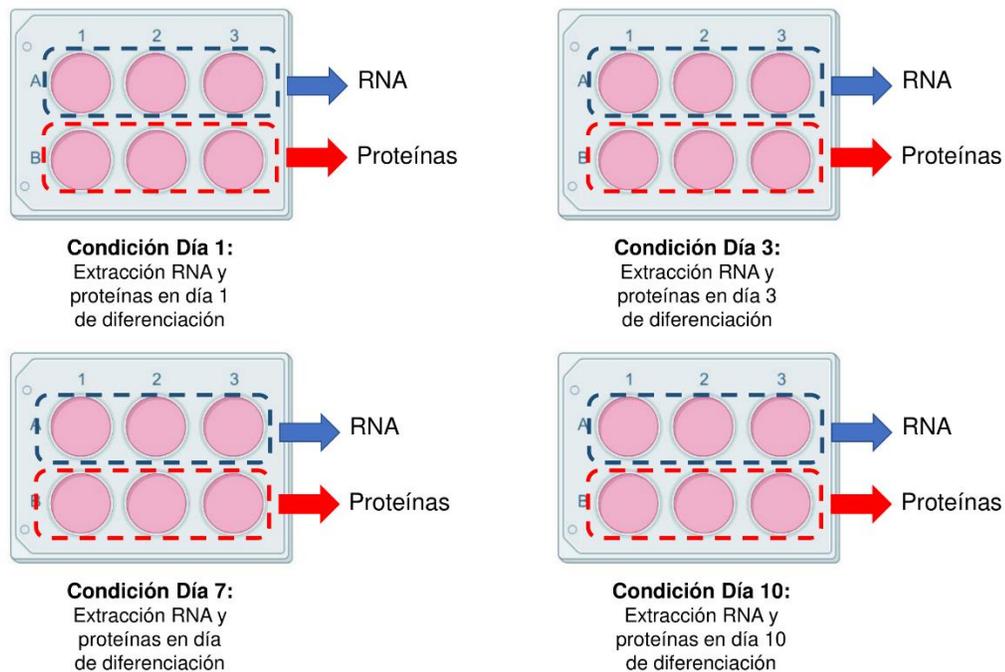


Figura 13: Distribución de las condiciones a evaluar a lo largo del proceso de diferenciación de los preadipocitos de la línea SW872 por un período de 10 días.

Además, se realizó la tinción Oil Red O de los cultivos en los días 1, 3, 7 y 10 del proceso de adipogénesis. Esto con el objetivo de observar, mediante la tinción roja, la formación de la gran gota lipídica característica de los adipocitos maduros, ya que esta tinción es capaz de marcar de color rojo las grasas neutras de la célula y que se concentran en la gran gota lipídica [74].

El Oil Red O, es un colorante azoico lipofílico, el cual tiñe de color rojo los lípidos. El fundamento tras esto reside en la solubilidad del colorante, la cual es mayor en lípidos neutros que en el solvente de la solución de tinción, comúnmente, un alcohol. Esto permite que el colorante se movilice desde la solución de tinción, en este caso, desde el isopropanol, hacia los depósitos de grasa debido a su mayor solubilidad [75].

Para evaluar la expresión génica de los preadipocitos y adipocitos *in vitro* durante el proceso de diferenciación, se realizó la extracción de RNA de los cultivos en los días 1, 3, 7 y 10 del protocolo, utilizando el reactivo TRIZOL™ de Invitrogen™.

Mediante RT-qPCR se analizó la expresión génica de distintos marcadores de adipogénesis de interés que permiten determinar el estado de diferenciación en el que se encuentra el cultivo. Así, se utilizaron marcadores de diferenciación temprana y marcadores asociados a un adipocito maduro.

Para la generación del cDNA a partir del RNA, se inició con un tratamiento con DNAsa, donde se utilizó el kit “*DNase I Invitrogen (18068-015)*” y su respectivo protocolo. Luego, se utilizó el kit “*RT-PCR Thermo scientific RevertAid H minus-(EP0451)*” para la reacción de retrotranscripción.

Para la reacción qPCR, se utilizó el kit “*Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (K0222)*” de Thermo Fisher Scientific™. Para normalizar la expresión de los marcadores asociados a adipogénesis, se utilizó el gen 18S y U6 como genes de expresión endógena, cuyas secuencias se encuentran en la Tabla 2. Se evaluó la expresión génica de distintas biomoléculas marcadoras de adipogénesis detalladas en la

Tabla 3. En la misma tabla, se detalla las secuencias de primarios utilizadas para cada marcador.

Con el objetivo de evaluar la expresión proteica de los preadipocitos y adipocitos durante el proceso de diferenciación *in vitro*, se extrajo proteínas desde los cultivos en los días 1, 3, 7 y 10 del protocolo de diferenciación. Se utilizó el buffer de lisis RIPA de Thermo Scientific™, con un 10% de inhibidor de proteasas “*cOmplete Mini, EDTA-free (11836170001)*” de Roche diluido en PBS.

Las muestras fueron procesadas para aislar las proteínas y posteriormente evaluadas mediante Western Blot, utilizando el kit de Cell Signaling, “*Adipogenesis Marker Antibody Sampler Kit (#12589)*”, utilizando anticuerpos primarios contra ADIPOQ, ACACA, FABP4, FASN, PLIN1 y PPAR γ y el anticuerpo secundario “*Anti-rabbit IgG, HRP-linked*” incluido en el kit. Como control de carga se utilizó “*B-Actina Rabbit mAb (#4970)*” de Cell Signaling.

Para realizar Western Blot, se cargó un total de 30 [ug] de proteína en un volumen total de 37,5 [ul]. La concentración de proteínas de cada muestra fue determinada utilizando el reactivo “*Pierce™ BCA Protein Assay Kit (#23227)*” de Thermo Fisher Scientific™.

5.2. Aislamiento y caracterización de adEVs

Con el objetivo de obtener adEVs, para que estos sean utilizados en la experimentación propuesta, se inició con el cultivo de preadipocitos de la línea celular SW872. Se inició la siembra con un área inicial de 55 [cm²] y se aumentó el área de siembra hasta alcanzar un total de 1.750 [cm²]. Para ello se utilizó dos botellas multicapa de cultivo de área 875 [cm²] de 5 pisos de Falcon® (abreviando como T875). Se usó el medio de cultivo DMEM/F12, HG, con un 10% de FBS. Al trabajar con las botellas T875, se utilizó un volumen de 20 [ml] de medio de cultivo por piso, dando un total de 200 [ml]

Se observó el crecimiento del cultivo hasta que se alcanzó una confluencia del 100%, lo que inició el protocolo de diferenciación de 7 días. Se utilizó el coctel de diferenciación descrito en el punto 5.1 y se administró un volumen de 38 [ml] del coctel por piso, obteniendo un volumen total de 380 [ml].

En el primer día de diferenciación, se lavó cada placa dos veces con 100 [ml] de PBS y luego se administró el nuevo coctel de diferenciación preparado en el momento. En los días 3 y 6 del proceso de diferenciación, se desechó el medio gastado y se agregó medio de diferenciación nuevo, con la diferencia de que en el día 6, el coctel de diferenciación utilizado era libre de vesículas extracelulares. Esto ya que el suero utilizado para elaborar el medio de diferenciación fue previamente tratado por ultracentrifugación diferencial, con el objetivo de eliminar cualquier tipo de vesícula proveniente del propio suero.

En el día 7 de diferenciación, se recolectó el medio de cultivo y se almacenó a -80°C hasta el día de su procesamiento. Además, se extrajo RNA y proteínas desde las placas de cultivo para su posterior análisis. Para aislar las adEVs desde el medio de cultivo recolectado desde adipocitos, se siguió el protocolo de ultracentrifugación detallado en el Anexo B. El equipo utilizado para este proceso fue la ultracentrífuga Sorval™ 80WX+ de Thermo Scientific, junto los rotores SuperSpin 630 y TH-660 de la misma marca. Para el primero, se utilizaron tubos de polialómero con capacidad máxima de 36 [ml] “N°79365”, con un factor K de 220 y para el segundo rotor, tubos de 4,4 [ml] “N°10509” de Thermo Scientific, con un factor K de 166.

Como la máxima capacidad volumétrica de funcionamiento del equipo de ultracentrifugación es de 219 [ml], y el volumen total de medio obtenido desde cultivo de adipocitos era de 380 [ml], este fue dividido a la mitad y procesado por ultracentrifugación en dos momentos distintos.

En cada proceso de ultracentrifugación, se obtuvo un total de 300 [μl] de adEVs en PBS. Así, al finalizar el aislamiento de estos desde el total del medio de cultivo, se obtuvo un volumen final de 600 [μl] de adEVs en PBS, del cual, un volumen aproximado de 150 [μl] fue utilizado para la caracterización de la muestra aislada.

Para confirmar el efectivo aislamiento de vesículas extracelulares desde el medio del cultivo, nanopartículas separadas mediante ultracentrifugación, fueron analizadas cuantitativa y cualitativamente de acuerdo con las normas dadas por la Sociedad Internacional de Vesículas Extracelulares (ISEV) en 2018 [76].

En primer lugar, se utilizó tecnología NTA (nanotracking analysis) o análisis de rastreo de nanopartículas, la cual evalúa la distribución de partículas de acuerdo con su tamaño (moda) y su concentración [nanopartículas/ml]. En segundo lugar, se usó Microscopía Electrónica de Transmisión o TEM, para determinar características morfológicas de los EVs aislados. Finalmente, mediante Western Blot, se buscó determinar la presencia de proteínas características de EVs en la muestra aislada y que son utilizadas como marcadores de vesículas extracelulares.

5.2.1. Análisis de rastreo de nanopartículas (NTA)

Para poder procesar y analizar la muestra mediante NTA, se realizó una dilución 1:20 en PBS filtrado de cada una de las muestras aisladas de adEVs mediante los dos ciclos de ultracentrifugación realizados. Se utilizó el *equipo NanoSight NS300 de Malvern Panalytical (UK)* el cual entregó como resultado la distribución de concentración de nanopartículas según el tamaño de partícula medido para cada muestra. Como se obtuvo un resultado para cada proceso de ultracentrifugación, se promediaron los resultados obtenidos para obtener valores más representativos de la muestra completa.

5.2.2. Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM)

Se realizó el análisis mediante TEM de una de las muestras de adEVs aisladas mediante ultracentrifugación. Se utilizó el equipo Talos F200C G2 de Thermo Scientific y acetato de uracilo para el marcaje de la muestra. En este análisis se buscó observar la morfología característica de EVs al ser marcados para ser visualizados mediante TEM, la cual es una morfología circular de color blanca que contiene una mancha negra en el interior generada por el acetato de uracilo sobre el EV, lo que le confiere una forma similar a una “dona”.

5.2.3. Western Blot

Se evaluó proteínas características en la muestra de adEVs aisladas mediante Western Blot, como CD9 y TSG101, proteínas que son consideradas como marcadores de vesículas extracelulares por ISEV [76]. Para esto, se utilizó anticuerpos primarios contra CD9 y TSG10 (*Anti-CD9 Rabbit mAb #13174* y *Anti-TSG101 antibody-ab125011* de Cell Signaling respectivamente). Como anticuerpo secundario se utilizó “*Anti-rabbit IgG, HRP-linked*” de Cell Signaling. Para revelar la membrana se utilizó el reactivo “*Super Signal West Fento 34095*” de Thermo Fisher Scientific y el escáner de membranas de LI-COR.

5.3. Estudio del efecto inflamatorio y/o fibrótico de adEVs sobre cultivos renales

Con el objetivo de estudiar el efecto inflamatorio y/o fibrótico que las adEVs pueden generar sobre células renales humanas *in vitro*, se cultivó células de la línea celular humana HCD (human collecting duct) utilizando como medio de cultivo DMEM Hams F12, Low Glucose, con 2% de FBS.

Se utilizaron placas de 6 pocillos, donde se cultivó un número inicial de 100.000 células por pocillo. Existían dos condiciones de cultivo a evaluar: células HCD, a las que se les administra adEVs en PBS y, células HCD a las que no se les administró adEVs, sino que únicamente PBS, considerándolo como vehículo.

Pasadas 24 horas desde el cultivo, se realizó dos limpiezas de las placas de cultivo con PBS y un cambio de medio en ambas condiciones de cultivo. Se utilizó un medio de cultivo bajo en FBS para detener la proliferación celular. Así, se utilizó DMEM Hams F12 Low Glucose, con un 1% de FBS, suero previamente tratado por ultracentrifugación, para depletarlo de las EVs que este pudiera contener y eliminarlas del sistema a evaluar.

Al tercer día del cultivo y, dependiendo la condición a evaluar, se contó el número total de células por pocillo y se administraron 1000 adEVs por célula por un periodo de 24 horas. Pasado este tiempo, se extrajo RNA desde el cultivo para evaluar la expresión génica de los cultivos de HCD con adEVs+PBS o solo PBS.

Se evaluó la expresión génica de marcadores de inflamación y fibrosis de los cultivos de HCD con o sin adEVs mediante RT-qPCR. Para evaluar inflamación se utilizó: interleucina 1B, IL-6, PAI-1 y NGAL. Esto ya que los primeros tres han ampliamente utilizados como proteínas proinflamatorias liberadas por una amplia variedad de tipos celulares y que son capaces de regular respuestas inmunitarias. NGAL es utilizado ya que ha sido determinado como un marcador de daño renal agudo, ya que su síntesis se eleva modelos experimentales de sepsis y de inflamación sistémica [77].

Para evaluar fibrosis, se utilizaron algunos de los marcadores más utilizados como lo son: COL1A1, CTGF y FN1. Esto ya que han sido correlacionados a la generación del tejido conectivo fibrótico en otros tejidos y órganos, como pulmón, corazón e hígado [78-80].

El procedimiento antes descrito se observa ilustrado en la Figura 14.

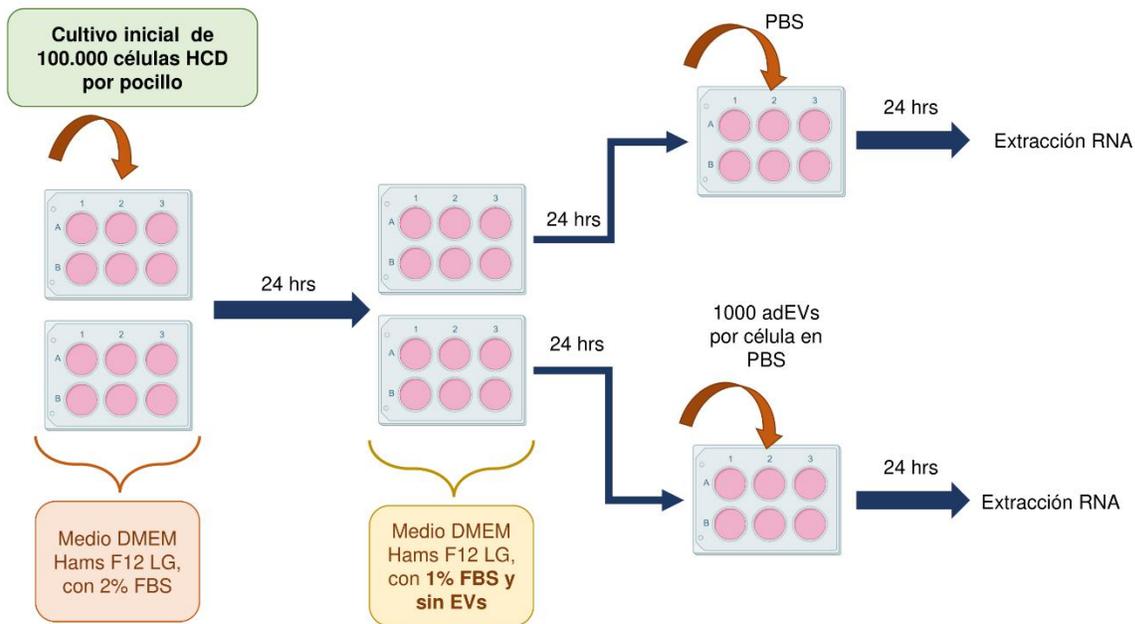


Figura 14: Diagrama resumen de la metodología utilizada para evaluar el efecto inflamatorio y/o fibrótico de las adEVs sobre células renales HCD.

5.4. Estudio internalización de adEVs en células renales

El objetivo de esta experimentación fue estudiar la capacidad de las adEVs de interactuar e internalizarse en las células renales humanas HCD y así, se capaces de entregar su cargo a esta célula.

Para ello, se procedió a realizar el marcaje de los adEVs con un fluoróforo, en este caso, se utilizó el kit “PKH67 Fluorescent Cell Linker MIDI67” de Sigma-Aldrich, el cual es capaz de marcar membranas plasmáticas. Para lograr el marcaje, en primer lugar, fue necesario aislar adEVs desde medio de cultivo recolectado desde cultivos de adipocitos mediante ultracentrifugación tal como se detalla en el Anexo B.

El pellet de adEVs obtenido fue resuspendido en 100 [μl] del Diluyente C del kit y luego fue marcado por 5 minutos a temperatura ambiente por una mezcla entre el reactivo PKH67 Green Fluorescent del kit y el Diluyente C (4 [μl] PKH67 + 1000 [μl] Diluyente C). Para detener la reacción, se agregó por un minuto 500 [μl] de BSA diluido al 5% en PBS filtrado, a temperatura ambiente.

