



UNIVERSIDAD DE CHILE
DOCTORADO EN NUTRICIÓN Y ALIMENTOS



**Receptor sensor de calcio (CaSR) y disfunción del
tejido adiposo: diferenciación, señalización de
insulina, almacenamiento de triglicéridos,
expresión de adipocinas y manejo de triglicéridos
en el hígado**

**TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE
DOCTOR EN NUTRICIÓN Y ALIMENTOS**

Programa conjunto

Facultad de Ciencias Agronómicas, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Facultad
de Medicina, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias e Instituto de Nutrición y Tecnología
de los Alimentos

Por Pía Villarroel Heise

Director de Tesis: Dra. Mariana Cifuentes Köster

LABORATORIO DE NUTRICIÓN BÁSICA Y EPIDEMIOLOGÍA GENÉTICA

SANTIAGO - CHILE

2016

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

**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**

Por

Pía Villarroel Heise

**Tesis presentada como parte de los requisitos para optar al grado académico de
Doctor en Nutrición y Alimentos**

COMITÉ DE TESIS

DIRECTOR DE TESIS

FIRMA DEL DIRECTOR DE TESIS

DRA. MARIANA CIFUENTES KÖSTER

COMISIÓN INFORMANTE DE TESIS

DR. FRANCISCO PEREZ BRAVO

DR. VÍCTOR CORTÉS MORA

DR. DIEGO GARCÍA DÍAZ

DR. MIGUEL LLANOS SILVA

Santiago, Octubre de 2016

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

FINANCIAMIENTO

PROYECTOS FONDECYT 1110157 y 1150651 DRA.MARIANA CIFUENTES

BECA CONICYT 21120167 PIA VILLARROEL

PROYECTO SOCHED 2013-04 PIA VILLARROEL

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

*A mis padres Sergio y María Angélica,
por su incondicionalidad y genuino amor.
A mi marido Andrés por acompañarme
fielmente durante todo este proceso de
formación profesional*

INDICE GENERAL

TÍTULO	2
ÍNDICE GENERAL	5
ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS	9
LISTA DE ABREVIATURAS	11
RESUMEN	13
I. INTRODUCCIÓN	
I.1.- Aspectos generales	14
I.2.- Receptor Sensor de Calcio (CaSR)	16
I.2.1.- Cinacalcet, aspectos farmacológicos y clínicos.....	17
I.2.2.- Activación del CaSR, señalización intracelular	18
I.3.- La activación del CaSR podría comprometer la funcionalidad del tejido adiposo	19
I.4.- Adipogénesis en el tejido adiposo: diferenciación de preadipocitos	20
I.4.1.- Receptor activado por proliferadores de peroxisomas γ (PPAR γ)	21
I.4.2.- Glicerol 3 fosfato deshidrogenasa (GPD)	22
I.4.3.- Lipasa de lipoproteínas (LPL)	22
I.4.4.- Sintasa de ácidos grasos (FAS)	23
I.5.- Señalización de insulina en el tejido adiposo: homeostasis de glucosa	24
I.5.1.- Activación del receptor de insulina, señalización intracelular	24
I.5.2.- Activación de Akt / PKB	25
I.5.3.- La activación del CaSR podría comprometer la señalización de insulina	26
I.6.- Actividad endocrina en el tejido adiposo: producción de factores de secreción ...	27
I.6.1.- Leptina	28
I.6.2.- Adiponectina	29
I.6.3.- Proteína de unión de ácidos grasos 4 (FABP4)/ aP2	30
I.7.- Almacenamiento de triglicéridos en el tejido adiposo y hepático: lipogénesis	31
I.7.1.- Lipogénesis adiposa	31
I.7.2.- Lipogénesis hepática	32
I.7.2.1.- Proteína 1c ligante al elemento regulador de esteroides (SREBP-1c)	33
I.7.2.2.- Diacilglicérido aciltransferasa 1 y 2 (DGAT1/2)	33
I.8.- Formulación del problema	34

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

II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

II.1.- Hipótesis	36
II.2.- Objetivo General	37
II.3.- Objetivos Específicos	37

III. MATERIALES Y MÉTODOS

III.1.- Línea celular LS14	39
III.2.- Explantes de tejido adiposo humano y cultivos de adipocitos humanos primarios.....	39
III.2.1.- Sujetos	39
III.2.2.- Obtención y cultivo de preadipocitos a partir de explantes de tejido adiposo ..	39
III.2.3.- Obtención de adipocitos aislados del tejido adiposo	40
III.3.- Diferenciación adipogénica	40
III.4.- Línea celular HepG2	40
III.5.- Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR)	41
III.6.- RT-PCR y electroforesis en gel de agarosa	41
III.7.- Cuantificación del contenido de triglicéridos por fluorimetría	42
III.8.- Tinción con Oil Red O	42
III.9.- Evaluación de la viabilidad celular	42
III.10.- Evaluación de la expresión de proteínas	43
III.10.1.- Obtención de lisado celular	43
III.10.2.- Western Blot	43
III.11.- Análisis estadístico de los datos	44

IV. RESULTADOS

IV.1.- Evaluación del efecto de la activación del CaSR sobre la diferenciación adipogénica	45
IV.1.1.- Diferenciación de células LS14	45
IV.1.2.- Efecto de la activación del CaSR sobre la respuesta adipogénica en preadipocitos de la línea celular LS14	48
IV.1.3.- Efecto de la activación del CaSR sobre la respuesta adipogénica en preadipocitos derivados de tejido adiposo humano	49
IV.2.- Evaluación del efecto de la activación del CaSR sobre la señalización de insulina.....	50

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

IV.3.- Evaluación del efecto de la activación del CaSR sobre el manejo de triglicéridos en adipocitos	52
IV.3.1- Efecto de la activación del CaSR sobre el contenido intracelular de triglicéridos en la línea celular LS14	52
IV.3.2.- Efecto de la activación del CaSR sobre la expresión de marcadores lipogénicos en la línea celular LS14	54
IV.3.3.- Asociación entre la expresión de marcadores lipogénicos en la adipocitos LS14 ante la exposición a cinacalcet	55
IV.4.- Evaluación del efecto de la activación del CaSR sobre actividad secretora	56
IV.4.1.- Efecto de la activación del CaSR sobre la expresión génica de aP2, leptina y adiponectina en la línea celular LS14	56
IV.4.2.- Asociación entre la expresión de adiponectina y marcadores lipogénicos en adipocitos LS14 ante la exposición a cinacalcet	58
IV.5.- Evaluación del efecto de la activación del CaSR sobre el manejo de triglicéridos en hepatocitos	59
IV.5.1.- Identificación del CaSR en células hepáticas humanas	59
IV.5.2.- Viabilidad de células HepG2	60
IV.5.3.- Efecto del ácido oleico sobre el contenido de triglicéridos intracelulares en células HepG2	61
IV.5.4.- Evaluación el efecto de la activación del CaSR sobre el contenido de triglicéridos en la línea celular HepG2	62
IV.5.5.- Efecto de la activación del CaSR sobre la expresión de genes lipogénicos en la línea celular HepG2	63