El mix de adEVs y el reactivo fue ultracentrifugado a 100.000 g por 70 minutos a 4°C para precipitar las adEVs marcadas. El pellet obtenido fue limpiado con PBS dos veces fue y ultracentrifugado a 100.000 g por 70 minutos a 4°C. Este último paso, fue realizado dos veces para asegurar la limpieza de la muestra. Finalmente, el pellet que se obtuvo fue resuspendido en 100 [μl] de PBS filtrado.

Simultáneamente, se realizó el mismo procedimiento de precipitación y limpieza a una muestra control que no contenía EVs, pero si PBS, con el objetivo de actuar como control negativo en el proceso de marcaje.

Para poder determinar la concentración de la muestra aislada de adEVs marcados, se utilizó el equipo NanoSight NS300 de Malvern Panalytical (UK) para medir la concentración de adEVs mediante NTA. Así se obtuvo una concentración de 2×10^{10} [partículas/ml].

Los adEVs marcados con PKH67 fueron incubados con células HCD, previamente crecidas en cubreobjetos, donde se sembró 10.000 células por 12 horas. Se co-cultivó un aproximado de 37.000 adEVs marcados por célula. En otro cultivo, se realizó el mismo procedimiento, pero utilizando el control negativo, utilizando el mismo volumen de PBS tratado con PKH67.

Luego de esta incubación con adEVs marcados o control negativo según corresponda, las células fueron limpiadas dos veces con PBS frío y luego fijadas utilizando paraformaldehído al 4% por 10 minutos a temperatura ambiente. El núcleo de las células fue teñido con el reactivo “*VECTASHIELD® Antifade Mounting Medium with DAPI H-1200*” y luego se montaron los cristales en portavidrios.

Finalmente, se visualizaron los cultivos utilizando microscopio de fluorescencia, donde según los manuales de funcionamiento de los reactivos, PKH67 tiene una onda de excitación de 490 [nm] y una onda de emisión de 502 [nm]. Por su parte, DAPI tiene una onda de excitación de 360 [nm] y una onda de emisión de 460 [nm].

5.5. Partidores utilizados

A continuación, se presenta la lista de los partidores utilizados para evaluar la expresión génica de distintas proteínas a lo largo de la investigación mediante qPCR. Se presenta su nombre, su acrónimo y la secuencia *forward* y *reverse* que fue diseñada y utilizada.

Tabla 2: Partidores utilizados para evaluar la expresión de genes endógenos en los cultivos.

Gen	Acrónimo	Tipo de secuencia	Secuencia (5'→3')
RNA Ribosomal 18S (NR_145820.1)	18S	Forward	GTGTGCCCTATCAACTTTC
		Reverse	TTGGATGTGGTAGCCGTTTC
snRNA U6	U6	Forward	AAATTGGAACGATACAGAGA
		Reverse	AATATGGAACGCTTCACG

Tabla 3: Partidores utilizados para evaluar la expresión génica de marcadores de adipogenesis.

Gen	Acrónimo	Tipo de secuencia	Secuencia (5'→3')
Perilipina (NM_002666.5)	PLIN1	Forward	GCACCTGCCTTACATGGCTTG
		Reverse	GCCTTTGTTGACTGCCATCCT
Acetyl-CoA Carboxylase Alpha (NM_198834.3)	ACACA	Forward	CTCTTGGCCTTTTCCCGGTC
		Reverse	ATCAAAGTCAGGCAAGCGG
Fatty Acid Synthase (NM_004104.5)	FASN	Forward	AGGTGGTGATTGCCGGCATG
		Reverse	CGATGAGGTTGTCCCAGAACTCCT
Adiponectina (NM_001177800.2)	ADIPOQ	Forward	AGGGTCAGAAAGGAGATCCAG
		Reverse	GGGCATGTTGGGGATAGTAA
Peroxisome Proliferator Activated Receptor Gamma (NM_138712.5)	PPARg	Forward	AGCAAAGGCGAGGGCGATCTTG
		Reverse	GGATGGCCACCTCTTTGCTCTGC
Fatty Acid-Binding Protein 4 (NM_001442.3)	FABP4	Forward	TGCAGCTTCCTTCTCACCTTGA
		Reverse	TCCTGGCCCAGTATGAAGGAAATC

Tabla 4: Partidores utilizados para evaluar la expresión génica de factores inflamatorios del cultivo.

Gen	Acrónimo	Tipo de secuencia	Secuencia (5'→3')
Interleucina 6 (NM_000600.5)	IL-6	Forward	AGACGCTCCCTCAGCAAGGACA
		Reverse	AGCCGTGGGTCAGTATGTGAGAGG
Inhibidor del activador de plasminógeno (NM_001386460.1)	PAI-1	Forward	CTTCGGTCCAGTTGCCTTCT
		Reverse	TGGAATCTTCTCCTGGGGGT
Interleucina 1 beta (NM_000576.3)	IL-1B	Forward	CGTGTTGAAAGATGATAAGCCC
		Reverse	TCAGCACAGGACTCTCTGG
Neutrophil gelatinase associated lipocalin (NM_005564.5)	NGAL	Forward	CAGAGAAGACAAAGACCCGC
		Reverse	GCTGGCAACCTGGAACAAAAG

Tabla 5: Partidores utilizados para evaluar la expresión génica de factores fibróticos del cultivo.

Gen	Acrónimo	Tipo de secuencia	Secuencia (5'→3')
Colágeno, tipo I, alfa 1 (NM_000088.4)	COL1A1	Forward	GCAGACGGGAGTTTCTCCTC
		Reverse	CGGAGGTCCACAAAGCTGAA
Factor de crecimiento de tejido conectivo (NM_001287424.2)	CTGF	Forward	CAGCATGGACGTTTCGTCTG
		Reverse	AACCACGGTTTGGTCCTTGG
Fibronectina 1 (NM_212482.4)	FN1	Forward	GAAAGACCAGCAGAGGCATAA
		Reverse	CACTCATCTCCAACGGCATAA

6. RESULTADOS

6.1. Caracterización adipogénesis en la línea celular adiposa SW872

6.1.1. Evaluación de cambios morfológicos a lo largo de la adipogénesis

Con el objetivo de caracterizar el proceso de adipogénesis en un modelo *in vitro* de células de preadipocitos de la línea humana SW872, se realizó la diferenciación de preadipocitos a adipocitos en cultivo por un total de 10 días. En primer lugar, se buscó observar el cambio morfológico que los preadipocitos experimentan a lo largo de la diferenciación, pasando de una morfología alargada a una redonda. Para esto se fotografió mediante microscopía óptica los cultivos de preadipocitos a lo largo de la diferenciación de las células, en los días 1, 3, 7 y 10. Las imágenes obtenidas utilizando un aumento de 400x se observan en la Figura 15.

Se logra observar un claro cambio en la morfología de los preadipocitos a lo largo del proceso de diferenciación. En la Figura 15A se observa una fotografía de preadipocitos en el primer día de diferenciación. En esta se logra observar la morfología característica de los preadipocitos de la línea SW872, que es de tipo alargada. Las figuras esféricas que se aprecian en la fotografía son células que están en suspensión. En la Figura 15B, correspondientes al día 3 de diferenciación, se pueden observar los primeros cambios morfológicos de los preadipocitos, donde ya no son completamente alargadas, sino que comienzan a contraerse para adoptar una morfología redonda. En la Figura 15C se muestra el séptimo día de diferenciación, donde se puede apreciar que gran parte de las células ha adoptado la morfología redonda pero que aún existen células en un estado intermedio entre alargado y redondo. Finalmente, en la Figura 15D se puede observar que la mayor parte del cultivo ya adquirió la morfología redonda, que es característica de un adipocito.

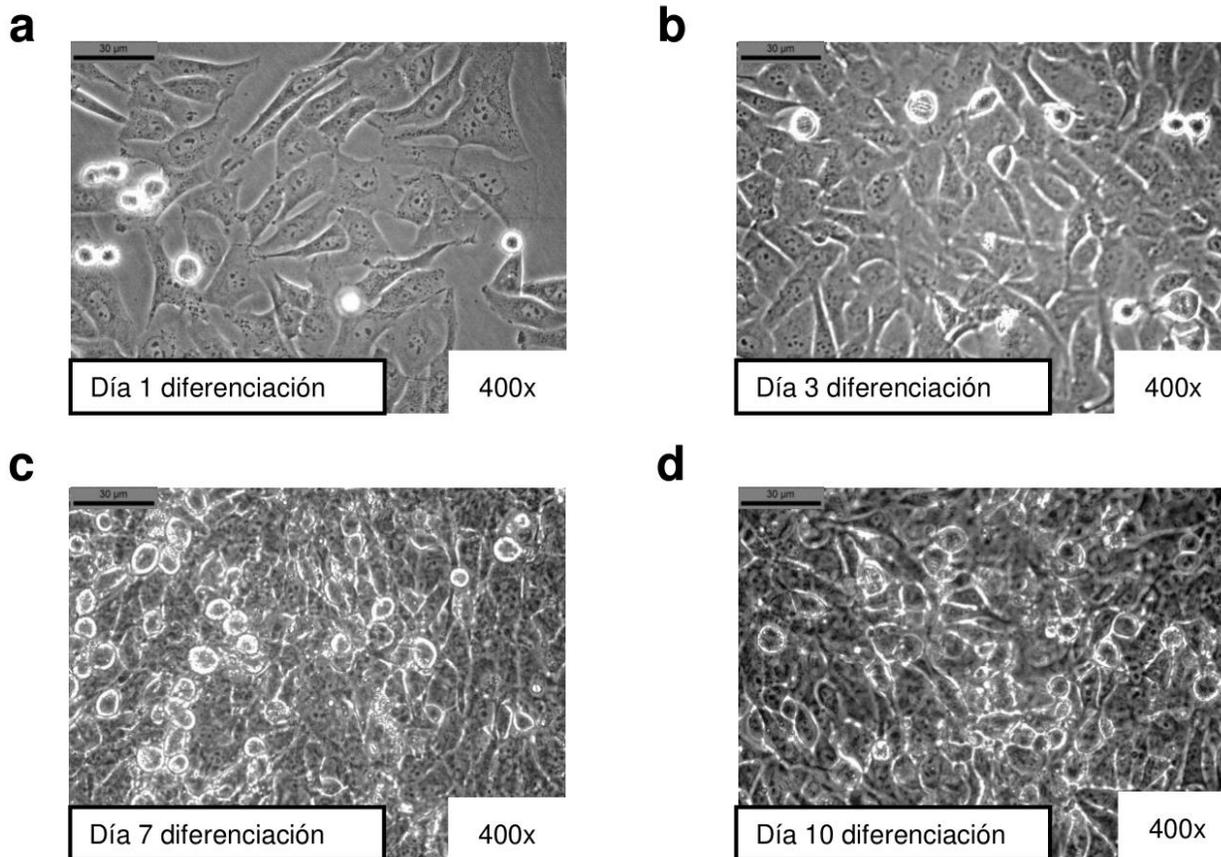


Figura 15: Fotografía de microscopio óptico realizadas a células de la línea SW872 a lo largo de 10 días de diferenciación a 400x.

Con el objetivo de determinar la efectividad del protocolo de diferenciación utilizado, además de observar el cambio morfológico de las células, es necesario comprobar la formación de la gota lipídica, la cual es una característica propia de un adipocito ya maduro. Para ello se realizó la tinción Oil Red O de los cultivos a lo largo del proceso de diferenciación y luego se observó mediante microscopía óptica los cultivos ya marcados. Esta tinción es capaz de marcar de color rojo grasas del cultivo y con ello, logra marcar las gotas lipídicas que se forman dentro del adipocito.

En la Figura 16 se observan las fotografías obtenidas de los cultivos a lo largo del proceso de diferenciación con un aumento de 400x. Desde el día 1 de diferenciación (Figura 16A) hasta el día 10 de diferenciación (Figura 16D), se puede observar un aumento en el nivel de tinción Oil Red O de color rojo en el cultivo, lo que implicaría la generación de depósitos de lípidos en el cultivo.

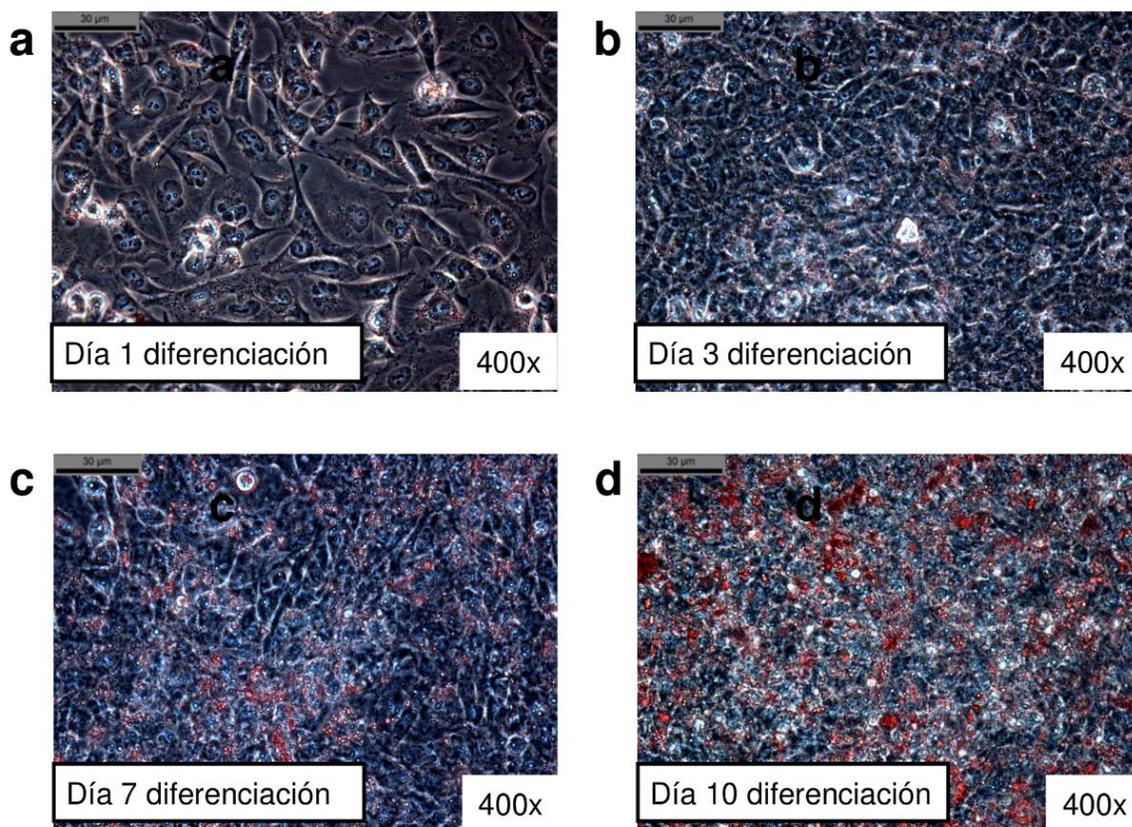


Figura 16: Fotografías bajo microscopía óptica de la Tinción Oil Red O realizada en células de la línea SW872 a lo largo del proceso de diferenciación a 400x.

Utilizando el software de análisis de imágenes ImageJ, se determinó el porcentaje de tinción Oil Red O en cultivo. Esto se realizó mediante la cuantificación del área marcada con rojo en cada fotografía. Así, en la Tabla 6 se especifica el porcentaje de tinción calculado para cada fotografía de la Figura 16.

Tabla 6: Porcentaje de tinción Oil Red O en el cultivo a lo largo del proceso de diferenciación.

Día de diferenciación	Porcentaje de tinción
Día 1	1,6%
Día 3	3,2%
Día 7	14,5%
Día 10	37,9%

6.1.2. Evaluación de la variación en la expresión génica de marcadores de adipogénesis a lo largo de la diferenciación del preadipocito.

Con el objetivo de evaluar cómo es la variación de la expresión génica de biomoléculas asociadas al proceso de diferenciación de los preadipocitos, se extrajo RNA desde los cultivos a lo largo de la experimentación y con este se sintetizó cDNA para realizar análisis de expresión mediante qPCR. Se evaluó la variación de distintos genes asociados al proceso de adipogénesis. Estos fueron PLIN1, ACACA, FASN, ADIPOQ, PPARg y FABP4. Se utilizó como genes de expresión endógena 18S y U6.

Los resultados obtenidos se observan en la Figura 17. Se realizó un análisis estadístico Kruskal-Wallis, con p significativo menor a 0,05 para poder analizar e identificar diferencias significativas en la expresión.

En la Figura 17A, se puede observar el gráfico correspondiente a PLIN1 o Perilipina 1, en la cual la expresión relativa del gen incrementa a medida que los días de diferenciación pasan, iniciando el incremento en la expresión en el día 3 y llegando a su máximo en el día 10. Existen diferencias significativas en la expresión entre los días 1 y 10.

Con respecto al gráfico de ACACA, FASN y PPARg (Figura 17 B, C y E, respectivamente), se puede observar un incremento de la expresión relativa en el día 3, donde se alcanza su máximo y luego comienza a descender. En la expresión de FASN, la expresión entre los días 7 y 10 se ve similar, pero al observar la distribución de los datos, se puede observar que la expresión en el día 10 es menor.

Al analizar los gráficos de ADIPOQ y FABP4 (Figura 17 D y F, respectivamente), se aprecia que el aumento de la expresión relativa de estos genes entre los días 1 y 3 es baja, pero que en el día 7 aumenta hasta alcanzar su máximo de expresión en el día 10. Existen diferencias significativas en la expresión entre el día 1 y día 10.