V. DISCUSIÓN

V.1.- Efecto de la activación del CaSR sobre la diferenciación adipogénica	64
V.2.- Efecto de la activación del CaSR sobre la señalización de insulina en adipocitos.....	65
V.3.- Efecto de la activación del CaSR sobre el manejo de triglicéridos en adipocitos.....	67
V.4.- Efecto de la activación del CaSR sobre genes relacionados con la actividad secretora en adipocitos	69
V.5.- Efecto de la activación del CaSR sobre el manejo de triglicéridos en hepatocitos.....	71

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

V.6.- Cinacalcet, potenciales alcances clínicos	73
VI. LIMITACIONES	75
VII. PROYECCIONES	76
VIII. CONCLUSIÓN	78
IX. REFERENCIAS	80
X. AGRADECIMIENTOS	93
XI. ANEXOS	
XI.1.- La activación del CaSR disminuye la expresión del RNAm de PPAR γ , GPD y LPL en células adiposas LS14 diferenciadas	94
XI.2.- Estabilidad del ciclo umbral de GAPDH en adipocitos LS14	95
XI.3.- Los cultivos celulares LS14 poseen un abundancia de RNAm conservada	96
XI.4.- Cinacalcet no afecta la muerte celular de células LS14	97
XI.5.- Activación del CaSR no afecta la expresión de marcadores de adipocito diferenciado en preadipocitos LS14	98
XI.6.- Tabla 2	99
XI.7.- La activación del CaSR eleva la expresión de citoquinas proinflamatorias en hepatocitos HepG2	100
X.8.- Presentaciones en congresos	101
X.9.- Artículos publicados	108

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

FIGURAS

Figura 1. Contenido de triglicéridos en células LS14	46
Figura 2. Expresión de genes adipogénicos en células LS14	47
Figura 3. Efecto de cinacalcet sobre la expresión de marcadores adipogénicos en células LS14	48
Figura 4. Efecto de cinacalcet sobre la expresión de marcadores adipogénicos en preadipocitos derivados de tejido adiposo humano	49
Figura 5. Efecto de la activación del CaSR sobre la señalización de la insulina en adipocitos diferenciados LS14	50
Figura 6. Efecto de la activación del CaSR sobre la señalización de la insulina en adipocitos aislados de tejido adiposo humano	51
Figura 7. Efecto de cinacalcet sobre el contenido de triglicéridos en células LS14	53
Figura 8. Efecto de cinacalcet sobre la expresión del RNAm de marcadores lipogénicos (PPAR γ , GPD, LPL, FAS) en células adiposas LS14 diferenciadas	54
Figura 9. Asociación de la expresión del RNAm entre GPD, LPL y FAS en células adiposas LS14 diferenciadas tratadas con cinacalcet	55
Figura 10. Efecto de cinacalcet sobre la expresión de genes de secreción (α P2, leptina y adiponectina) en células adiposas LS14 diferenciadas	57
Figura 11. Asociación de la expresión del RNAm de adiponectina y genes lipogénicos (GPD, LPL y FAS) en células adiposas LS14 diferenciadas tratadas con cinacalcet ..	58
Figura 12. Expresión del CaSR en células hepáticas HepG2	59
Figura 13. Viabilidad de células HepG2	60
Figura 14. Efecto del ácido oleico sobre el contenido de triglicéridos en células HepG2	61
Figura 15. Efecto de cinacalcet sobre el contenido de triglicéridos en células HepG2 expuestas a ácido oleico	62
Figura 16. Efecto de cinacalcet sobre la expresión de genes lipogénicos (SREBP1c, FAS, DGAT1 y DGAT2) en células HepG2 expuestas a ácido oleico	63

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

Figura 17. Mecanismo propuesto para la interacción entre la activación del CaSR en el tejido adiposo y hepático y las manifestaciones de disfuncionalidad metabólica asociadas a la obesidad	79
Figura 18. Efecto de cinacalcet sobre la expresión del RNAm de marcadores lipogénicos (PPAR γ , GPD, LPL, FAS) en células adiposas LS14 diferenciadas	94
Figura 19. Ciclo umbral para GAPDH como gen housekeeping en 10 experimentos independientes de adipocitos LS14	95
Figura 20. Ciclo umbral promedio de genes que codifican para marcadores adipogénicos en 10 experimentos representativos con células LS14 controles v/s diferenciadas	96
Figura 21. Efecto de cinacalcet sobre la muerte celular de preadipocitos LS14	97
Figura 22. Efecto de cinacalcet sobre marcadores de adipocito diferenciado en células preadiposas LS14 no diferenciadas	98
Figura 23. Efecto de cinacalcet sobre la expresión de citoquinas proinflamatorias en células HepG2	100

TABLAS

Tabla 1. Secuencia de partidores para PCR en tiempo real	41
Tabla 2. Características antropométricas y bioquímicas de los donantes de tejido adiposo	99

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

LISTA DE ABREVIATURAS

AC	Adenilato ciclasa
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ALT	Alanina transaminasa
APM	Alto peso molecular
APS	Proteína adaptadora de Cbl
RNA _m	Ácido ribonucleico mensajero
Ca ²⁺	Ion calcio
cAMP	AMP cíclico (adenosin 3' 5' monofosfato)
CAP	Proteína adaptadora de Cbl
CaSR	Receptor Sensor de Calcio
Cbl	Proteína de anclaje de SH2/SH3, producto de un protooncogen
CT	Ciclo umbral
CV	Coeficiente de variación
DAG	Diacilglicerol
DGAT1/2	Diacilglicerol aciltransferasa 1 y 2
DHAP	Dihidroxiacetona fosfato
FABP4/ aP2	Proteína de unión de ácidos grasos 4
FAS	Sintasa de ácidos grasos
G3P	Glicerol-3-fosfato
GAPDH	Gliceraldehido-3-fosfato dehidrogenasa
GC	Guanilato ciclasa
GLUT4	Transportador de glucosa dependiente de insulina
GPD	Glicerol 3 fosfato deshidrogenasa
GSK3	Glucógeno sintasa quinasa 3
HCl	Ácido clorhídrico
IKK-β	Inhibidor de la quinasa kB-β
IL	Interleuquina
IP3	Inositol 1,4,5-trifosfato
IRS	Sustratos del receptor de insulina
LPL	Lipasa de lipoproteínas
MAPK	Proteína quinasa activadora de la mitogénesis

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

MSC	Células madres mesenquimales multipotentes
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (forma reducida)
NF-kB	Factor nuclear kappa B
p70S6K	p70S6 quinasa
PDK1	Fosfoinositidina dependiente de proteína kinasa 1
PI3K	Fosfatidilinositol 3 quinasa
PI4,5P2	Fosfatidilinositol-4,5-bifosfato
PI4K	Fosfoinositol-4-quinasa
PIP2	Fosfatidilinositol bifosfato
PIP3	Fosfatidilinositol trifosfato
PK	Proteína quinasa
PKB/Akt	Proteína quinasa B
PKC	Proteína quinasa C
PLC	Fosfolipasa C
PPARs	Receptores activados por proliferadores de peroxisomas
PPRE	Elementos de respuesta a proliferadores peroxisomales
PTH	Paratohormona
qPCR	PCR cuantitativa en tiempo real
RE	Retículo endoplásmico
RI	Receptor de insulina
RXR	Receptor del ácido 9-cis-retinoico
SRE	Elementos de respuesta a esteroides
SREBP-1c	Proteína 1 ligante al elemento regulador de esteroides
TNF	Factor de necrosis tumoral
VLDL	Lipoproteínas de muy baja densidad

RESUMEN

La obesidad se asocia con un estado inflamatorio crónico de bajo grado que se ha relacionado causalmente con consecuencias metabólicas adversas en el tejido adiposo y hepático. El estudio de los mecanismos implicados en la promoción de disfuncionalidad adiposa, contribuye a esclarecer la relación entre la obesidad y sus comorbilidades. Nuestro laboratorio ha propuesto la participación de la proteína receptor sensor de calcio (CaSR), presente en la membrana celular de los adipocitos y preadipocitos, en la modulación de varios procesos fisiológicos en el tejido adiposo. Por esto, el objetivo de esta tesis fue estudiar el efecto de la activación del CaSR sobre la adipogénesis, el almacenamiento de los triglicéridos, la expresión de adipoquinas y la señalización de insulina en células adiposas humanas y evaluar el efecto de la activación del CaSR sobre el almacenamiento de triglicéridos en células hepáticas HepG2. Para este efecto, se estudiaron células preadiposas LS14 expuestas al agonista alostérico del CaSR cinacalcet HCl sobre la expresión génica de marcadores de diferenciación adipogénica (PPAR γ , GPD, LPL y FAS) por qPCR, y en adipocitos diferenciados se evaluó la fosforilación de la proteína implicada en la señalización de insulina Akt por inmunoblot, la expresión génica de factores lipogénicos (PPAR γ , GPD, LPL y FAS) y factores de secreción (leptina, adiponectina y aP2) por qPCR y el contenido intracelular de triglicéridos por fluorimetría. Para el estudio del manejo de triglicéridos en células HepG2 se evaluó la expresión de genes involucrados en la lipogénesis hepática (SREBP1c, FAS y DGAT1/2) por qPCR y la acumulación de triglicéridos por fluorimetría. La activación CaSR en forma concomitante con el estímulo adipogénico en preadipocitos LS14 se asoció con un aumento ($p < 0,05$) en la expresión génica de los marcadores de adipogénesis PPAR γ , FAS, GPD, aP2 y adiponectina después de 10 días de estimulación. La estimulación del CaSR no afectó la fosforilación de la proteína Akt ($p > 0,05$) en respuesta aguda a insulina en células adiposas diferenciadas expuestas a cinacalcet. En estas mismas células, la expresión génica de adiponectina disminuyó, mientras que leptina y aP2 no respondieron a cinacalcet. También se observó una disminución del 20% en la acumulación de triglicéridos, acompañado de una reducción en la expresión génica de GPD en un 34% y de LPL en un 20%. El CaSR se encontró presente en hepatocitos humanos y su estimulación mostró que en un contexto de sobreoferta lipídica, el contenido de triglicéridos aumenta ($p < 0,05$). Estas observaciones en conjunto permiten plantear que la activación del CaSR promueve un aumento en la expresión de genes adipogénicos en células adiposas viscerales que, sin embargo, exhiben una menor capacidad de almacenamiento de triglicéridos. Adicionalmente, la disminución de adiponectina favorecería la generación de un fenotipo disfuncional en el tejido adiposo. Desde un punto de vista de organismo completo, el menor contenido de lípidos en células adiposas por efecto del CaSR podría determinar la presencia de una mayor cantidad de ácidos grasos libres circulantes y acumulación de triglicéridos en otros órganos, como el hígado. Este efecto a su vez se vería favorecido por la estimulación del CaSR, que aumenta el contenido de triglicéridos ($p < 0,05$) en células hepáticas HepG2. Estos antecedentes nos permiten proponer al CaSR es un generador de alteraciones funcionales en el tejido adiposo y hepático, y un posible blanco terapéutico de las comorbilidades metabólicas asociadas a la obesidad.

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

I. INTRODUCCIÓN

1.1.- Aspectos generales

La obesidad es una patología multifactorial caracterizada por un desequilibrio energético positivo, resultado de un exceso en la ingesta y/o disminución en el gasto de energía (del Pozo et al, 2011). La creciente prevalencia de obesidad en el mundo se convierte en un serio problema de salud pública, que incrementa los costos en salud y disminuye los años de vida saludable en la población (Visscher & Seidell, 2001). Actualmente, se calcula que para el año 2030, el número de adultos con sobrepeso y obesidad alcanzará un total de más de 2 billones y 1 billón respectivamente (Kelly et al, 2008). Además, dada la fuerte asociación de la obesidad con el desarrollo de comorbilidades, incluyendo diabetes mellitus tipo 2, enfermedad cardiovascular y enfermedad de hígado graso no alcohólico, se hace necesario el estudio de la fisiopatología de la obesidad en su origen: el tejido adiposo (McArdle et al, 2013).