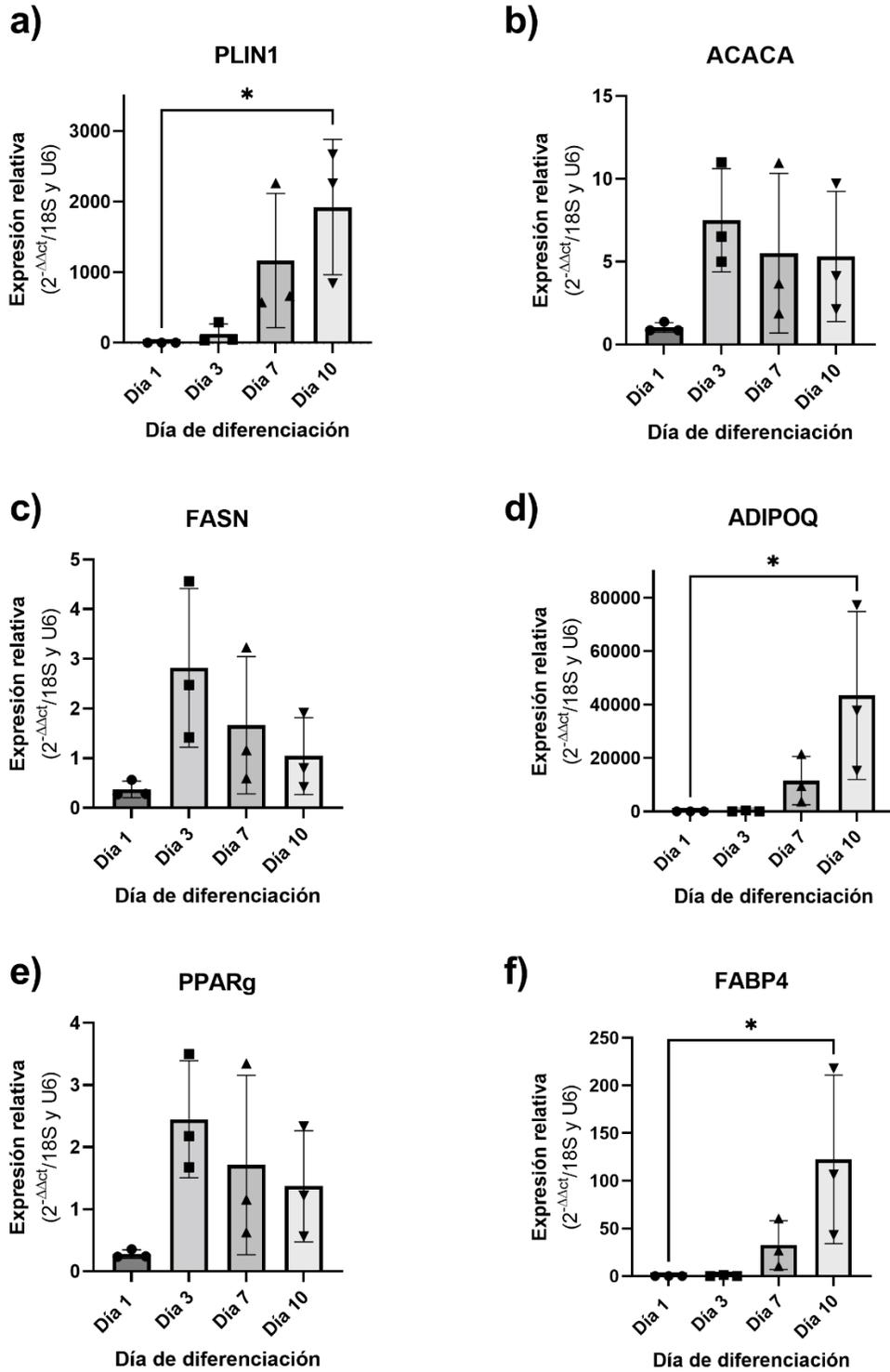


Figura 17: Variación de la expresión génica relativa de distintos marcadores de diferenciación adiposa a lo largo de diez días de diferenciación, donde se evaluó a) Perilipina 1, b) Acetyl-CoA Carboxylase Alpha, c) Fatty acid synthase, d) Adiponectina, e) Peroxisome proliferator activated receptor Gamma y f) Fatty Acid-binding protein 4, con * $p < 0,05$.

6.1.3. Evaluación de la variación en la síntesis de proteínas marcadoras de adipogénesis a lo largo del proceso de diferenciación del preadipocito.

Para evaluar cambios en la liberación de proteínas asociadas a la adipogénesis se realizó un análisis de Western Blot de las proteínas ACACA, PLIN1, FASN, ADIPOQ, PPARg y FABP4 a lo largo del proceso de diferenciación del preadipocito, específicamente, de los días 1, 3, 7 y 10 del proceso. Se utilizó como control de carga la proteína B-Actina y se realizó un análisis de densitometría utilizándola como normalizador de carga.

De las proteínas analizadas extraídas desde el proceso de adipogénesis, se logró observar la presencia de las bandas correspondientes a las proteínas ACACA, PLIN1, FASN, PPARg y FABP4. Sin embargo, no se logró observar la presencia de ADIPOQ en el procedimiento. De las proteínas observadas, se logró corroborar su peso molecular y se logró determinar que existía una diferencia en el nivel de síntesis de estas proteínas a lo largo de la diferenciación. En las Figura 18 a la Figura 22, se observan los resultados obtenidos del Western Blot de cada proteína, donde se observa una fotografía de la membrana utilizada y el resultado del análisis de densitometría realizado a cada proteína.

Del análisis realizado a los resultados obtenidos para PPARg en la Figura 18, en la membrana de Western Blot se puede ver la formación de una banda de un tamaño cercano a los 55 [kDa], lo que sería concordante con el tamaño esperado para esta proteína. Además, se observa que esta banda está presente en todos los días evaluados, pero que su grosor varía con los días, siendo los días 3 y 7 los más marcados. Se observa un aumento desde el día 1 de la expresión de esta proteína pero que después del séptimo día de diferenciación, comienza a descender. El análisis de densitometría arroja que en el día 1 existe una expresión relativa de 0,33 [RU], en el día 3 de 1,11 [UR], en el día 7 de 1,03 [UR] y en el día 10 de 0,61 [UR].

PPARg

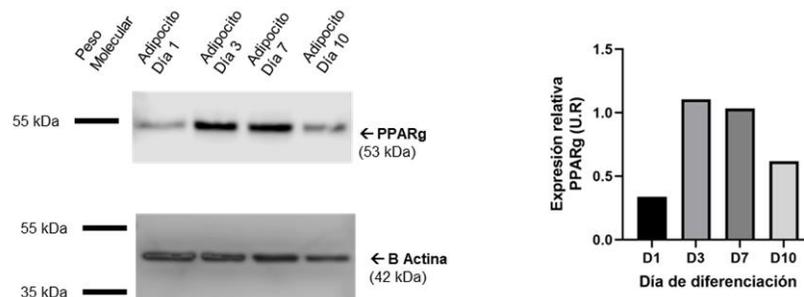


Figura 18: Resultados Western Blot y análisis de densitometría para la proteína PPARg realizados a muestras de preadipocitos y adipocitos durante el proceso de adipogénesis.

En la Figura 19, se encuentran los resultados obtenidos para PLIN1. En la fotografía de la membrana obtenida, se puede ver la banda correspondiente a PLIN1 en el día 7 y 10 de diferenciación, siendo más marcada en este último día. Se puede determinar que la banda si corresponde a la proteína buscada gracias al peso molecular obtenido. También, se puede observar una banda de 55 [kDa] en las cuatro condiciones evaluadas, la cual está asociada a presencia de Perilipina 2, una proteína de un peso molecular de 55 [kDa] que podría contener alguna estructura conservada con PLIN1 que el anticuerpo utilizado haya reconocido. De análisis de densitometría se obtiene que la expresión relativa de esta proteína en los días 1 y 3 es baja, pero en el día 7 es de 0,23 [UR] y en el día 10 es de 1 [UR].

PLIN1

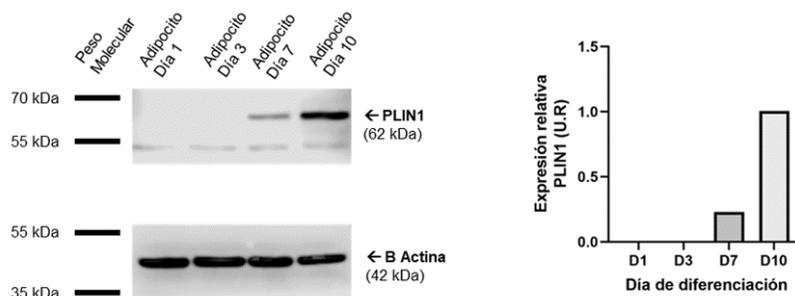


Figura 19: Resultados Western Blot y análisis de densitometría para la proteína PLIN1 realizados a muestras de preadipocitos y adipocitos durante el proceso de adipogénesis.

Con respecto a los resultados obtenidos para la proteína ACACA de la Figura 20, se puede observar en la fotografía de la membrana utilizada en Western Blot que las bandas obtenidas para esta proteína se observan en todos los días de diferenciación, pero que aumentan su grosor a medida que pasan los días. Además, se logra obtener bandas que poseen un peso molecular superior a los 250 [kDa] lo que indicaría que la proteína observada si corresponde a ACACA por su tamaño. Del análisis de densitometría de la proteína determina que existe un aumento en la expresión relativa a medida que los días de diferenciación transcurren, iniciando el día 1 con un valor de 0,48 [UR], en el día 3 con un valor de 0,74 [UR], en el día 7 con un valor de 0,93 [UR] y finalmente, el día 10 con un valor de 1,07 [UR].

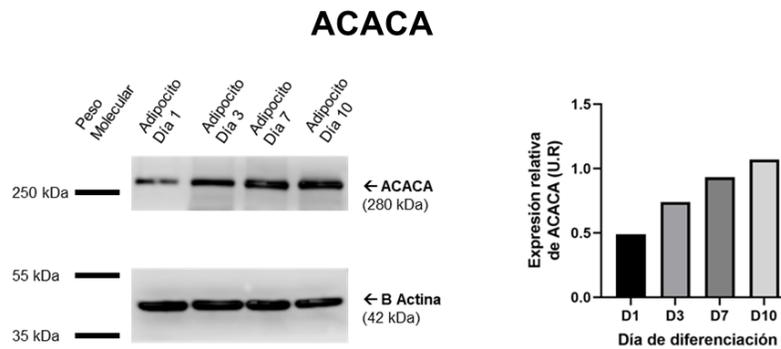


Figura 20: Resultados Western Blot y análisis de densitometría para la proteína ACACA realizados a muestras de preadipocitos y adipocitos durante el proceso de adipogénesis.

En la Figura 21 se observan los resultados obtenidos para FASN. De la fotografía de la membrana se puede ver que existe una banda por sobre los 250 [kDa] de peso molecular que el indicador de tamaño entrega, lo que correspondería al tamaño esperado para FASN. Además, esta proteína es visible en los cuatro días evaluados, siendo más marcadas las bandas en los días 7 y 10. También, se observa la formación de otras bandas de menor tamaño en los días 3, 7 y 10. El análisis de densitometría realizado a la proteína muestra que la expresión de esta proteína es similar en el día 1 y 3 de diferenciación (0,41 y 0,44 [UR] respectivamente), pero que esta aumenta su expresión sobre el doble en los días 7 y 10 (0,93 y 1,04 [UR] respectivamente), teniendo una mayor expresión en el día 10 del proceso.

FASN

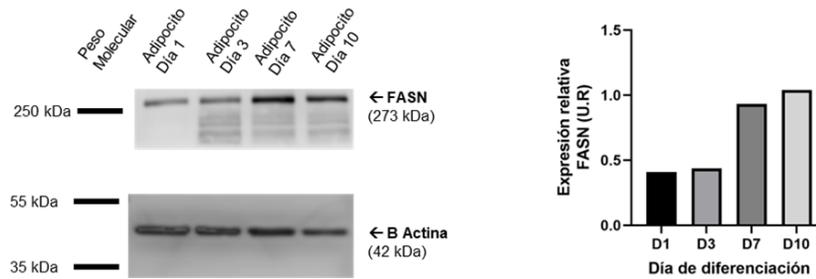


Figura 21: Resultados Western Blot y análisis de densitometría para la proteína FASN realizados a muestras de preadipocitos y adipocitos durante el proceso de adipogénesis.

La última proteína para analizar y que presentó bandas en la membrana de Western Blot es FABP4. Como se ve en la Figura 22, se observan bandas tenues marcadas en la membrana que se corresponden con el tamaño esperado para esta proteína, lo que permite determinar su presencia. Las bandas son mas notorias en los días 3, 7 y 10, pero casi no es visible en el día 1. Desde el análisis de densitometría de la membrana se obtiene que los valores de expresión relativa son: Día 1 con 0,37 [UR]; Día 3 con 0,62 [UR]; Día 7 con 0,53 [UR] y Día 10 con 0,47 [UR].

FABP4

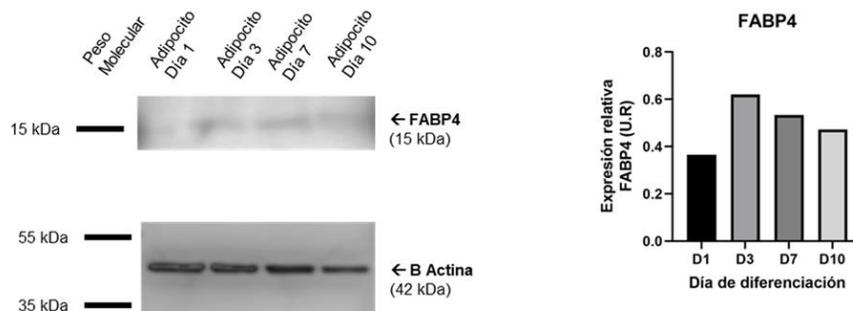


Figura 22: Resultados Western Blot y análisis de densitometría para la proteína FABP4 realizados a muestras de preadipocitos y adipocitos durante el proceso de adipogénesis.

6.2. Aislamiento y caracterización adEVs.

Se logró aislar un volumen total de 600 [μl] de adEVs diluidos PBS desde los 380 [ml] de medio de cultivo que se recolectó desde las placas con adipocitos diferenciados hasta el día 7 del proceso de diferenciación. Parte de este volumen fue utilizado para caracterizar la muestra aislada siguiendo las normas de la Sociedad Internacional de Vesículas Extracelulares. En la Figura 23, se presentan los resultados obtenidos al momento de caracterizar la muestra de adEVs aisladas desde el medio recolectado desde el cultivo de adipocitos.

En primer lugar, se analizó la muestra de adEVs aislados mediante Análisis de rastreo de nanopartículas o NTA, para así lograr determinar la concentración y tamaño de las partículas. En la Figura 23A, se puede observar el gráfico resultante, el cual representa la concentración de partículas obtenidas según el tamaño medido de estas, se observa que la mayor concentración de partículas tiene un tamaño modal cercano a los 120 [nm]. Se obtiene también los resultados de la Tabla 7, donde se determina que la concentración total de la muestra analizada es de $2,04 \times 10^{10}$ [partículas/ml]. El tamaño moda obtenido de la muestra, correspondería a un tamaño adecuado para vesículas extracelulares pequeñas o exosomas, ya que está dentro de los 50 a 150 [nm] de tamaño esperado.

En la Figura 23B, se observan los resultados obtenidos del Western Blot realizado a las muestras de adEVs aisladas. Se puede determinar la presencia de las bandas asociadas a las proteínas marcadoras de EVs, CD9 y TSG101, por el peso molecular de cada proteína obtenido en las membranas.

Finalmente, en las imágenes de la Figura 23C, se pueden observar dos fotografías obtenidas mediante microscopía electrónica de transmisión de las adEVs aisladas desde el cultivo mediante ultracentrifugación. Se logra observar partículas con una morfología casi circular, que se caracterizan por presentar una zona central oscura que le brinda la forma de “dona” que es causada por el reactivo de marcaje utilizado sobre la partícula esférica. Esta característica es la esperada para el determinar que la partícula es una vesícula extracelular. Además, se logra observar que estas formas presentan un tamaño que es menor a los 150 [nm] en base a la escala de tamaño entregada por TEM.

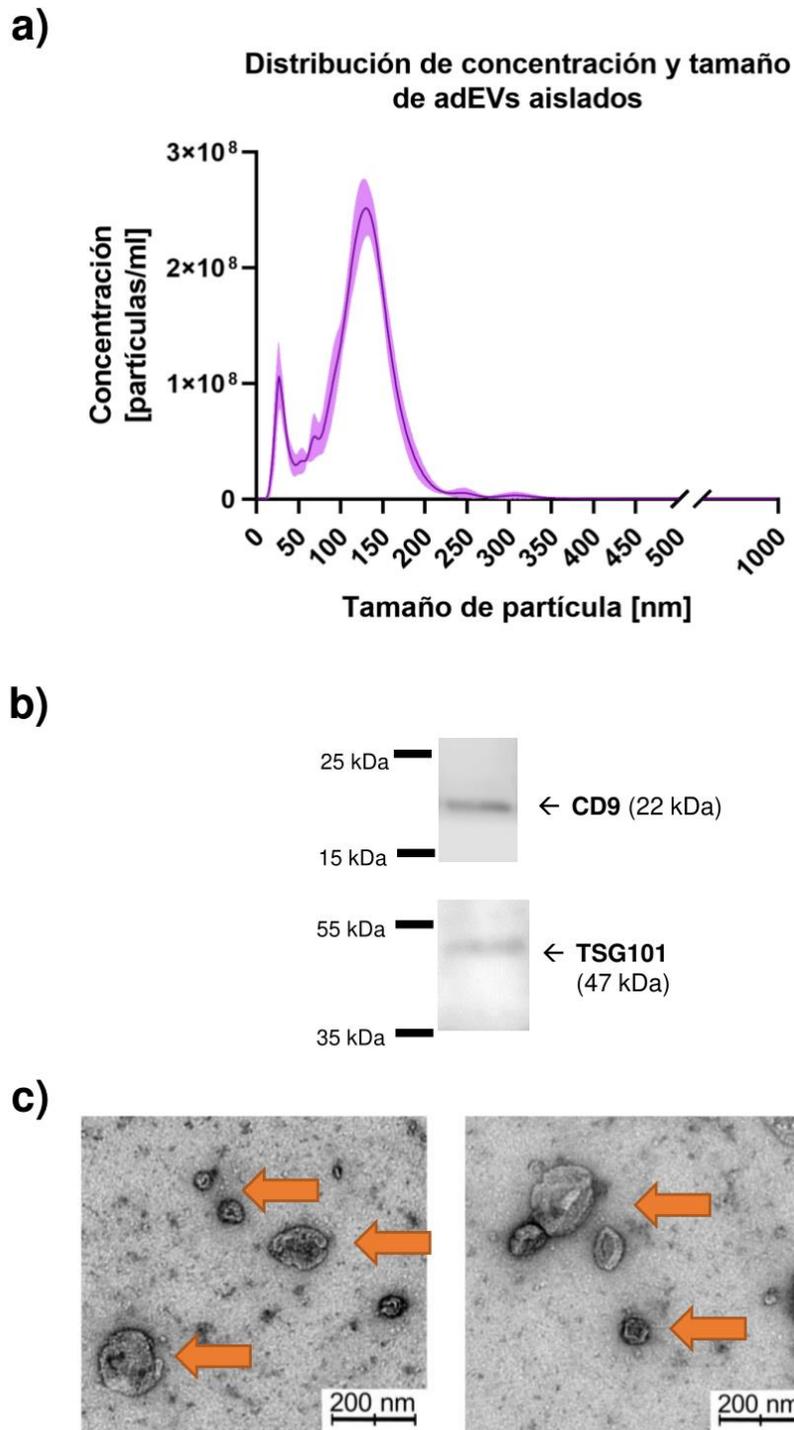


Figura 23: Resultados de la caracterización realizada a las muestras de adEVs aisladas desde el cultivo. A) Distribución de la concentración según el tamaño de partícula: B) Membranas de Western Blot obtenidas para CD9 y TSG101; c) Microscopía Electrónica de Transmisión.

Tabla 7: Concentración, tamaño medio y moda de las nanopartículas aisladas mediante ultracentrifugación desde cultivo de adipocitos.

Característica	Promedio	Error estándar
Concentración [partículas/ml]	$2,04 \times 10^{10}$	$4,4 \times 10^8$
Tamaño medio [nm]	128,3	2,2
Tamaño moda [nm]	134,4	0,4

6.3. Estudio del efecto inflamatorio y/o fibrótico de adEVs sobre células renales HCD.

Con el objetivo de evaluar si los adEVs pudieran ser capaces de causar una respuesta inflamatoria y/o fibrótica en células renales HCD después de ser co-cultivadas *in vitro*, se evaluó la expresión génica de distintas moléculas asociadas a inflamación y fibrosis en células HCD luego de haber sido expuestas a adEVs que estaban suspendidas en PBS por un periodo de 24 horas. Además, se evaluó la expresión génica de células HCD que fueron co-cultivadas con el vehículo o PBS para poder tener un control con el cual comparar y determinar el efecto de agregar adEVs al cultivo.

Para evaluar el efecto inflamatorio luego de la adición, se midió mediante RT-qPCR la variación en la expresión relativa de los genes IL-6, IL-1B, NGAL y PAI-1. Para evaluar fibrosis se estudió la variación de la expresión relativa de COL1A1, CTGF y FN1. Como genes de expresión endógena se utilizó en promedio de las expresiones relativas para 18S y U6. Se realizó el análisis estadístico Kruskal-Wallis, con p significativo menor a 0,05 para poder analizar e identificar diferencias significativas en la expresión de cada uno de los genes estudiados.

En la Figura 24 se observan los resultados obtenidos después de analizar los datos dados por RT-qPCR de las muestras evaluadas utilizando marcadores de inflamación.

De los resultados, se extrae que la expresión relativa de IL-6 tiende a aumentar luego de aplicar el tratamiento con adEVs, pero que la diferencia obtenida no es significativa de manera estadística. Se obtiene un valor de expresión relativa promedio de 1,04 para el tratamiento con vehículo y una de 1,43 para el tratamiento con adEVs.

Se observa que la expresión de IL-1B después de agregar adEVs al cultivo aumenta de manera significativa según la estadística estudiada, aumentando desde 1,01 en la condición con vehículo, a 2,2 luego de administrar los adEVs por 24 horas.

La variación de la expresión de NGAL no representa un valor significativo en base a la estadística, pero se puede observar que existe una tendencia al aumento cuando se agregan adEVs al cultivo. En la condición vehículo, existe una expresión relativa promedio de 1,04. Cuando se agregan los adEVs, la expresión aumenta a un valor promedio de 1,28.

Finalmente, PAI-1 no varía significativamente al comparar ambas condiciones de estudio, pero se obtiene que la variación de expresión promedio es menor en el caso que se agregan los adEVs comparando al caso donde se agrega el vehículo, iniciando con un valor de 1,14 y disminuyendo a 1.

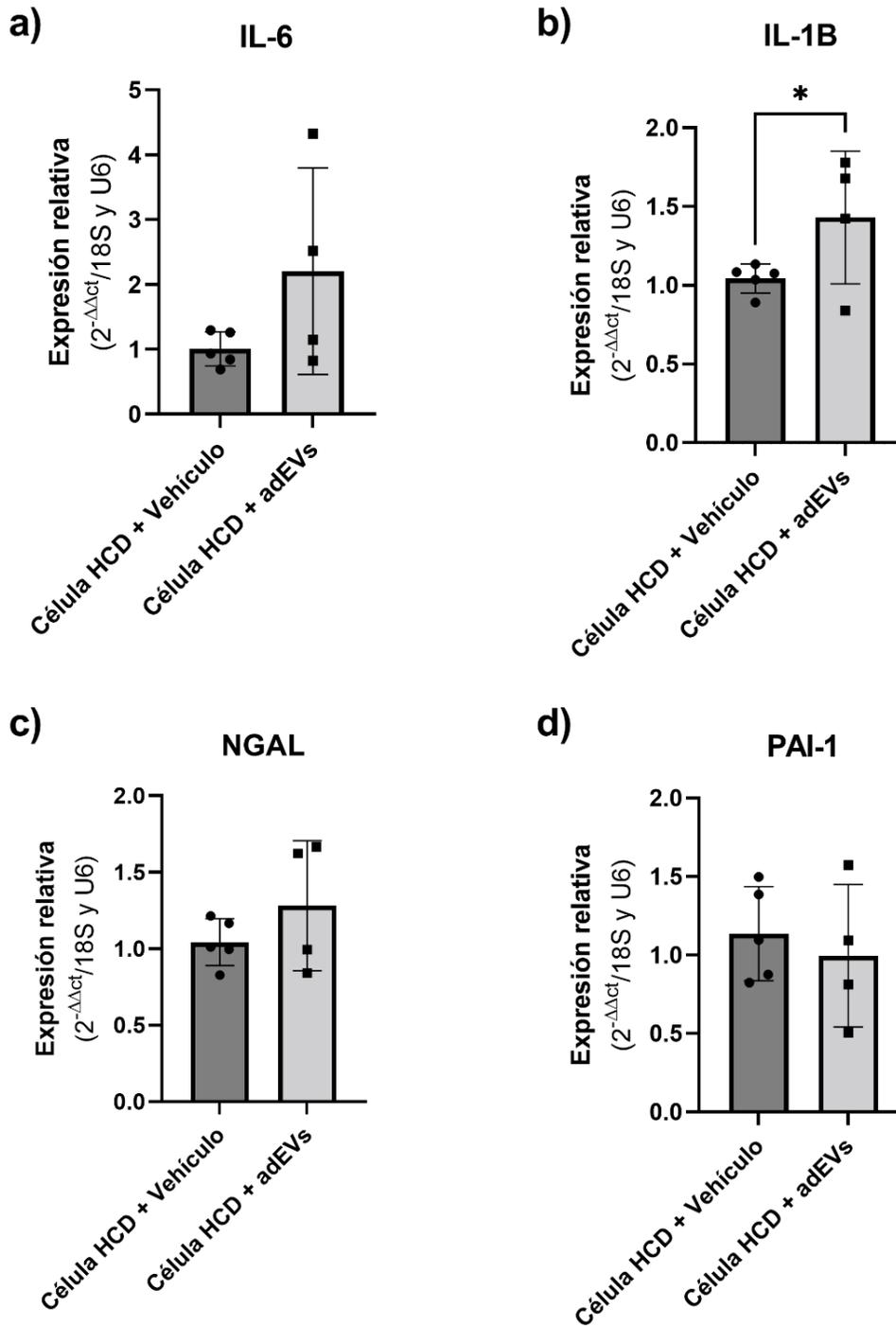


Figura 24: Expresión génica de los marcadores de inflamación de a) IL-6, b) IL-1B, c) NGAL y d) PAI-1 en cultivos de células HCD que fueron co-cultivadas con PBS o con adEVs suspendidos en PBS por un periodo de 24 horas (*p<0,05).

En la Figura 25 se puede observar los resultados obtenidos después de analizar los datos dados por RT-qPCR de las muestras evaluadas utilizando marcadores de fibrosis.

Se puede observar que la expresión relativa de COL1A1 tiene una tendencia a aumentar cuando se compara la condición sin adEVs y la que si los contiene. Sin embargo, la diferencia no es significativa luego de realizar el análisis estadístico correspondiente. En la condición con vehículo la expresión relativa promedio es de 1,01 y en la condición donde se añaden adEVs, el valor es de 1,29.

CTGF también es un gen donde se observa una tendencia al aumento de su expresión al agregar adEVs en comparación a su condición vehículo, pero la diferencia obtenida no resulta ser significativa. El valor promedio de expresión obtenido para la primera condición es de 1,04 y en la segunda, con adEVs, es de 1,25.

Finalmente, se evaluó la expresión relativa de FN1, de la cual no se observa cambios en la tendencia de la expresión luego de aplicado el tratamiento con adEVs. Se obtiene un valor de expresión promedio cercano a 1 en ambos casos y por ello, no existen diferencias significativas.

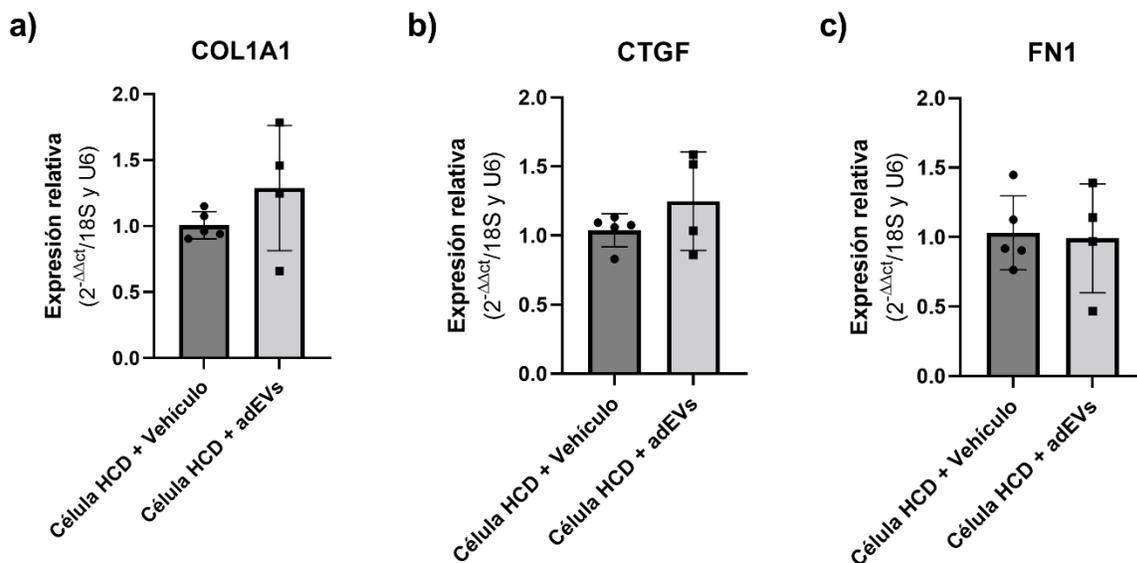


Figura 25: Expresión génica de los marcadores de fibrosis de a) COL1A1, b) CTGF y c) FN1 en cultivos de células HCD que fueron co-cultivadas con PBS o con adEVs suspendidos en PBS por un periodo de 24 horas (*p<0,05).

6.4. Estudio internalización de adEVs en la línea celular renal HCD

Con el objetivo de identificar si existe interacción y comunicación entre el tejido adiposo y renal a través de las adEVs, se buscó determinar la efectiva internalización de estas vesículas extracelulares derivadas de adipocitos SW872 en las células renales HCD.

Para este cometido, se aisló adEVs desde el medio de cultivo recolectado de adipocitos se marcaron con el reactivo fluoróforo PKH67, el cual, permite identificar bicapas lipídicas. Estos adEVs marcados fueron cuantificados por NTA para determinar su concentración y tamaño. Luego, estos adEVs marcados fueron co-cultivados con células renales HCD por 12 horas para permitir la captación e internalización de las vesículas. Pasado el tiempo de incubación, se limpió y fijó la placa de cultivo. Finalmente, con el reactivo DAPI se marcó el núcleo celular de las células HCD y se observó la fluorescencia emitida por el cultivo, mediante microscopía de fluorescencia.

Para tener un control negativo de marcaje, se realizó el mismo procedimiento de tinción e incubación con PBS filtrado.

En la Figura 26 se observa el resultado gráfico obtenido del análisis NTA de la muestra de adEVs marcados con PKH67 aislados. Se observa que la mayor concentración de partículas tiene un tamaño cercano a los 130 [nm]. Se obtiene también los resultados de la Tabla 8, donde se determina que la concentración total de la muestra analizada es de $2,45 \times 10^{10}$ [partículas/ml]. El tamaño moda obtenido de la muestra, correspondería a un tamaño adecuado de EV.

Tabla 8: Concentración, tamaño medio y moda de las nanopartículas aisladas mediante ultracentrifugación desde cultivo de adipocitos.

Característica	Promedio	Error estándar
Concentración [partículas/ml]	$2,45 \times 10^{10}$	$2,3 \times 10^8$
Tamaño medio [nm]	133,9	2,9
Tamaño moda [nm]	123,9	3,2

Distribución de concentración y tamaño de adEVs aislados y marcados con PKH67

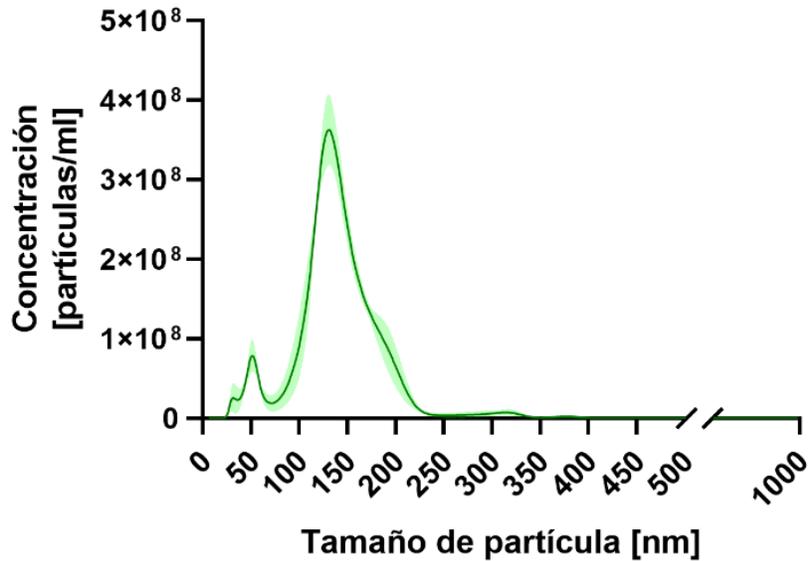
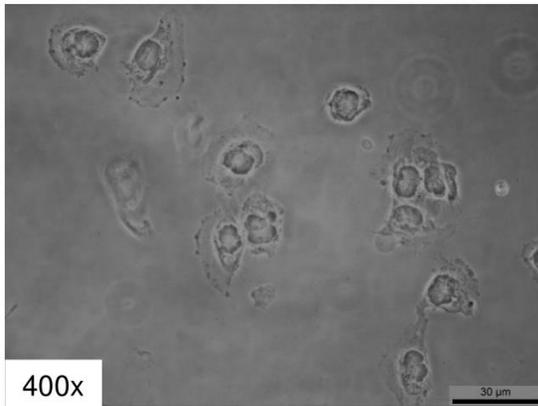


Figura 26: Distribución de la concentración y tamaño de las adEVs aisladas que fueron marcadas con el reactivo PKH67.