La etiología de la obesidad comprende un componente genético acompañado por factores ambientales o de comportamiento que favorecen la aparición del fenotipo característico manifestado por un exceso de tejido adiposo. En su función principal, el tejido adiposo actúa como un regulador del flujo energético, ya que es capaz de almacenar energía en forma de triglicéridos durante los periodos de exceso y/o movilizar las reservas energéticas cuando el gasto excede la ingesta (Frühbeck et al, 2001). El tejido adiposo puede adaptarse rápidamente a la privación de nutrientes y la sobrenutrición, esta capacidad se conoce como plasticidad, la cual tiene un papel importante en la determinación de las posibles consecuencias metabólicas de la sobrenutrición (Virtue & Vidal-Puig, 2008). Adicionalmente, el tejido adiposo es un órgano endocrino responsable de producir y secretar numerosas proteínas proinflamatorias, antiinflamatorias e inmunomoduladoras, además de péptidos que pertenecen a las familias de citoquinas, quimioquinas y factores de complemento y crecimiento, llamadas adipoquinas (Schäffler & Schölmerich, 2010).

El tejido adiposo está compuesto por adipocitos, preadipocitos, células endoteliales, fibroblastos, macrófagos y leucocitos (Mariman & Wang, 2010). Los adipocitos, que constituyen el principal tipo celular, son células altamente especializadas, donde el 95% de su volumen se compone de una estructura dispuesta para el depósito de triglicéridos. El 5% restante posee una importante actividad

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

metabólica, específicamente enfocada en la producción de diferentes adipoquinas (Adamczak & Wiecek, 2013). El tejido adiposo contiene dos poblaciones diferentes de adipocitos que difieren en su localización y capacidad funcional. El tejido adiposo subcutáneo es reconocido como el primer compartimento que responde para recibir el exceso de lípidos, con una mayor avidez en la captación de triglicéridos y ácidos grasos libres (Ibrahim, 2010). Cuando la capacidad de almacenamiento de este depósito se limita, procede la expansión de los depósitos de grasa secundarias, incluyendo la grasa visceral (Drolet et al, 2008). El tejido adiposo visceral es un depósito más sensible a la lipólisis y posee una mayor capacidad para generar ácidos grasos libres que, debido a su posición anatómica, proporciona directamente al hígado el drenaje lipídico a través de la vena porta (Ibrahim, 2010). Por esto, el tejido adiposo visceral se asocia a un mayor riesgo metabólico y cardiovascular.

Características frecuentemente presentes en obesidad son hipertrofia de los adipocitos, infiltración de macrófagos y cambios en la secreción de citoquinas y quimioquinas (McArdle et al, 2013). La inflamación del tejido adiposo ha sido propuesta como responsable de la disfunción metabólica de sujetos obesos y se asocia a liberación de adipoquinas inflamatorias, alteración de la señalización de la insulina, pérdida en la capacidad para almacenar la energía de manera eficiente y aumento de ácidos grasos libres en circulación, que promueven depósito ectópico de lípidos y lipotoxicidad principalmente el músculo, páncreas e hígado (Abranches et al, 2015).

En el contexto de un tejido adiposo disfuncional, nuestro laboratorio ha propuesto la participación del receptor sensor de calcio (CaSR) en la desregulación de la funcionalidad adiposa. Evidencia previa muestra que esta proteína aumenta su expresión por efecto de citoquinas proinflamatorias (Cifuentes et al, 2010) y su estimulación eleva la producción de citoquinas y quimioquinas (Cifuentes et al, 2012). Esto nos ha llevado a sugerir participación del CaSR en eventos que ayudan a la generación de un tejido adiposo inflamado y, como consecuencia, disfuncional, subyacente a las patologías metabólicas que se asocian con la obesidad. A partir de los antecedentes mencionados, esta tesis propuso estudiar una serie de consecuencias funcionales que pueden verse alteradas a causa de la activación del CaSR en el tejido adiposo, entre las que destacan la diferenciación de preadipocitos hacia adipocitos, la señalización de insulina, el almacenamiento de triglicéridos y la capacidad de producir adipoquinas de los adipocitos. Dado que la disfuncionalidad

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

adiposa favorece un aumento de ácidos grasos libres en circulación y la acumulación ectópica de lípidos en órganos como el hígado, este trabajo además exploró el efecto de la estimulación del CaSR sobre el manejo de triglicéridos en una línea celular hepática, permitiendo así establecer una nueva línea de trabajo que reconoce el vínculo entre la disfuncionalidad adiposa y hepática.

1.2.- Receptor Sensor de Calcio (CaSR)

El CaSR es una proteína altamente glicosilada, localizada en la membrana plasmática, con capacidad de detectar cambios en el calcio extracelular en un rango de 0,05 a 5 mM, jugando un papel importante en la homeostasis del mineral (Tfelt-Hansen et al, 2003). Adicionalmente, dada su capacidad de responder a numerosos otros agentes, se le considera como un integrador de múltiples señales ambientales para la regulación de muchos otros procesos celulares vitales. El gen que codifica para el CaSR humano está localizado en el cromosoma 3q13 (Janicic et al, 1995) y tiene dos promotores que poseen elementos funcionales que responden a la 1,25-dihidroxitamina D y citoquinas proinflamatorias (Hendy et al, 2013), lo que podría explicar y/o predecir múltiples funciones fisiológicas.

Luego de la transcripción del gen del CaSR, esta proteína sufre modificaciones post-traduccionales, de manera que es glicosilado en el retículo endoplásmico, modificado en el aparato de Golgi, para finalmente localizarse en la membrana plasmática (Magno et al, 2011). La unidad funcional de CaSR es un homodímero, donde cada monómero posee una estructura con un gran dominio extracelular (612 aminoácidos), los que son estabilizados por enlaces disulfuro e interacciones intermoleculares. El receptor presenta siete dominios transmembrana de naturaleza hidrofóbica (250 aminoácidos) y en su dominio intracelular, un largo extremo carboxilo terminal (216 aminoácidos) acoplado a proteínas G (Ward et al, 2012).

En 1993, Brown y colaboradores identificaron y describieron al CaSR como el principal regulador de la secreción de paratohormona y las concentraciones circulantes de calcio (Brown et al, 1993). Ciertamente, el principal agonista fisiológico del CaSR es el calcio, eventualmente también podrían serlo de manera fisiológica L-aminoácidos (especialmente aromáticos) y poliaminas (espermina, espermidina). Además existe una amplia cantidad de sustancias y condiciones bioquímicas capaces de modular su actividad, entre ellos cationes multivalentes (La^{3+} , Gd^{3+} , Be^{2+} , Ba^{2+} , Sr^{2+} , Mg^{2+}), ,

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

polipéptidos (polilisina, poliarginina y γ -glutamilpeptidos), antibióticos aminoglicósidos (neomicina, tobramicina, gentamicina y kanamicina), pH, fuerza iónica y agentes farmacológicos, lo que sugiere una interesante versatilidad de acción (Magno et al, 2011). Se ha descrito que el tipo de ligando, junto con la duración y la intensidad de la señal, puede promover la activación de vías intracelulares diferentes, conduciendo a respuestas biológicas dependientes del agonista (Conigrave & Ward, 2013).

Entre los agentes farmacológicos capaces de regular la actividad del CaSR encontramos moduladores alostéricos positivos (calcimiméticos) y negativos (calciolíticos). Cinacalcet HCl fue el primer calcimimético aprobado por la Food and Drug Administration (FDA) como tratamiento farmacológico basado en la activación del CaSR (Cavanaugh et al, 2012)

1.2.1.- Cinacalcet: Aspectos farmacológicos y clínicos

Cinacalcet es un compuesto fenilalquilamina de segunda generación, considerado como el primer calcimimético de tipo II. Como modulador alostérico de tipo II, cinacalcet induce un cambio conformacional del CaSR, aumentando su sensibilidad del CaSR al calcio extracelular (Dong, 2005). En estudios clínicos se ha establecido que luego de la administración oral, cinacalcet se absorbe rápidamente con una biodisponibilidad absoluta estimada del 20% a 25%, aumentando hasta un 50-80% indicado junto a la comida, independientemente del contenido graso de esta. Posterior a su absorción, cinacalcet se asocia a proteínas plasmáticas con una afinidad entre un 93% y un 97%, logrando la concentración máxima del fármaco en la sangre luego de 2 a 6 horas (Padhi & Harris, 2009).

En la membrana plasmática de la célula, cinacalcet se une al dominio transmembrana del CaSR (Miedlich et al, 2004). Esta modulación alostérica permite la sensibilización del CaSR a su agonista ortostérico (calcio), cuya acción a nivel de paratiroides determina que ocurra una reducción en la liberación de parathormona (PTH), con la subsecuente disminución del calcio sérico (Dong, 2005). El metabolismo de cinacalcet ocurre principalmente por enzimas del sistema citocromo P450 hepático (CYP) (principalmente 3A4, 2D6 y 1A2), excretándose por la orina menos del 1% del fármaco original. Cinacalcet se elimina en un patrón bifásico, en un tiempo medio que va desde 30 a 40 horas (Padhi & Harris, 2009).

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

El uso clínico de cinacalcet se ha aceptado para el tratamiento de pacientes con hiperparatiroidismo secundario en diálisis renal (Yokoyama et al, 2012) y para el tratamiento la hipercalcemia en pacientes con cáncer de paratiroides (Pahdi & Harris, 2009). Cinacalcet también sería eficaz en la normalización de los niveles séricos de calcio en el hiperparatiroidismo primario (Maccocci & Cetani, 2012).

1.2.2.- Activación del CaSR, señalización intracelular

Las múltiples vías de señalización intracelular que se pueden activar en respuesta a la activación del CaSR comienzan por la asociación a uno de al menos tres grupos funcionalmente diferentes de proteínas G heterotriméricas (Gq/11, Gi/0 o G12/13). El acoplamiento a una proteína de tipo Gq/11 activa la fosfolipasa C (PLC), que actúa sobre el lípido de membrana fosfatidilinositol bifosfato (PIP2) produciéndose inositol 1,4,5-trifosfato (IP3) y diacilglicerol (DAG). El primero genera la movilización del calcio desde los depósitos intracelulares hacia el citosol, mientras que DAG activa diferentes isoformas de proteína quinasa C (PKC) y como consecuencia se fosforilan diversos sustratos, modificando su activación. Por otra parte, la unión a Gi/0 gatilla la inhibición de la enzima adenilato ciclasa (AC), disminuyendo así la producción de AMP cíclico (cAMP). La asociación con G12/13 activa proteínas G monoméricas de bajo peso molecular, incluyendo RhoA, Ras, Rab1, Rab11a, para regular segundos mensajeros intracelulares, quinasas de lípidos, diversas proteínas quinasas y factores de transcripción. Entre las quinasas lipídicas, la activación fosfoinositol-4-quinasa (PI4K) promueve la producción de PIP2 y asegura la generación de sustrato para aumentar el calcio citosólico, que es parte de la maquinaria que permite al receptor modular funciones en una amplia variedad de células en las que se expresa (Brennan & Conigrave, 2009).

El CaSR se expresa en todos los tejidos que contribuyen a la regulación de la homeostasis del calcio sérico, incluyendo (además de la ya mencionada glándula paratiroides) huesos, riñón e intestino (Breitwieser, 2012), así como en tejidos donde no se relaciona con esta función como cerebro, páncreas, hígado, pulmones, esófago, estómago, corazón, piel, hipófisis, ovario, mama, testículos y próstata (Ward et al, 2012). La expresión del CaSR en tejidos con funciones que difieren de la homeostasis del calcio se ha relacionado con secreción gástrica de ácido clorhídrico (HCl) y gastrina (Ceglia et al, 2009), diferenciación de los queratinocitos (Tu et al, 2004), promoción o

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

prevención del crecimiento tumoral (Chakravarti et al, 2009) y secreción de insulina (Gray et al, 2006), entre otros. Estudios desarrollados por nuestro laboratorio (Cifuentes et al, 2005, 2012) y otros (He et al, 2012) reportaron la presencia del CaSR en células adiposas humanas y nuestro trabajo nos ha llevado a proponer que su activación se relaciona con aspectos fisiopatológicos de este tejido, como se describe a continuación.