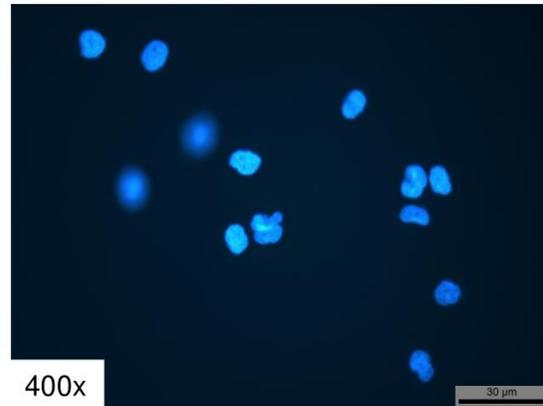
En la Figura 27 se observan las fotografías obtenidas del cultivo de células renales HCD que fueron co-cultivados por 12 horas con el control negativo de tinción con PKH67. En la Figura 27A se observa la fotografía del cultivo a campo claro, con un aumento de 400x. En la Figura 27B se observa la fotografía obtenida mediante la microscopía de fluorescencia realizada para identificar el marcaje realizado con DAPI con color azul. En la Figura 27C se observa la fotografía realizada para identificar el marcaje con PKH67 con color verde. En la Figura 27D se observa la combinación de las fotografías B y C.

Los resultados obtenidos para la muestra en que se utilizó adEVs marcados con PKH67 están representados en la Figura 28. En la Figura 28A se observa la fotografía del cultivo a campo claro, con un aumento de 400x. En la Figura 28B se observa la fotografía obtenida mediante la microscopía de fluorescencia realizada para identificar el marcaje realizado con DAPI con color azul. En la Figura 28C se observa la fotografía realizada para identificar el marcaje con PKH67 con color verde. En la Figura 28D se observa la combinación de las fotografías B y C.

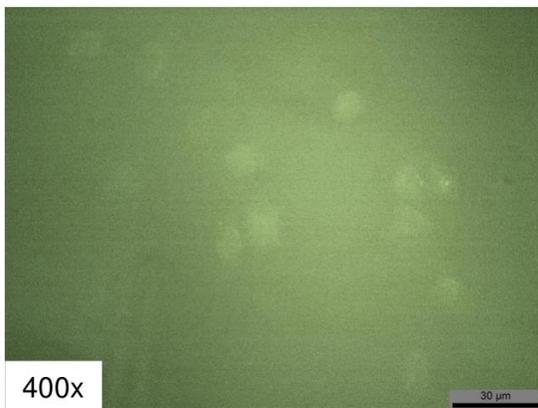
Células HCD control negativo, sin adEVs



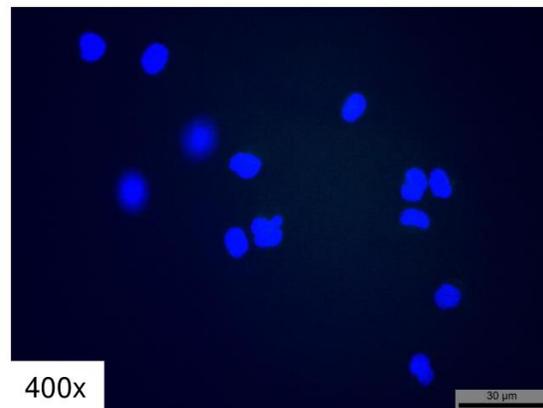
a) Campo claro



b) Tinción DAPI



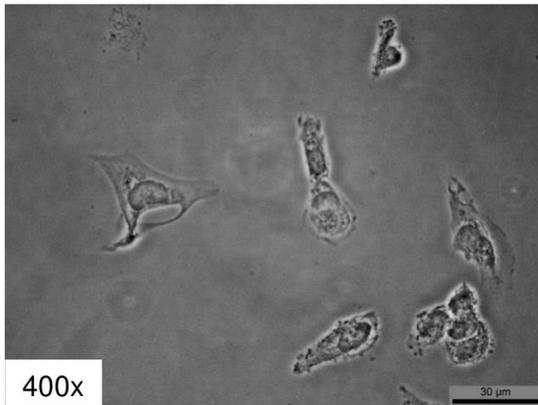
c) Tinción PKH67



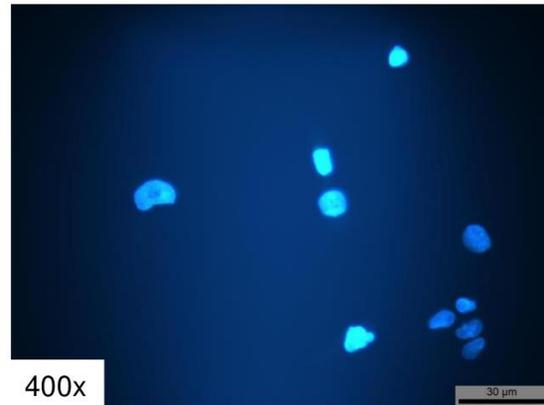
d) Merge

Figura 27: Fotografías de la microscopía óptica y de fluorescencia realizadas al cultivo de células HCD co-cultivadas con el control negativo de tinción PKH67.

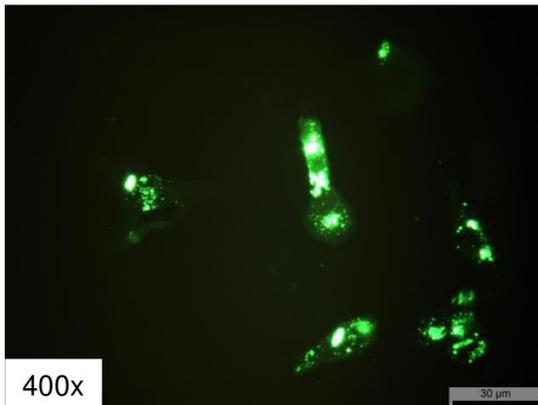
Células HCD con adEVs



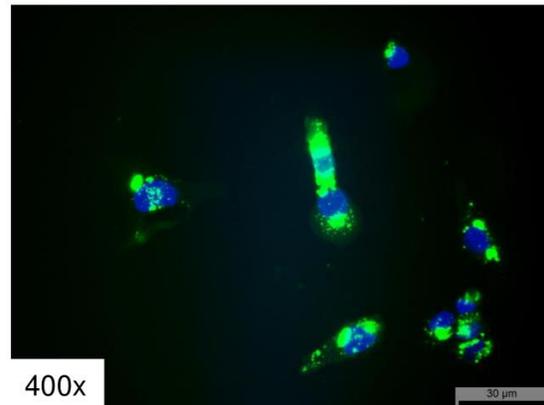
a) Campo claro



b) Tinción DAPI



c) Tinción PKH67



d) Merge

Figura 28: Fotografías de la microscopía óptica y de fluorescencia realizadas al cultivo de células HCD co-cultivadas con las adEVs marcadas previamente con el reactivo PKH67.

7. DISCUSIÓN

El presente estudio muestra que las adEVs de la línea celular SW872 pueden ser efectivamente aisladas y concentradas *in vitro* mediante cultivos en mediana escala. Las adEVs interactúan eficientemente con células de la línea celular renal HCD *in vitro* y serían capaces de modificar su fenotipo, evidenciado por cambios en la expresión génica, ya sea por interacción con la adEVs per se o por la transferencia efectiva de su cargo, que puede incluir variadas biomoléculas como mirRNA, RNA, proteínas, lípidos de membrana, entre otros. El aumento de IL-1B indica que la adEVs aporta un potencial proinflamatorio que comunicaría el adipocito a la célula renal.

Este resultado es pionero y contribuye un aporte a la comprensión de la fisiopatología de la obesidad y su impacto en otros tejidos. La obesidad promueve un ambiente proinflamatorio al nivel del tejido adiposo y su secretoma, incluyendo las adEVs tendrían un rol importante en la expansión del fenotipo deletéreo de la patología.

7.1. Fundamentos de discusión

Investigaciones realizadas a la línea de fibroblastos murinos 3T3-L1, la cual, es una línea celular de preadipocitos comprometida a diferenciarse a adipocitos derivada de células embrionarias de ratón [81], han demostrado que los adipocitos liberan microvesículas y exosomas [82]. La cuantificación de estos adEVs reveló la capacidad de los adipocitos, de liberar cantidades importantes de EVs, ya sea en modelos *in vitro* o en adipocitos primarios de ratón, lo que podría asociarse a una función secretora importante de EVs como mecanismo de comunicación celular.

Connolly y cols. [83] realizaron un estudio utilizando la misma línea murina, y en este se reveló, que la concentración de adEVs liberada aumenta antes de la diferenciación celular o adipogénesis. Es decir, que preadipocitos poseían una capacidad de liberación de EVs pequeños mayor a los adipocitos. Estos exosomas poseían altos niveles de ácidos grasos de señalización, como el ácido araquidónico, y de marcadores de adipogénesis, tal como lo es PPAR γ y el factor de preadipocito 1 (PREF1) [83]. Este estudio sugiere, además, que el cargo de los adEVs generados, depende del estado de diferenciación del adipocito. Esto es interesante que, dependiendo del nivel de adipogénesis del tejido, en un estado obeso, la cantidad de adEVs liberados y su cargo serían variables.

Con respecto a estudios clínicos relacionados a adEVs, en el año 2018, Connolly y su grupo [84] realizaron un experimento que buscó encontrar evidencia de la circulación de adEVs en el torrente sanguíneo humano y dilucidar si estos pudiesen ser utilizados como biomarcadores circulantes de adipocitos *in vivo*. Así, mediante la evaluación de marcadores de vesículas extracelulares y de adipocitos, logró confirmar la presencia de adEVs en circulación humana, lo que respaldaría la capacidad endocrina de estas estructuras.

En el año 2019, el grupo de investigación de Santamaria-Martos [85] obtuvo y comparó, mediante propiedades biofísicas y contenido de miRNAs, las EVs circulantes de mujeres sanas y obesas. Determinaron que existe una correlación negativa entre el IMC de la persona y el diámetro de las EVs. Mediante microarreglos del contenido de miRNA de las EVs, se determinó que el patrón de estos se asociaba con la obesidad y con la resistencia a la insulina.

Se publicó, en el año 2021, un estudio guiado por la investigadora Camino. Este tenía como objetivo estudiar diferencias entre adEVs humanos provenientes de distintos depósitos de tejido adiposo, en este caso, del tejido subcutáneo y del visceral. Además, se buscó diferencias entre adEVs de pacientes obesos y delgados. Se determinó en primer lugar que efectivamente existían diferencias en el tamaño de las adEVs, siendo las derivadas de pacientes obesos más grandes que las de paciente delgado. También existía diferencias en las concentraciones de adEVs aisladas según el depósito, obteniendo mayores cantidades desde la grasa visceral [18].

Con respecto a la composición proteica de los EVs, se determinó que la concentración de proteínas relacionadas a la obesidad era mayor en los adEVs del tejido visceral de los pacientes obesos y se determinó la presencia de una gran variedad de adipocinas en estas [18].

7.2. Vesículas extracelulares y su potencial uso como biomarcadores

Una de las cualidades que genera más interés de los EVs, en especial de los exosomas, es su capacidad de incorporar biomoléculas desde la célula de origen. Así, se está estudiando su habilidad de actuar como transportadores de biomarcadores relacionados a alteraciones en el organismo que permitan diagnosticar enfermedades o evaluar el estado de avance de estas [55, 57].

Nace un interés de tipo clínico en la utilización de estas vesículas debido a que es posible encontrar y aislar exosomas desde distintos fluidos del organismo, como la sangre y la orina, lo que permitiría utilizarlos como biopsias líquidas y ser una no invasiva herramienta en el diagnóstico de enfermedades [55, 57].

Por ejemplo, se ha observado que los exosomas aislados desde plasma sanguíneo y fluido cerebrospinal contienen en su interior la proteína α -sinucleína, la cual está asociada con la enfermedad de Parkinson [86-88]. También se ha observado que los exosomas aislados desde orina tienen la capacidad de reflejar el daño renal agudo [89].

Otra posible aplicación de interés es la utilización de EVs en desarrollo de transportadores dirigidos de sustancias de interés, como lo serían miRNA proteínas y/o drogas, para el tratamiento localizado de enfermedades o vacunas. Sin embargo, es una aplicación que está en desarrollo [55, 57].

Así, existe una gran cantidad de aplicaciones potenciales de los EVs en el campo clínico, pero se hace necesario tener métodos de aislamiento y análisis de EVs estandarizados con el fin de cumplir los requisitos que exigen las agencias reguladoras como la Administración de Alimentos y Medicamentos o FDA, por sus siglas en inglés, para poder utilizar los exosomas como biomarcadores, vacunas, dispositivos de administración de fármacos y herramientas terapéuticas [57].

A continuación, se discuten los resultados obtenidos a lo largo de este trabajo de investigación.

7.3. Caracterización adipogénesis en la línea celular adiposa SW872

Se desarrollo un cultivo celular *in vitro* de células SW872 que siguió un protocolo de diferenciación adipogénica, se evaluó cambios en la morfología, la formación de la gota lipídica y la expresión de marcadores de adipocitos.

Mediante microscopía óptica y con la tinción Oil Red O se evaluó el cambio morfológico y se comprobó las diferencias en la forma de los preadipocitos, cambiando desde una morfología principalmente alargada a una esférica, similar a lo observado en estudios previos de adipogénesis en la línea celular humana LS14 [66].

Con respecto a los resultados obtenidos en la tinción Oil Red O, se observó la formación de la gota lipídica característica de los adipocitos, lo que si permite determinar la efectiva diferenciación de los preadipocitos. Sin embargo, el tamaño y el porcentaje de tinción no fueron los esperados en base a la bibliografía estudiada, ya que se esperaba la formación de una estructura lipídica que ocupara la mayor parte del citoplasma celular, pero las gotas observadas no cumplían esto. Por ello, el porcentaje de tinción en el cultivo no fue mayor a un 40% después de diez días de diferenciación. Esto podría ser explicado por las condiciones de cultivo utilizadas, las cuales difieren a lo que encuentra en un organismo. Por ejemplo, el porcentaje de nutrientes contenidos en el medio de cultivo utilizado en el experimento puede no ser el suficiente para que estas células puedan formar gotas lipídicas de gran tamaño, tal como se podría observar en los adipocitos que pertenecen al tejido adiposo del organismo, en donde si existe una fuente constante de nutrientes brindados a través de la alimentación.

Con respecto a la expresión génica y proteica de los preadipocitos y adipocitos a lo largo del proceso, se logró evaluar durante diez días distintos marcadores de diferenciación temprana y de adipocitos maduros (Anexo A), siendo el día 7 el óptimo según los resultados obtenidos. A continuación, se analiza el rol y determinación de cada uno de los genes asociados a diferenciación adipogénica:

- PPAR-g, donde se observa que tanto la expresión génica como la proteica se condicen. En ambas, la expresión mínima ocurre en el día 1 y la máxima ocurre en el día 3, desde donde disminuye hasta el día 10. Esto se condice con la bibliografía estudiada ya que, al ser PPAR-g un regulador maestro de la diferenciación de los preadipocitos, es esperable que su expresión sea máxima en los primeros días del proceso. PPAR-g inicia la cascada de expresión de proteínas inductoras de diferenciación que son capaces de cambiar la morfología y funcionalidad de la célula.

- Perilipina 1 (PLIN1), la cual es una proteína que recubre la gota lipídica en adipocitos protegiéndola de lipasas. PLIN1 tiene una tendencia a aumentar en el día 7 y 10 de diferenciación, asociado a la formación de la gota lipídica [7, 90].
- Acetyl CoA Carboxylase Alpha o ACACA, proteína que es clave en la biosíntesis y oxidación de ácidos grasos [91], se puede observar que existen diferencias en cómo se expresa el gen y se genera la proteína durante la diferenciación. En la expresión génica se observa un aumento de la expresión hasta el día 3, desde donde decae y se mantiene estable en los días 7 y 10. En cambio, la presencia de la proteína en el cultivo aumenta a lo largo de la diferenciación, lo que implicaría que dentro de la célula existe una mayor cantidad de esta en el día 10.
- Fatty acid synthase o FASN es una proteína que cataliza la síntesis de ácidos grasos largos de acetyl-CoA [92]. Al igual que en ACACA, existe una diferencia en la expresión génica y proteica del cultivo, donde en la primera, existe un máximo de expresión en el día 3 que decae y, en la expresión proteica, existe un aumento en la cantidad de proteína a medida que ocurre la adipogénesis. Esto podría deberse, al igual que en ACACA, a la variabilidad de los resultados de la expresión génica para cada replicado técnico utilizado.

ACACA y FASN son proteínas clave que participan en la síntesis de ácidos grasos, donde FASN utiliza acetil-CoA para iniciar una nueva cadena de acilo que luego se alarga usando malonil CoA, generada por ACACA. Posteriormente, los productos primarios de FASN pueden alargarse y/o desaturarse para producir un conjunto de ácidos grasos como producto final del metabolismo de los carbohidratos en la Lipogénesis *de novo* [93]. Así, tiene sentido que estas proteínas se comporten similar en el proceso, ya que están ligadas a la misma ruta metabólica de síntesis de ácidos grasos, la cual se ve fomentada en el inicio de la adipogénesis.

- Fatty Acid Binding protein 4 o FABP4 (15 kDa) está ligada a la formación de la gota lipídica ya que es capaz de unir cadenas largas de ácidos grasos y ligandos hidrofóbicos [94]. Al observar la expresión del gen de esta proteína, se observa que esta inicia en el día 7 y aumenta considerablemente en el día 10. Esto estaría acorde a la generación de la gota lipídica y a la maduración del adipocito en el día 10 [94]. Por Western Blot, se observa que existe expresión de la proteína a lo largo de todo el período de experimentación, siendo máxima en el día 3. En las fotografías, se observa una baja resolución de las bandas, por lo que se necesitó intensificar el contraste para analizar el resultado.

- Adiponectina o ADIPOQ, la cual es una proteína exclusiva de adipocitos y está relacionada a control del metabolismo de las grasas y la sensibilidad a la insulina [7, 13, 95]. Como es un marcador de adipocito maduro, se esperaría observar la expresión de esta en los últimos días del proceso de diferenciación. Esto es algo que si se observa en los resultados obtenidos mediante RT-qPCR, ya que la expresión relativa de este gen aumenta desde el día 7 del proceso. Sin embargo, no se obtuvo resultados para el análisis de expresión proteica, lo cual puede asociarse a diversos factores técnicos como la baja calidad del anticuerpo, fallas en Western Blot, o también factores inherentes a lo adipocitos como que la cantidad de proteína Adiponectina en el lisado celular no fuera la suficiente para ser detectada en el análisis (Ej. Adiponectina es una proteína principalmente de secreción [96]) u otro factor.

7.4. Aislamiento y caracterización de adEVs desde un cultivo a escala de laboratorio de SW872 diferenciadas

Se obtuvieron nanopartículas aisladas desde un cultivo en escala de laboratorio de adipocitos SW872 mediante ultracentrifugación (UCF), las que corresponderían a vesículas extracelulares según los criterios MISEV 2018 [76], por lo que fueron utilizadas en las siguientes etapas del trabajo de investigación. La metodología de separación y aislamiento de adEVs se detalla en el Anexo B. En efecto, mediante Análisis de rastreo de nanopartículas o NTA se determinó que el tamaño de las adEVs aisladas correspondía al tamaño moda esperado para una EV, siendo de 134,4 [nm], lo que está en el rango de lo esperado para un exosoma o vesícula extracelular pequeña (50-150 [nm]). Mediante Western Blot se logró determinar la presencia de los marcadores de vesículas extracelulares, CD9 y TSG101, confirmando que la muestra aislada corresponde a EVs. La microscopía electrónica de transmisión (TEM) de adEVs de células SW872 reveló la presencia de vesículas extracelulares con la morfología de “dona” y con tamaño de partícula exigido por MISEV 2018 [76].

7.5. Estudio del efecto proinflamatorio y/o fibrótico que los adEVs pueden generar sobre células renales HCD.

A partir de los resultados obtenidos, se puede identificar que la adición de las adEVs de SW872 al cultivo de células renales HCD es un estímulo que induce cambios en la expresión de marcadores de inflamación en células renales, como IL-1B, en forma significativa o con tendencia al aumento (Figura 24). De allí que los adEVs serían nanopartículas capaces de generar o inducir el inicio de una respuesta del tipo proinflamatoria en células renales humanas *in vitro*.

Si bien IL-1B e IL-6 son citoquinas asociadas a procesos inflamatorios y cuyo aumento de expresión es esperable cuando se induce un estímulo proinflamatorio, el aumento de la expresión de un 25% de la lipocalina NGAL en presencia de adEVs puede tener una contribución mayor al fenotipo de la célula renal y su importancia fisiopatológica. NGAL o LCN2 es una lipocalina actualmente considerada un marcador de inflamación asociado directamente con el daño renal agudo, como así también con la activación de la vía del receptor de mineralocorticoides (MR) [97, 98]. Así, el efecto proinflamatorio de NGAL inducido por los adEVs en cultivo podría también estar asociado a efectos dañinos en las células renales, como alteración de la vía MR, la homeostasis, inflamación, fibrosis, entre otros.

Este daño podría ser potenciado en un estado de obesidad, donde se aumenta el número de adipocitos en el organismo, y por lo que, se esperaría que la cantidad de adEVs en circulación también aumente y así, las interacciones adEVs-célula renal que generen efectos proinflamatorios. Este resultado es uno de los pocos que muestra una interesante asociación de comunicación entre el adipocito y la célula renal mediada por adEVs. Así, este trabajo de investigación es un aporte al entendimiento de la fisiopatología que se observa en la obesidad, producto de la comunicación celular entre tejido adiposo y renal mediada por vesículas extracelulares.

Estudios previos han demostrado que pacientes obesos muestran mayores niveles de EVs circulantes respecto a pacientes con un peso normal [99, 100]. Además, diversos descubrimientos indican que el nivel de EVs circulantes en la obesidad es modulado por cambios en la masa corporal del paciente, sugiriendo una relación entre EVs y el desarrollo de la fisiopatología asociada a la obesidad, además de un posible rol en el de comorbilidades asociadas a esta [100].

A la fecha existen evidencia preliminar que sugiere que los exosomas derivados del tejido adiposo contribuyen al desarrollo de trastornos metabólicos como la obesidad y la resistencia a la insulina mediante la regulación de tejidos de órganos distantes, como el hígado y el páncreas [101]. También, con respecto al rol de las adEVs en la fisiopatología renal, estudios recientes tanto *in vitro* como *in vivo*, demuestran un rol crucial de estas en el desarrollo de enfermedades renales, contribuyendo a cambios en la inmunomodulación, trombogénesis y en la matriz extracelular [102, 103]. Por otra parte, el rol de los EVs en el daño renal asociado a obesidad sigue siendo desconocido. Estudios como el de Liu y sus colaboradores [102], muestra que EVs plasmáticas provenientes de sujetos obesos participan en la activación del eje renina-angiotensina-aldosterona y producen daño tubular renal en células epiteliales del túbulo renal.

Además, la liberación de agentes proinflamatorios por parte del tejido renal, inducido por las adEVs, podría desencadenar una reacción inflamatoria al entrar en contacto con células del sistema inmune vecinas como macrófagos o linfocitos, lo que podría potenciar el efecto inflamatorio local [104].

Con respecto a la respuesta fibrótica del cultivo luego de adicionar adEVs por 24 horas, se logra observar que el estímulo logra generar una tendencia al aumento en la expresión de COL1A1 y CTGF, pero sin diferencias estadísticas significativas. En cambio, la expresión de fibronectina (FN1) se mantiene invariable. Este resultado entrega indicios que las adEVs podrían aportar al aumento en la expresión de factores fibróticos de las células renales, sin embargo, la presencia de otros factores como el tiempo del estímulo, la dosis o carga de adEVs y el microambiente celular parecieran ser necesarios para lograr la progresión de la fibrosis, lo cual ha sido reportado tanto en patología humana como efecto de la condición inflamatoria crónica, como en patología renal crónica [101].

Con respecto a la relación entre las adEVs y su capacidad de generar un estado fibrótico en el tejido renal, no existen otros estudios que describan esta interacción en específico. Sin embargo, existe información sobre la comunicación entre el tejido renal y las vesículas extracelulares derivadas de este mismo, jugando un papel esencial en la comunicación tubulointersticial del órgano durante la fibrosis renal. Esto ya que las células renales lesionadas pueden transferir EVs que transportan una variedad de moléculas a las células receptoras, por lo que participan activamente en la inflamación y fibrosis renal [105, 106].

Así, se puede confirmar que la comunicación mediada por vesículas extracelulares si tiene un impacto sobre el fenotipo del tejido renal y son un mecanismo de comunicación importante en este. Así, se puede inferir que las adEVs si pueden ser consideradas como un elemento comunicación de importancia en el tejido renal, ya que este es capaz de incorporar y alterar su fenotipo cuando entra en contacto con otras EVs.

Una de las preguntas que se pueden generar a partir de los resultados obtenidos, es cómo estas vesículas que son derivadas de adipocitos, a los cuales no se les indujo un efecto inflamatorio o fibrótico de manera externa, serían capaces de generar variaciones en la expresión génica en la célula renal. Según lo reportado previamente en bibliografía, se ha podido identificar que las vesículas extracelulares son capaces de transportar un cargo que presenta similitudes a su célula de origen (Ej. adEVs pueden transportar adipocinas como adiponectina, FABP4, PLIN1 y PPAR-g [59]). AdEVs aisladas desde adipocitos SW872 pueden estimular o transferir información a las células blanco (HCD) asociadas a su composición como también sus biomoléculas cargo. El potencial impacto proinflamatorio de las adEVs en este modelo de estudio *in vitro* a un fenotipo más inflamatorio en las células renales HCD, pueden estar relacionadas a su proceso de diferenciación de 7 días, asociado al estrés mecánico producto del estrecho contacto célula-célula observado en confluencia del cultivo. Así también por el impacto que produce el cocktail de diferenciación adipogénica que puede generar variaciones en la expresión génica del cultivo y así, desarrollar una respuesta inflamatoria.

Es por ello que una de las preguntas derivadas de esta investigación es cual es la composición de las adEVs que genera un impacto sobre las células blanco. Para poder responder a esto sería lo ideal revelar mediante tecnología ómica la composición específica de biomoléculas (proteínas, miRNA, lípidos, etc) que son transportadas por las adEVs [18]. Otra interrogante que se genera a partir de la investigación realizada es si pudiese existir un efecto que sea diferente al observado en las células HCD luego de agregarles adEVs, si es que estas adEVs fueran derivadas de adipocitos que hayan sido previamente expuestas a un estímulo inflamatorio, como puede ser TNF- α , aldosterona, ácido palmítico, entre otros. Así se buscaría determinar si las adEVs de adipocitos estresados pudiesen generar un respuesta inflamatoria o fibrótica de mayor intensidad a la observada o no.

7.6. Estudio internalización de adEVs en la línea celular renal HCD

El estudio de incorporación de adEVs con reactivo fluorescente PKH67 marcó efectiva y únicamente las vesículas extracelulares aisladas y no otro componente de la muestra. Las adEVs fueron captadas e internalizadas eficientemente y se localizaron en el citoplasma de las células HCD. Estudios posteriores deben realizarse para confirmar el o los organelo subcelulares involucrados en esta acción de internalización y evaluar como la célula incorpora el cargo del adEV en su interior luego de que esta interactué con la membrana plasmática.

7.7. Limitaciones y proyecciones del estudio

1. El tiempo de adición de las adEVs que se utilizó en esta experimentación. Para diseñar este procedimiento se realizó una búsqueda bibliográfica para poder determinar el tiempo necesario para obtener valores significativos de la expresión génica tras el tratamiento con EVs. Así se llegó al tiempo de 24 horas, que es un tiempo estándar de evaluación para este tipo de experimentación. Sin embargo, los tiempos de exposición y de respuesta pueden ser distintos a los utilizados en la metodología, así la muestra de RNA obtenida podría no ser la más representativa del efecto que tienen las adEVs sobre el cultivo.
Para poder determinar a qué tiempo de exposición se podría obtener un resultado más representativo del efecto, se podrían a futuro realizar experimentos de evaluación de curvas de tiempo de las adEVs en las células renales HCD. Así, se podría determinar el tiempo de exposición adecuado para obtener resultado de expresión adecuados.
2. La concentración de adEVs utilizadas también es un factor que debe ser considerado en el momento de analizar los resultados. La concentración de 1.000 adEVs por célula renal es un valor que se estimó en base a bibliografía, pero podría no ser una concentración representativa a lo que ocurra realmente en el organismo humano ya que no se encontraron estudios previos con un valor estudiado. Así, una sobre estimulación con adEVs podría estar generando el efecto inflamatorio/fibrótico observado. Como proyección a la experimentación, se podría evaluar a futuro el efecto de distintas concentraciones de adEVs por célula para lograr comprobar el efecto de esta variable de estudio.

3. En este estudio, se utilizaron adEVs aislados desde cultivos de adipocitos a los cuales no se les administró de manera externa ningún agente proinflamatorio o de estrés celular. Esto con el objetivo de determinar si los adipocitos, en un estado basal y considerando únicamente el estrés asociado a la diferenciación celular, podían generar una respuesta inflamatoria y/o fibrótica en células renales HCD. Efectos que podrían ser potenciados cuando existe un mayor número de adipocitos en el organismo y/o la presencia de un agente proinflamatorio en el tejido adiposo, como TNF- α , interleucinas, entre otras, tal como se observa en un cuerpo obeso.
4. Los marcadores utilizados, si bien, los que fueron evaluados en la experimentación realizada presentaron variaciones luego de la administración de las vesículas al cultivo, podrían existir otros marcadores de daño renal que entreguen más información sobre el efecto del estímulo en el cultivo. Por ello, a futuro, se podría ampliar la búsqueda bibliográfica sobre marcadores de daño renal y aumentar el número de marcadores a utilizar para determinar de manera más precisa el efecto de las adEVs.
5. El diseño de la experimentación basado en un tipo celular, el presente estudio evaluó el efecto de las vesículas extracelulares derivadas únicamente de adipocitos. Es necesario recordar que el tejido adiposo está conformado por más tipos celulares como preadipocitos o células del sistema inmune como lo son los macrófagos o linfocitos. Así, estos tipos celulares también podrían estar liberando, de manera simultánea, vesículas extracelulares que tendrían la facultad de cargar factores inflamatorios y/o fibróticos que causen efectos en la expresión génica de células del tejido renal en conjunto a las adEVs. Con respecto a las células renales, este estudio evaluó este efecto únicamente en células derivadas de una porción del riñón humano, en específico, del túbulo colector de este, el cual tiene un gran impacto en la reabsorción y secreción de sustancias del organismo que pueden incrementar el transporte de sodio, aumentar la captación de agua, el volumen sanguíneo y, con esto, elevar la presión arterial [26]. Así, tiene una gran relación con el desarrollo y progresión de hipertensión arterial, una de las enfermedades que se relaciona a la obesidad.
6. Uso de co-cultivos; Para lograr evaluar el efecto inflamatorio y/o fibrótico del conjunto de las EVs derivadas del tejido adiposo, es decir, considerando todos los tipos celulares que lo componen, se podría utilizar co-cultivos de células del tejido adiposo u organoides de este. Esto para obtener EVs derivadas desde estos tipos de cultivos *ex vivo* y adicionarlas a células de tejido renal para evaluar su efecto en este.

7.8. Impacto del estudio realizado

Como se mencionó, el estudio realizado fue capaz de determinar que las adEVs son capaces de generar alteraciones en el fenotipo de expresión génica de las células renales HCD, donde se destaca el aumento en la expresión relativa de la interleucina proinflamatoria IL-1B. Así, se muestra que existe una asociación de gran interés entre el células adiposas y las células renales que es mediada por vesículas extracelulares de adipocitos y, que es capaz de causar un efecto proinflamatorio en la célula diana.

Los resultados obtenidos en este trabajo de investigación son una primera aproximación al entendimiento y la comprensión de la fisiopatología renal que se observa en la obesidad, en específico, de la que puede ser causada por la comunicación celular mediada por vesículas extracelulares derivadas de los adipocitos del tejido adiposo.

En la actualidad, la bibliografía asociada a este tema no es abundante ya que el área de trabajo no ha sido ampliamente estudiada. Existe un bajo número de publicaciones que relacionan el tejido adiposo, renal, adipocitos, células renales y adEVs. Así, este trabajo y sus resultados representan información que es novedosa en el área de estudio y que abre las puertas al desarrollo de más investigaciones relacionadas a identificar el rol y efecto que las adEVs pueden tener sobre células renales u otros tipos celulares de interés, como lo puede ser los derivados de corazón, hígado, páncreas, entre otros. Esto con el objetivo de determinar cuál es el rol que la comunicación celular mediada por vesículas extracelulares puede tener sobre los distintos tejidos del organismo.

Este tipo de investigación y otras asociadas al tema pueden ser utilizadas en el futuro para el desarrollo de nuevas tecnologías y/o estrategias que permitan detectar o enfrentar el daño generado en distintos órganos que podría no ser detectado fácilmente cuando existe un perfil obeso prolongado en el individuo. En relación con lo estudiado y mencionado previamente, las vesículas extracelulares podrían ser utilizadas como biopsias líquidas no invasivas que permitan diagnosticar y/o evaluar el estado de avance de una enfermedad o, ser utilizadas como una terapia de reparación, transportando factores terapéuticos dirigidos de manera específica a tejidos dañados y promover la recuperación de este.

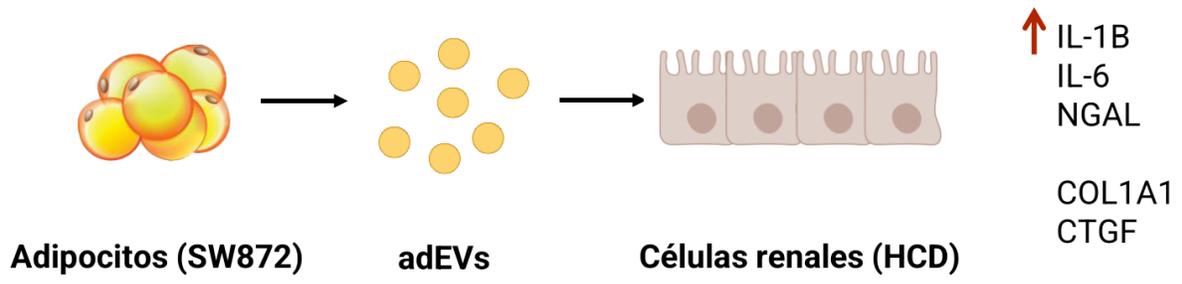


Figura 29: Diagrama general que resume la acción de las adEVs generadas desde adipocitos y su impacto en las células renales HCD en el modelo *in vitro* utilizado en este estudio.