1.3.- La activación del CaSR podría comprometer la funcionalidad del tejido adiposo

Desde el año 2005, en que se reportó por primera vez la expresión del CaSR en adipocitos y en células progenitoras de adipocitos aislados de tejido adiposo humano (Cifuentes et al, 2005), se inició el estudio de su funcionalidad en el tejido graso. La relación entre la estimulación del CaSR e inflamación se ha reportado en distintos tejidos del organismo, donde la activación del CaSR se ha vinculado a estados inflamatorios como modulador de la generación de señales proinflamatorias (Nielsen et al, 1997, Canaff & Hendy, 2005, Abdullah et al, 2006, Canaff et al, 2008, Wu et al, 2015). Es así como se observó que la exposición a 1,2 mM de calcio eleva la expresión del CaSR y del factor de necrosis tumoral (TNF)- α en células renales (Abdullah et al, 2006). También, un estudio de Nielsen et al. reportó que la incubación *in vitro* de tejido paratiroideo bovino con interleuquina (IL)-1 α e IL-1 β generó un aumento en la expresión del CaSR (Nielsen et al, 1997). Posteriormente se observó que ratas inyectadas con IL-6 e IL-1 β manifestaron un aumento en la expresión del RNAm del CaSR en tejido paratiroideo, tiroideo y renal (Canaff et al, 2008. Canaff & Hendy, 2005). Otro reporte en 2015, observó que la promoción de un estado inflamatorio sistémico, eleva la expresión del CaSR y la secreción de TNF- α en linfocitos T de ratas (Wu et al, 2015). Se ha descrito a su vez que el CaSR activa la vía del inflamasoma NLRP3, acelerando así la maduración y liberación de IL-1 β (Lee et al, 2012, Rossol et al, 2012). Estos antecedentes son concordantes con los resultados de nuestro laboratorio, donde se sugirió que la activación del CaSR en el tejido adiposo se relaciona con el desarrollo de inflamación (Cifuentes et al 2010, 2012).

El deterioro de la capacidad homeostática en el tejido adiposo, producto de una sobrealimentación crónica, desarrolla un estado inflamatorio dado por señales que favorecen la infiltración de macrófagos que, a su vez, producen citoquinas

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

proinflamatorias que se relacionan con una disfuncionalidad adiposa. Hemos observado que las citoquinas proinflamatorias IL-1 β , IL-6 y TNF α son capaces de incrementar la expresión del CaSR en adipocitos humanos primarios y de la línea celular adiposa humana LS14 (Cifuentes et al, 2010). Adicionalmente, los productos secretados por explantes de tejido adiposo provocan el mismo efecto (elevación de la expresión del CaSR), y entre ellos, observamos que TNF- α juega un papel importante. Esto ocurre con mayor intensidad cuando el tejido adiposo proviene de un donante con mayor índice de masa corporal (IMC) (Cifuentes et al, 2010). Estudios de nuestro laboratorio muestran además que la exposición de tejido adiposo y células adiposas en cultivo a cinacalcet eleva la producción de citoquinas IL-6, IL-1 β , TNF α y de la molécula quimioatrayente MCP-1, efecto en parte mediado por el factor nuclear kappa B (NF-kB) (Cifuentes et al, 2012).

Dada la capacidad del CaSR para elevar la expresión de citoquinas y de responder a éstas elevando su propia expresión, es posible plantear que CaSR es un factor favorecedor de la inflamación y por lo tanto promover un estado disfuncional del tejido adiposo y de las complicaciones metabólicas de la obesidad.

1.4.- Adipogénesis: Diferenciación de preadipocitos

Como parte de la respuesta fisiológica provocada por la ingesta excesiva de energía por sobre el gasto, se produce un aumento en el contenido de tejido adiposo (Danforth, 2000). El tejido adiposo aumenta su volumen por un incremento en el tamaño de los adipocitos existentes y/o por la generación de nuevas células adiposas diferenciadas que se conoce como adipogénesis. Las nuevas células adiposas “maduras” surgirían a partir de una población preexistente de células progenitoras indiferenciadas que juegan un papel clave en el desarrollo de la obesidad (Li et al, 2010).

Actualmente, el concepto de adipogénesis en el adulto es controvertido. En estudios en animales, se estableció hace más de 3 décadas que el número de adipocitos blancos aumenta hasta la pubertad, pero este número es relativamente constante durante la adultez (Hirsch & Han, 1969). Resultados similares se han obtenido en seres humanos, sin embargo dentro del tejido adiposo blanco de un humano adulto, los adipocitos parecen estar sometidos a un recambio anual de un 10% (Spalding et al, 2008). Por lo tanto, en un estado de equilibrio nutricional, la

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

adipogénesis se lleva a cabo en adultos para la mantención y recambio del compartimento adiposo. No obstante, estudios en obesidad indican que el balance energético positivo de manera persistente se asocia con un deterioro de la adipogénesis, hipertrofia de los adipocitos y disfunción del tejido adiposo (Bays et al, 2008). Además se ha logrado establecer que la adipogénesis en el tejido adiposo visceral es menos activa que en el tejido adiposo subcutáneo (Ma et al, 2015). Estos datos indican que la obesidad se relaciona con menor diferenciación de adipocitos, proceso que se encuentra más comprometido en el depósito visceral.

A nivel celular, la adipogénesis consta de dos pasos: compromiso y diferenciación terminal. El compromiso hacia el linaje adipogénico está dado por la determinación de células madres mesenquimales (MSC) multipotentes en preadipocitos, a través de una compleja integración de señales mecánicas y moleculares. La diferenciación de los preadipocitos en adipocitos es un proceso que implica la inducción y represión de un gran número de genes que resultan en un cambio morfológico y la diferenciación terminal del adipocito (Cristancho & Lazar, 2011). En esta etapa se comienza a expresar un gran número de factores considerados marcadores de adipocitos diferenciados, entre ellos el receptor activado por proliferadores de peroxisomas (PPAR) γ y las enzimas glicerol 3 fosfato deshidrogenasa (GPD) que provee del esqueleto (glicerol-3-fosfato) donde se esterifican los ácidos grasos, lipasa de las lipoproteínas (LPL) que permite la entrada de ácidos grasos en los adipocitos y sintasa de ácidos grasos (FAS) que cataliza la síntesis de ácidos grasos *de novo* (Wallace et al, 2014).

1.4.1.- Receptor activado por proliferadores de peroxisomas gamma (PPAR γ)

PPAR γ es miembro de la familia de receptores nucleares heterodiméricos. Se expresa como tres transcritos que codifican dos proteínas diferentes; PPAR γ 1 y PPAR γ 2. PPAR γ 2 se expresa mayoritariamente en tejido adiposo, siendo la isoforma más relacionada con el proceso adipogénico (Rosen & Spiegelman, 2001). Se ha demostrado que la inducción de la expresión de PPAR γ es suficiente para promover la diferenciación de fibroblastos en adipocitos y no se ha descubierto ningún factor que promueva la adipogénesis en ausencia de PPAR γ (Rosen & MacDougald, 2006). La principal función de este factor de transcripción es regular la diferenciación de

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

preadipocitos y coordinar la expresión de genes que promueven captación, transporte y almacenamiento de ácidos grasos en el adipocito maduro (Staels & Fruchart, 2005).

La activación de PPAR γ comienza por la unión a un ligando (ácidos grasos poliinsaturados, eicosanoides, tiazolidinedionas) que induce un cambio conformacional del receptor de transcripción, que conduce a la formación de un heterodímero con el Receptor X retinoide (RXR). Este heterodímero se une a secuencias específicas o elementos de respuesta a proliferadores peroxisomales (PPRE) presentes en los promotores de sus genes blanco (Bensinger & Tontonoz, 2008) como LPL, adiponectina y aP2 (Nakamura et al, 2014). Existen numerosas enzimas lipogénicas cuya expresión se induce tras la activación de PPAR γ , entre estos genes se incluyen la LPL, la FAS y la GPD (Wallace et al, 2014).

1.4.2.- Glicerol 3 fosfato deshidrogenasa (GPD)

GPD es una enzima perteneciente a la familia de oxidoreductasas que cataliza la biosíntesis de glicerol-3-fosfato (G3P) a partir de la dihidroxiacetona fosfato (DHAP), un intermediario de la vía glicolítica. G3P constituye el “esqueleto” necesario para la esterificación de los ácidos grasos que resulta en la síntesis del triglicérido (Strawford et al, 2003). Dado que los adipocitos carecen de la enzima glicerol quinasa para producir G3P directamente a partir de glicerol (Proença et al, 2014), necesitan por lo tanto incorporar y oxidar glucosa para generar DHAP (Rumberger et al, 2003).

Estudios sobre la actividad específica de GPD en el tejido adiposo omental muestra una disminución del 50% en adipocitos de sujetos obesos en comparación con la de sujetos no obesos (Cifuentes et al, 2008). Documentado también es el hallazgo en muestras de tejido adiposo omental donde se mostró una menor expresión de GPD en mujeres obesas con deterioro de la función insulínica en comparación con aquellas mujeres normopeso (Poulain-Godefroy et al, 2008).

1.4.3.- Lipasa de lipoproteínas (LPL)

En el contexto del tejido adiposo, LPL es la enzima responsable de la hidrólisis de los triglicéridos contenidos en los quilomicrones y en las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL). La hidrólisis de triglicéridos permite la liberación ácidos grasos, favoreciendo su entrada en el adipocito para eventualmente ser almacenados (Wang &

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

Eckel, 2009). La LPL sintetizada por el adipocito se transporta a través de la barrera endotelial donde permanece anclada a la superficie luminal. En esta posición, LPL puede mediar la liberación de ácidos grasos desde los triglicéridos contenidos en las lipoproteínas circulantes que llegan al adipocito (Gonzales & Orlando, 2007). En relación a la regulación de LPL, se ha demostrado que el promotor de su gen contiene un PPRE funcional que se activa por PPAR γ (Schoonjans et al, 1996). Estudios muestran que durante la diferenciación adipogénica se incrementan los niveles y actividad de la LPL en ratones, así como el almacenamiento intracelular de lípidos en adipocitos 3T3-L1 (Green & Meuth, 1974)

Estudios de ablación completa del gen LPL en ratones han resultando en un fenotipo letal. Al nacer, estos ratones presentan depositos adiposos, así como lípidos intracelulares en los adipocitos, severamente disminuídos (Weinstock et al, 1995). También se han reportado mutaciones del gen de LPL en humanos, conducentes a una hipertrigliceridemia grave (Ullrich et al, 2001).

1.4.4.- Sintasa de ácidos grasos (FAS)

La síntesis endógena de ácidos grasos (lipogénesis *de novo*) es catalizada por la FAS, una proteína multifuncional citosólica que utiliza acetil-CoA y malonil-CoA como donador de carbonos y NADPH como cofactor. El producto final de esta reacción es principalmente palmitato, sin embargo, la FAS también puede producir pequeñas cantidades de ácido mirístico, láurico e incluso ácidos grasos de cadena más corta (Menendez et al, 2009). La FAS es una proteína soluble expresada en altos niveles en hígado, tejido adiposo y pulmones (Jensen-Urstad & Semenkovich, 2012) y su expresión está regulada transcripcionalmente por insulina, nutrientes y otras hormonas (Lodhi et al, 2011). La insulina promueve la expresión de FAS, mientras que glucagón y cAMP reducen su expresión (Jensen-Urstad & Semenkovich, 2012).

Variaciones en la expresión de FAS han sido asociadas a la obesidad y sus comorbilidades. Un estudio en tejido adiposo visceral de sujetos obesos mórbidos mostró una disminución en la expresión del RNAm de FAS comparado con sujetos normopeso (García-Fuentes et al, 2015). En este sentido también se demostró que sujetos hipertensos presentaban una disminuída expresión de FAS comparado con sujetos normotensos, siendo más pronunciada la diferencia en pacientes obesos (Mayas et al, 2009). Otro estudio en cultivos primarios de sujetos obesos, observó una

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

disminución de FAS en el tejido adiposo omental (Ortega et al, 2010), sugiriendo que el tejido adiposo de los sujetos obesos podría tener mecanismos de defensa contra la expansión excesiva y acumulación de lípidos (Del Pozo et al, 2011).

1.5.- Señalización de insulina en el tejido adiposo: Homeostasis de glucosa

El tejido adiposo es sensible a las acciones de la insulina, la cual estimula el almacenamiento de los triglicéridos por múltiples mecanismos, incluyendo la promoción de la diferenciación de los preadipocitos a adipocitos, el aumento de la captación de glucosa y ácidos grasos derivados de las lipoproteínas circulantes y la lipogénesis en adipocitos maduros (Jung & Choi, 2014). La sensibilidad a la insulina en el tejido adiposo está frecuentemente disminuida en obesidad y esto se ha relacionado con mayor inflamación sistémica y adiposa (Guilherme et al, 2008). La incapacidad de responder adecuadamente a la insulina define la resistencia a la insulina y está relacionada con el desarrollo de diabetes mellitus 2 (Herman & Kahn, 2006).