8. CONCLUSIONES

1. Se caracterizó el proceso de adipogénesis en la línea celular humana de preadipocitos SW872 según su morfología, la formación de la gota lipídica adiposa y la presencia de marcadores específicos de adipogénesis durante el periodo de diferenciación *in vitro* del cultivo.
2. Se aisló y caracterizó de manera efectiva las vesículas extracelulares derivadas de cultivos de adipocitos (adEVs) diferenciados. Las adEVs aisladas mediante ultracentrifugación cumplieron las normativas impuestas por MISEV 2018 de tamaño, morfología y carga proteico, además de que se logró obtener una cantidad adecuada de adEVs para su utilización en el trabajo de investigación.
3. La adición de adEVs en células renales HCD generó variaciones en la expresión génica de factores inflamatorios y fibróticos, como IL-1B y también una tendencia al aumento de la expresión de los marcadores inflamatorios IL-6 y NGAL, y factores fibróticos, COL1A1 y CTGF.
4. Las adEVs marcadas fluorescentemente, son internalizadas por el cultivo renal HCD. Esto indica que las adEVs pueden transportar y entregar el cargo a las células renales y afectar su metabolismo o fenotipo.
5. El estudio realizado es uno de los pocos que muestra una interesante asociación de comunicación entre el adipocito y la célula renal mediada por adEVs. Así, es un aporte al entendimiento de la fisiopatología que se observa en la obesidad, producto de la comunicación celular entre tejido adiposo y renal mediada por vesículas extracelulares, que, a futuro, puede ser utilizado en el desarrollo de distintas tecnologías de tratamiento y diagnóstico de enfermedades.

BIBLIOGRAFÍA

1. Ceballos-Macías, J.J., et al., *Obesidad. Pandemia del siglo XXI*. Revista de sanidad militar, 2018. 72.
2. OMS, *Obesidad y sobrepeso*. 2021.
3. Richard, A.J., et al., *Adipose Tissue: Physiology to Metabolic Dysfunction*, in *Endotext*, K.R. Feingold, et al., Editors. 2000: South Dartmouth (MA).
4. MINSAL, *Encuesta nacional de salud 2016-2017. Primeros resultados*. 2017, Departamento de Epidemiología.
5. Hruby, A. and F.B. Hu, *The Epidemiology of Obesity: A Big Picture*. *Pharmacoeconomics*, 2015. 33(7): p. 673-89.
6. Esteve Ràfols, M., *Tejido adiposo: heterogeneidad celular y diversidad funcional*. *Endocrinología y Nutrición*, 2014. 61(2): p. 100-112.
7. Ghaben, A.L. and P.E. Scherer, *Adipogenesis and metabolic health*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2019. 20(4): p. 242-258.
8. Sánchez-Muñoz, F., et al., *Adipocinas, tejido adiposo y su relación con células del sistema inmune*. 2005. 141(6).
9. Vega-Robledo, G.B. and M.G. Rico-Rosillo, *[Adipose tissue: immune function and alterations caused by obesity]*. *Rev Alerg Mex*, 2019. 66(3): p. 340-353.
10. Cinti, S., *White, brown, beige and pink: A rainbow in the adipose organ*. *Current Opinion in Endocrine and Metabolic Research*, 2019. 4: p. 29-36.
11. McLaughlin, T., et al., *Enhanced proportion of small adipose cells in insulin-resistant vs insulin-sensitive obese individuals implicates impaired adipogenesis*. *Diabetologia*, 2007. 50(8): p. 1707-15.
12. Yang, J., et al., *The size of large adipose cells is a predictor of insulin resistance in first-degree relatives of type 2 diabetic patients*. *Obesity (Silver Spring)*, 2012. 20(5): p. 932-8.
13. Meyer, L.K., et al., *Adipose tissue depot and cell size dependency of adiponectin synthesis and secretion in human obesity*. *Adipocyte*, 2013. 2(4): p. 217-26.
14. Bambace, C., et al., *Adiponectin gene expression and adipocyte diameter: a comparison between epicardial and subcutaneous adipose tissue in men*. *Cardiovasc Pathol*, 2011. 20(5): p. e153-6.
15. Laurencikiene, J., et al., *Regulation of lipolysis in small and large fat cells of the same subject*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2011. 96(12): p. E2045-9.
16. Skurk, T., et al., *Relationship between adipocyte size and adipokine expression and secretion*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2007. 92(3): p. 1023-33.
17. Antonio, C., et al., *Mecanismos moleculares de la obesidad y el rol de las adipocinas en las enfermedades metabólicas*. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédica*, 2016. 35(2): p. 174-183.

18. Camino, T., et al., *Human obese white adipose tissue sheds depot-specific extracellular vesicles and reveals candidate biomarkers for monitoring obesity and its comorbidities*. *Transl Res*, 2022. 239: p. 85-102.
19. Li, F., et al., *Myokines and adipokines: Involvement in the crosstalk between skeletal muscle and adipose tissue*. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 2017. 33: p. 73-82.
20. Sabaratnam, R. and P. Svingen, *Adipocyte-Endothelium Crosstalk in Obesity*. 2021. 12.
21. Li, C., et al., *Crosstalk between adipose tissue and the heart: An update*. *Journal of Translational Internal Medicine*, 2022. 10(3): p. 219-226.
22. Karava, V., et al., *Update on the Crosstalk Between Adipose Tissue and Mineral Balance in General Population and Chronic Kidney Disease*. 2021. 9.
23. García-García, I., et al., *Mechanisms linking obesity and its metabolic comorbidities with cerebral grey and white matter changes*. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*, 2022. 23(4): p. 833-843.
24. Antonio, A.L., *El sobrepeso y la obesidad como un problema de salud*. *Revista Médica Clínica Las Condes*, 2012. 23(2): p. 145-153.
25. Noboa, O., et al., *Hipertensión arterial y riñón* %J *Revista Uruguaya de Cardiología*. 2012. 27: p. 406-412.
26. Barros, E.R. and C.A. Carvajal, *Urinary Exosomes and Their Cargo: Potential Biomarkers for Mineralocorticoid Arterial Hypertension?* *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2017. 8: p. 230.
27. Kovesdy, C.P., S. Furth, and C. Zoccali, *Obesidad y enfermedad renal: consecuencias ocultas de la epidemia*. *Nefrología*, 2017. 37(4): p. 360-369.
28. Furukawa, S., et al., *Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome*. *Journal of Clinical Investigation*, 2004. 114(12): p. 1752-1761.
29. Ruan, X.Z., Z. Varghese, and J.F. Moorhead, *An update on the lipid nephrotoxicity hypothesis*. *Nature Reviews Nephrology*, 2009. 5(12): p. 713-721.
30. Ruster, C. and G. Wolf, *The Role of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System in Obesity-Related Renal Diseases*. *Seminars in Nephrology*, 2013. 33(1): p. 44-53.
31. Oterdoom, L.H., et al., *Fasting insulin modifies the relation between age and renal function*. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 2007. 22(6): p. 1587-1592.
32. Sharma, K., *The link between obesity and albuminuria: adiponectin and podocyte dysfunction*. *Kidney International*, 2009. 76(2): p. 145-148.
33. Wolf, G. and F.N. Ziyadeh, *Leptin and renal fibrosis*. *Contrib Nephrol*, 2006. 151: p. 175-183.
34. Ellington, A.A., et al., *Association of Plasma Resistin With Glomerular Filtration Rate and Albuminuria in Hypertensive Adults*. *Hypertension*, 2007. 50(4): p. 708-714.
35. Kwan, H.Y., et al., *The impact of obesity on adipocyte-derived extracellular vesicles*. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 2021. 78(23): p. 7275-7288.

36. Nhlbi Obesity Education Initiative Expert Panel on the Identification, E. and A. Treatment of Obesity in, *Clinical Guidelines on the Identification, Evaluation, and Treatment of Overweight and Obesity in Adults*. 1998.
37. CDC, *Acerca del índice de masa corporal para adultos | Peso saludable | DNPAO | CDC*. 2022.
38. Hernández Rodríguez, J., O.M. Moncada Espinal, and Y.A. Domínguez, *Utilidad del índice cintura/cadera en la detección del riesgo cardiometabólico en individuos sobrepesos y obesos %J Revista Cubana de Endocrinología*. 2018. 29: p. 1-16.
39. Baudrand, R., et al., *The estimation of visceral adipose tissue with a body composition monitor predicts the metabolic syndrome*. *J Hum Nutr Diet*, 2013. 26 Suppl 1: p. 154-8.
40. Castillo-Castellanos, R., et al., *Tratamiento quirúrgico de la obesidad y control de peso*. *Salud en Tabasco*, 2004. 10(2): p. 233-242.
41. Puente, J.S., et al. *Obesidad mórbida, síndrome metabólico y cirugía bariátrica: Revisión de la literatura*. 2012.
42. Macêdo, A.P.A., et al., *Liraglutide and Exercise: A Possible Treatment for Obesity? Obesity*, 2022. 2(3): p. 285-291.
43. Dailey, M.J. and T.H. Moran, *Glucagon-like peptide 1 and appetite*. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 2013. 24(2): p. 85-91.
44. Bergmann, N.C., et al., *Semaglutide for the treatment of overweight and obesity: A review*. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, 2023. 25(1): p. 18-35.
45. Alruwaili, H., B. Dehestani, and C.W. Le Roux, *Clinical Impact of Liraglutide as a Treatment of Obesity*. *Clinical Pharmacology: Advances and Applications*, 2021. Volume 13: p. 53-60.
46. Seo, Y.-G., *Side Effects Associated with Liraglutide Treatment for Obesity as Well as Diabetes*. *Journal of Obesity & Metabolic Syndrome*, 2021. 30(1): p. 12-19.
47. Consoli, A. and G. Formoso, *Potential side effects to GLP-1 agonists: understanding their safety and tolerability*. *Expert Opin Drug Saf*, 2015. 14(2): p. 207-18.
48. Beraldo Dos Santos Silva, D., et al., *Biotecnología aplicada a la alimentación y salud humana*. *Revista chilena de nutrición*, 2012. 39(3): p. 94-98.
49. Monteiro, M.P., *Obesity vaccines*. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 2014. 10(4): p. 887-895.
50. Shao, H., et al., *New Technologies for Analysis of Extracellular Vesicles*. *Chem Rev*, 2018. 118(4): p. 1917-1950.
51. van Niel, G., G. D'Angelo, and G. Raposo, *Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2018. 19(4): p. 213-228.
52. Colombo, M., G. Raposo, and C. Thery, *Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles*. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2014. 30: p. 255-89.
53. Lo Cicero, A., P.D. Stahl, and G. Raposo, *Extracellular vesicles shuffling intercellular messages: for good or for bad*. *Curr Opin Cell Biol*, 2015. 35: p. 69-77.

54. Yáñez-Mó, M., et al., *Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions*. Journal of Extracellular Vesicles, 2015. 4(1): p. 27066.
55. Wu, Y., et al., *Metabolomics of Extracellular Vesicles: A Future Promise of Multiple Clinical Applications*. International Journal of Nanomedicine, 2022. Volume 17: p. 6113-6129.
56. Beit-Yannai, E., S. Tabak, and W.D. Stamer, *Physical exosome:exosome interactions*. Journal of Cellular and Molecular Medicine, 2018. 22(3): p. 2001-2006.
57. Doyle, L. and M. Wang, *Overview of Extracellular Vesicles, Their Origin, Composition, Purpose, and Methods for Exosome Isolation and Analysis*. Cells, 2019. 8(7): p. 727.
58. Pegtel, D.M. and S.J. Gould, *Exosomes*. Annu Rev Biochem, 2019. 88: p. 487-514.
59. Carracedo, J., et al., *Role of microvesicles as biomarkers and future pharmacology targets of cardiovascular diseases (Papel de las microvesículas como biomarcadores y futuras dianas farmacológicas de enfermedades cardiovasculares)*. Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia, 2018. 84.
60. Zarovni, N., et al., *Integrated isolation and quantitative analysis of exosome shuttled proteins and nucleic acids using immunocapture approaches*. Methods, 2015. 87: p. 46-58.
61. Zaborowski, M.P., et al., *Extracellular Vesicles: Composition, Biological Relevance, and Methods of Study*. Bioscience, 2015. 65(8): p. 783-797.
62. Dragovic, R.A., et al., *Sizing and phenotyping of cellular vesicles using Nanoparticle Tracking Analysis*. Nanomedicine, 2011. 7(6): p. 780-8.
63. MalvernPanalytical, *NanoSight NS300*.
64. Rome, S., A. Blandin, and S.L. Lay, *Adipocyte-Derived Extracellular Vesicles: State of the Art*. International journal of molecular sciences, 2021. 22(4): p. 1-19.
65. Gao, X., C. Salomon, and D.J. Freeman, *Extracellular Vesicles from Adipose Tissue-A Potential Role in Obesity and Type 2 Diabetes?* Front Endocrinol (Lausanne), 2017. 8: p. 202.
66. Villarroel Heise, P., *Receptor sensor de calcio (CaSR) y disfunción del tejido adiposo: diferenciación, señalización de insulina, almacenamiento de triglicéridos, expresión de adipoquinas y manejo de triglicéridos en el hígado*. 2016, Universidad de Chile.
67. Zhao, X., et al., *A comparison of methods for effective differentiation of the frozen-thawed 3T3-L1 cells*. Analytical Biochemistry, 2019. 568: p. 57-64.
68. Boucher, J., et al., *Differential Roles of Insulin and IGF-1 Receptors in Adipose Tissue Development and Function*. Diabetes, 2016. 65(8): p. 2201-13.
69. Scott, M.A., et al., *Current Methods of Adipogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells*. Stem Cells and Development, 2011. 20(10): p. 1793-1804.
70. Salaszyk, R.M., et al., *Focusing of gene expression as the basis of stem cell differentiation*. Stem Cells Dev, 2005. 14(6): p. 608-20.
71. Klees, R.F., et al., *Laminin-5 activates extracellular matrix production and osteogenic gene focusing in human mesenchymal stem cells*. Matrix Biology, 2007. 26(2): p. 106-114.

72. Kim, S.P., et al., *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. 399(1): p. 55-9.
73. Cao, Z., R.M. Umek, and S.L. McKnight, *Regulated expression of three C/EBP isoforms during adipose conversion of 3T3-L1 cells*. *Genes Dev*, 1991. 5(9): p. 1538-52.
74. Kraus, N.A., et al., *Quantitative assessment of adipocyte differentiation in cell culture*. *Adipocyte*, 2016. 5(4): p. 351-358.
75. Du, J., et al., *An optimized method for Oil Red O staining with the salicylic acid ethanol solution*. *Adipocyte*, 2023. 12(1).
76. Thery, C., et al., *Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines*. *J Extracell Vesicles*, 2018. 7(1): p. 1535750.
77. Lombi, F., et al., *Biomarcadores en la lesión renal aguda: ¿ paradigma o evidencia?* *Nefrología*, 2016. 36(4): p. 339-346.
78. Liu, T., et al., *Molecular Serum Markers of Liver Fibrosis*. *Biomarker Insights*, 2012. 7: p. BMI.S10009.
79. Lopes, T.G., et al., *Markers of renal fibrosis: How do they correlate with podocyte damage in glomerular diseases?* *PLOS ONE*, 2019. 14(6): p. e0217585.
80. Lipson, K.E., et al., *CTGF is a central mediator of tissue remodeling and fibrosis and its inhibition can reverse the process of fibrosis*. *Fibrogenesis & Tissue Repair*, 2012. 5(S1): p. S24.
81. María Alejandra, C., C. Doris Gómez, and A. Claudio Gómez, *Adipogénesis in vitro de células 3T3-L0000001*. 2007.
82. Durcin, M., et al., *Characterisation of adipocyte-derived extracellular vesicle subtypes identifies distinct protein and lipid signatures for large and small extracellular vesicles*. *Journal of extracellular vesicles*, 2017. 6(1).
83. Connolly, K.D., et al., *Characterisation of adipocyte-derived extracellular vesicles released pre-and post-adipogenesis*. *Journal of Extracellular Vesicles*, 2015.
84. Connolly, K.D., et al., *Evidence for Adipocyte-Derived Extracellular Vesicles in the Human Circulation*. *Endocrinology*, 2018. 159(9): p. 3259-3267.
85. Santamaria-Martos, F., et al., *Comparative and functional analysis of plasma membrane-derived extracellular vesicles from obese vs. nonobese women*. *Clin Nutr*, 2020. 39(4): p. 1067-1076.
86. Al-Nedawi, K., B. Meehan, and J. Rak, *Microvesicles: Messengers and mediators of tumor progression*. *Cell Cycle*, 2009. 8(13): p. 2014-2018.
87. Alvarez-Llamas, G., et al., *Recent advances in atherosclerosis-based proteomics: new biomarkers and a future perspective*. *Expert Rev Proteomics*, 2008. 5(5): p. 679-91.
88. Simpson, R.J., et al., *Exosomes: proteomic insights and diagnostic potential*. *Expert Rev Proteomics*, 2009. 6(3): p. 267-83.

89. Zhou, H., et al., *Exosomal Fetuin-A identified by proteomics: a novel urinary biomarker for detecting acute kidney injury*. *Kidney Int*, 2006. 70(10): p. 1847-57.
90. Tansey, J.T., et al., *The central role of perilipin a in lipid metabolism and adipocyte lipolysis*. *IUBMB Life*, 2004. 56(7): p. 379-85.
91. Cordonier, E.L., et al., *Inhibition of acetyl-CoA carboxylases by soraphen A prevents lipid accumulation and adipocyte differentiation in 3T3-L1 cells*. *Eur J Pharmacol*, 2016. 780: p. 202-8.
92. Berndt, J., et al., *Fatty acid synthase gene expression in human adipose tissue: association with obesity and type 2 diabetes*. *Diabetologia*, 2007. 50(7): p. 1472-80.
93. Felix, J.B., A.R. Cox, and S.M. Hartig, *Acetyl-CoA and Metabolite Fluxes Regulate White Adipose Tissue Expansion*. *Trends Endocrinol Metab*, 2021. 32(5): p. 320-332.
94. Furuhashi, M., et al., *Fatty Acid-Binding Protein 4 (FABP4): Pathophysiological Insights and Potent Clinical Biomarker of Metabolic and Cardiovascular Diseases*. *Clin Med Insights Cardiol*, 2014. 8(Suppl 3): p. 23-33.
95. Stern, J.H., J.M. Rutkowski, and P.E. Scherer, *Adiponectin, Leptin, and Fatty Acids in the Maintenance of Metabolic Homeostasis through Adipose Tissue Crosstalk*. *Cell Metab*, 2016. 23(5): p. 770-84.
96. Achari, A. and S. Jain, *Adiponectin, a Therapeutic Target for Obesity, Diabetes, and Endothelial Dysfunction*. *International Journal of Molecular Sciences*, 2017. 18(6): p. 1321.
97. Tarjus, A., et al., *Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin, a Novel Mineralocorticoid Biotarget, Mediates Vascular Profibrotic Effects of Mineralocorticoids*. *Hypertension*, 2015. 66(1): p. 158-66.
98. Tapia-Castillo, A., et al., *The Expression of RAC1 and Mineralocorticoid Pathway-Dependent Genes are Associated With Different Responses to Salt Intake*. *Am J Hypertens*, 2015. 28(6): p. 722-8.
99. Eguchi, A., et al., *Circulating adipocyte-derived extracellular vesicles are novel markers of metabolic stress*. *Journal of Molecular Medicine*, 2016. 94(11): p. 1241-1253.
100. Pardo, F., et al., *Extracellular vesicles in obesity and diabetes mellitus*. *Mol Aspects Med*, 2018. 60: p. 81-91.
101. Mei, R., et al., *Role of Adipose Tissue Derived Exosomes in Metabolic Disease*. 2022. 13.
102. Liu, H.-H., et al., *miR-6869-5p Transported by Plasma Extracellular Vesicles Mediates Renal Tubule Injury and Renin-Angiotensin System Activation in Obesity*. 2021. 8.
103. Karpman, D., A.-L. Ståhl, and I. Arvidsson, *Extracellular vesicles in renal disease*. *Nature Reviews Nephrology*, 2017. 13(9): p. 545-562.
104. Imig, J.D. and M.J. Ryan, *Immune and Inflammatory Role in Renal Disease*. *Comprehensive Physiology*, 2013.
105. Jing, H., et al., *The role of extracellular vesicles in renal fibrosis*. *Cell Death & Disease*, 2019. 10(5).

106. Kosanović, M., et al., *Extracellular Vesicles and Renal Fibrosis: An Odyssey toward a New Therapeutic Approach*. International Journal of Molecular Sciences, 2021. 22(8): p. 3887.
107. Jiang, Y., et al., *Independent stem cell lineages regulate adipose organogenesis and adipose homeostasis*. Cell Rep, 2014. 9(3): p. 1007-22.
108. Vishvanath, L., et al., *Pdgfrbeta+ Mural Preadipocytes Contribute to Adipocyte Hyperplasia Induced by High-Fat-Diet Feeding and Prolonged Cold Exposure in Adult Mice*. Cell Metab, 2016. 23(2): p. 350-9.
109. Andersen, D.C., et al., *"The preadipocyte factor" DLK1 marks adult mouse adipose tissue residing vascular cells that lack in vitro adipogenic differentiation potential*. FEBS Lett, 2009. 583(17): p. 2947-53.
110. Hudak, C.S. and H.S. Sul, *Pref-1, a gatekeeper of adipogenesis*. Front Endocrinol (Lausanne), 2013. 4: p. 79.
111. Tontonoz, P., E. Hu, and B.M. Spiegelman, *Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR gamma 2, a lipid-activated transcription factor*. Cell, 1994. 79(7): p. 1147-56.
112. Barak, Y., et al., *PPAR gamma is required for placental, cardiac, and adipose tissue development*. Mol Cell, 1999. 4(4): p. 585-95.
113. Rosen, E.D., et al., *PPAR gamma is required for the differentiation of adipose tissue in vivo and in vitro*. Mol Cell, 1999. 4(4): p. 611-7.
114. Wu, Z., et al., *Cross-regulation of C/EBP alpha and PPAR gamma controls the transcriptional pathway of adipogenesis and insulin sensitivity*. Mol Cell, 1999. 3(2): p. 151-8.
115. Wu, Z., N.L. Bucher, and S.R. Farmer, *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): p. 4128-36.
116. Moraes-Vieira, P.M., A. Saghatelian, and B.B. Kahn, *GLUT4 Expression in Adipocytes Regulates De Novo Lipogenesis and Levels of a Novel Class of Lipids With Antidiabetic and Anti-inflammatory Effects*. Diabetes, 2016. 65(7): p. 1808-15.
117. Govers, R., *Molecular mechanisms of GLUT4 regulation in adipocytes*. Diabetes Metab, 2014. 40(6): p. 400-10.
118. Yue, R., et al., *Leptin Receptor Promotes Adipogenesis and Reduces Osteogenesis by Regulating Mesenchymal Stromal Cells in Adult Bone Marrow*. Cell Stem Cell, 2016. 18(6): p. 782-796.
119. Gonzales, A.M. and R.A. Orlando, *Role of adipocyte-derived lipoprotein lipase in adipocyte hypertrophy*. Nutr Metab (Lond), 2007. 4: p. 22.

ANEXOS

Anexo A. Marcadores de adipogénesis

A continuación, se presenta un listado de los distintos marcadores de adipogénesis que se utilizan para definir el estado de maduración de un adipocito durante el proceso.

Pueden separarse en tres categorías: 1) Precursor y preadipocito, 2) Diferenciación temprana y 3) Adipocito maduro.

Anexo A.1. Marcador del precursor (multipotent mesenchymal precursor) y preadipocito

aSMA (alfa smooth muscle actin): este gen codifica para actina de músculo liso involucrada en la regulación de la contractilidad vascular y la homeostasis de la presión arterial [7] [107].

Homo sapiens platelet derived growth factor receptor alpha (PDGFRA (alfa)): este gen codifica para una tirosina quinasa de superficie celular para miembros de la familia de platelet-derived growth factor. Estos factores de crecimiento son mitógenos de células de origen mesenquimal. La identidad del factor de crecimiento determina si este formará un homodímero o un heterodímero (compuesto de los polipéptidos PDGR alfa y beta). Estudios genéticos sugieren que este gen tiene un importante rol en la reparación de heridas, desarrollo de órganos y progresión tumoral [7, 107].

PDGFRB (beta): este gen codifica para una tirosina quinasa de superficie celular para miembros de la familia de platelet-derived growth factor. Estos factores de crecimiento son mitógenos de células de origen mesenquimal. Este gen es esencial en el correcto desarrollo del sistema cardiovascular y ayuda en la reorganización del citoesqueleto de actina [7, 107, 108].

Homo sapiens delta like non-canonical Notch ligand 1 (Pref-1/DLK1): Este gen codifica para una proteína de transmembrana que contiene múltiples repeticiones de factores de crecimiento epidérmico que funcionan como reguladores del crecimiento celular. La proteína, además, está envuelta en la diferenciación de varios tipos celulares, sobre todo de adipocitos [109, 110].

Anexo A.2. Marcador de diferenciación temprana

Peroxisome proliferator activated receptor gamma (PPARG): PPARs forman heterodímeros con Receptores de Retinoid X (RXRs) y estos heterodímeros regulan la transcripción de varios genes. La proteína codificada por PPARG regula la diferenciación de adipocitos. Regula, por ejemplo, la síntesis de adiponectina y FABP4. *Es el maestro regulador de adipogénesis* [7, 111-115].

CCAAT enhancer binding protein (CEBPs): este gen sin intrones codifica para un factor de transcripción que contiene un zipper básico de leucina (bZIP). Estos factores de transcripción son críticos para la diferenciación celular, función terminal y la respuesta inflamatoria. Fosforilación de CEBPA en su tirosina 222, 226 y en la serina 230 por parte de GSK-3 puede ser necesario para la adipogénesis [114, 115].

Adipocyte fatty-acid binding protein (FABP4; aP2): son una familia de proteínas citoplasmáticas que unen cadenas largas de ácidos grasos y otros ligandos hidrofóbicos. Se propone que tienen un rol en la toma de ácidos grasos, su transporte y metabolismo. Además, juegan un importante rol en el desarrollo de resistencia a la insulina, aterosclerosis y diabetes mellitus [94].

Solute carrier family 2 member 4 (SLC2A4) / insuline sensitive transporter (GLUT4): Este gen es miembro de la familia de transportadores de solutos 2 (facilitadores de transporte de glucosa) y codifica para una proteína facilitadora de transporte de glucosa regulado por insulina. En ausencia de insulina, esta proteína está secuestrada dentro de las células del tejido muscular y graso. En el momento en que existe estimulación por parte de la glucosa, esta proteína es enviada hacia la membrana celular y comienzan a transportar glucosa a través de la membrana [116, 117].

Anexo A.3. Marcador de adipocitos maduros

Adiponectina: gen expresado exclusivamente en adipocitos. Es una importante adipoquina envuelta en el control del metabolismo de grasas y la sensibilidad de insulina, con actividades antidiabéticas, anti-aterogénicas y antiinflamatorias. Estimula la fosforilación AMPK y activación en el hígado, en el músculo esquelético, mejorando la utilización de glucosa y la combustión de ácidos grasos [7, 13, 95].

Leptina (LEP): Es secretado por adipocitos blancos hacia la circulación y tienen un rol importante en la regulación de la homeostasis energética. La leptina circulante se une a receptores en el cerebro que activan una vía de señalización río abajo que inhiben la ingesta de alimentos y promueven el gasto energético. Además, su unión a estos receptores aumenta el output simpático para promover la lipólisis. *Mutaciones en este gen y en zonas regulatorias de este pueden provocar obesidad y obesidad mórbida con hipogonadismo en pacientes humanos* [7, 95, 118].

PNPLA2 patatin like phospholipase domain containing 2 (ATGL; PNPLA2): este gen codifica para una enzima que cataliza el primer paso de la hidrólisis de triglicéridos en tejido adiposo [7].

Perilipina 1 (PLIN 1): La proteína que codifica este gen se encarga de recubrir las gotas lipídicas en adipocitos, protegiéndola de lipasas hasta que se rompan por acción de la lipasa hormona sensitiva (LHS). Es una proteína quinasa c-AMP dependiente, que cuando está sin fosforilar puede jugar un importante rol en la inhibición de la lipólisis [7, 90].

Acetyl-CoA Carboxylase Alpha (ACACA): es un complejo multifuncional enzimático clave en la biosíntesis y oxidación de ácidos grasos. Es responsable de la carboxilación de acetyl-CoA a Malonil-CoA. ACACA es un objetivo potencial de drogas anti-obesidad [91].

Fatty acid synthase (FASN): cataliza la síntesis de ácidos grasos largos de acetyl-CoA y malonil-CoA. Cataliza la síntesis de palmitato a partir de acetyl-CoA y malonil-CoA, en la presencia de NADPH, en largas cadenas de ácidos grasos saturados [92].

Lipoprotein lipase (LPL): funciona como un homodímero y se expresa en el corazón, músculo y tejido graso. Tiene una función dual de hidrolasa de triglicéridos y como factor de ligando/puente para el uptake de lípidos mediado por receptores [7, 119].

Anexo B. Protocolo Ultracentrifugación

Con el objetivo de aislar vesículas extracelulares derivadas de adipocitos desde el medio de cultivo recolectado, se siguió el siguiente protocolo. Con este, se obtienen 300 [ul] desde un volumen inicial de 380 [ml] de medio de cultivo. El resumen del protocolo se muestra en la Figura 30.

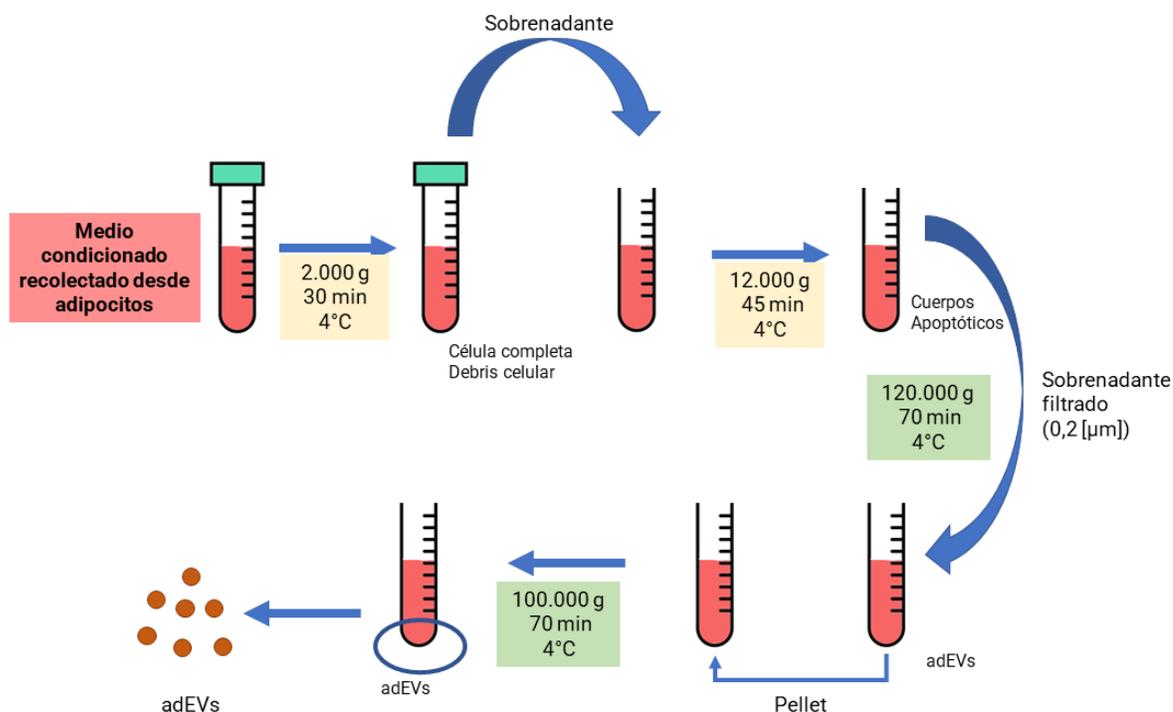


Figura 30: Diagrama resumen del protocolo de aislamiento de adEVs desde medio de cultivo.

Materiales:

- Tubos de 50 [ml]
- Centrífuga
- Ultracentrífuga Sorval™ WX+ Thermo Scientific
- Rotores SuperSpin 630 y TH-660
- Tubos de polialómero de 4,4 [ml] y 36 [ml] (“N°10509” y “N°79365” de Thermo Scientific)
- Pipetas
- Jeringas con émbolo de filtro de 200 [nm]

Reactivos:

- PBS
- PBS filtrado, libre de EVs

Procedimiento

- 1) En primer lugar, se distribuye el medio de cultivo en cuatro tubos de 50 [ml], buscando adicionar un volumen similar en todos los tubos.
- 2) Se centrifugan 2.000 g por 30 minutos a 4°C.
- 3) Se retira el sobrenadante y se deposita en cuatro tubos de 50 [mL] nuevos. Estos son masados para asegurar que tengan una masa similar. Si es necesario agregar volumen para igualar las masas, se utiliza PBS filtrado exclusivo para EVs.
- 4) Se centrifugan los sobrenadantes a 12.000g por 45 minutos a 4°C.
- 5) Se extrae el sobrenadante y es filtrado utilizando jeringas con émbolo de filtro. El líquido filtrado se lleva a los tubos de polialómero de 36 [mL] que la ultracentrífuga maneja.
- 6) Se engrasan los buckets y tapas que la ultracentrífuga utiliza y se busca que estos tengan una masa similar, que no supere una diferencia de 0,005 [g]. Si es necesario agregar volumen para igualar las masas, se utiliza PBS filtrado exclusivo para EVs.
- 7) Se ultracentrífuga a 120.000g por 70 minutos a 4°C.
- 8) Se elimina el sobrenadante del tubo y el pellet es resuspendido en 1 [mL] de PBS filtrado. Se realiza un vortex de las muestras y se extrae todo el contenido de los tubos.
- 9) El líquido extraído se lleva a tubos de polialómero limpios de 4,4 [mL]. Se engrasan los buckets y las tapas correspondientes a los tubos de 4,4 [mL]
- 10) Se masan los tubos junto a sus buckets y tapas para asegurar una correcta distribución de masa en la ultracentrífuga. Si es necesario añadir volumen para igualar las masas, se utiliza PBS filtrado. La diferencia entre masas no debe ser mayor a 0,005 [g]

- 11) Se ultracentrífuga a 100.000g por 70 minutos a 4°C.
- 12) Se extrae el sobrenadante y el pellet es resuspendido en 300 µL de PBS filtrado.
- 13) Se realiza un vortex de la muestra y esta puede ser tratada para analizar de manera inmediata o puede ser almacenada a -80°C.