Las primeras observaciones que relacionaron la obesidad y la inflamación con el deterioro en respuesta a la insulina fueron hechas hace unos 20 años en distintos modelos de roedores obesos y diabéticos que tenían niveles de TNF- α elevados en el tejido adiposo. En estas observaciones, la neutralización de TNF- α en ratas obesas causó un incremento en la captación periférica de glucosa en respuesta a la insulina, sugiriendo un mejoramiento de la resistencia a la insulina (Hotamisligil et al, 1993). De la misma forma, se ha visto que el tratamiento con TNF- α disminuye la expresión del transportador de glucosa dependiente de insulina GLUT4 en células 3T3-L1 (Stephens & Pekala, 1991). Adicionalmente, se ha establecido que el mecanismo entre los procesos inflamatorios y la resistencia a la insulina incluye vías de señalización que conducen la activación del inhibidor de la quinasa $\text{kB-}\beta$ (IKK- β) y del NF- kB que son estimuladas en la obesidad (Osborn & Olefsky, 2012).

1.5.1.- Activación del receptor de insulina, señalización intracelular

El efecto de la insulina sobre los tejidos blanco comprende una cascada de eventos que se inician con su acoplamiento al receptor de insulina (RI). El RI es expresado como un heterotetrámero constituido por dos subunidades α y dos subunidades β unidas por puentes disulfuro. La insulina se une a la subunidad α del RI activando una tirosina quinasa en la subunidad β . Una vez que la tirosina quinasa del

Receptor sensor de calcio (CaSR) y disfunción del tejido adiposo: diferenciación, señalización de insulina, almacenamiento de triglicéridos, expresión de adipocinas y manejo de triglicéridos en el hígado

RI es activada, se promueve la autofosforilación de la subunidad β , donde se requiere la transfosforilación de tres residuos de tirosina (Tyr-1158, Tyr-116, y Tyr-1163) para la amplificación de la actividad quinasa, que incluye la fosforilación de los sustratos del RI (IRS). A pesar de que existen 4 isoformas de IRS, se piensa que la que está involucrada en el transporte de glucosa a las células es la isoforma 1, por lo que en adelante se hará referencia principalmente a esta isoforma.

Los eventos iniciados por la activación del RI dan lugar a la activación de moléculas y diversas cascadas de señalización en el citosol (Saini, 2010). La señalización del RI involucra dos vías principales: la vía de la proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK) denominada la vía mitogénica y la fosfatidilinositol 3 quinasa (PI3K) denominada la vía metabólica. Aunque estas vías son descritas en forma independiente, se debe tener en cuenta que cada una podría, bajo ciertas circunstancias, activar a la otra y viceversa.

PI3K es probablemente la enzima más extensamente estudiada de la cascada de señalización de insulina. Es una proteína dimérica con una subunidad catalítica (p110) y una subunidad regulatoria (p85). La subunidad p85 se une a los IRS fosforilados y eso hace que cese su actividad inhibitoria sobre la subunidad p110 (Ueki et al, 2002). La subunidad p110 desinhibida fosforila varios fosfolípidos de membrana, principalmente el fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (PI4,5P2) para generar fosfatidilinositol trifosfato (PIP3). Estos fosfolípidos son segundos mensajeros que regulan la actividad de la proteína transductora de señal Akt, efector clave de PI3K y foco esencial de una cascada de señales que regula múltiples procesos celulares tales como la diferenciación, el crecimiento celular, la supervivencia y aspectos del metabolismo intermediario. Actualmente Akt es el centro de atención en muchos estudios que tratan de controlar terapéuticamente estos aspectos (Abeyrathna & Su, 2015).

1.5.2.- Activación de Akt/PKB

La proteína Akt (también conocida como proteína quinasa B) es una serina/treonina quinasa activada por la fosforilación de fosfoinositidina dependiente de la proteína quinasa (PDK) 1 en el residuo treonina 308. La activación completa de Akt se lleva a cabo mediante una segunda fosforilación sobre el residuo de serina 473 mediante una proteína que se ha denominado PDK2 (Scheid & Woodgett, 2003). El complejo Rictor del blanco de rapamicina en mamíferos (mTOR)-Rictor, denominado

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

como complejo mTOR (mTORC) 2, ha sido identificado como PDK2 en adipocitos 3T3-L1 (Hresko & Mueckler, 2005).

Existen tres isoformas de Akt (Akt1-3), de las cuales, la isoforma 2 parece ser la que juega un papel importante en la incorporación de glucosa inducida por la insulina. La fosforilación de Akt provoca la activación de varias proteínas de fusión presentes en las vesículas de almacenamiento de los GLUT4, ocasionando la traslocación de GLUT4 a la membrana y por tanto la captación de glucosa al interior de la célula (Van Dam et al, 2005). Simultáneamente, entre las acciones metabólicas de Akt se encuentran la fosforilación de blancos importantes para el metabolismo, incluyendo las enzimas glucógeno sintasa (GS), glucógeno sintasa quinasa 3 (GSK3), sintasa de óxido nítrico inducible (iNOS), fosfofructoquinasa 2 (PFK2), y la proteína de unión al elemento de respuesta al AMP cíclico (factor de transcripción CREB), la molécula blanco de la rapamicina en mamíferos (mTOR), la caspasa 9 y la proteína antiapoptótica antagonista de Bcl2 (BAD).

En síntesis, la insulina origina una cascada de señales que activan Akt en el tejido adiposo, y convierten a esta proteína en un mediadora de sus acciones anabólicas (Whiteman et al, 2002).

1.5.3.- La activación del CaSR podría comprometer la sensibilidad a la insulina

En acuerdo con la mencionada relación entre los procesos inflamatorios y disminución en la sensibilidad a la insulina, se ha demostrado que TNF- α es la citoquina proinflamatoria que consistentemente se asocia con la resistencia a la insulina. Existen varios eventos en los cuales TNF- α reduce la señalización de insulina en adipocitos; el primero de ellos a) mediante la inducción de la fosforilación del IRS-1 en sustratos de serina^{24, 303, 307, 343, 362, 381, 480 y 636/639}, en contraste con la fosforilación en residuos de tirosina en estado de insulinosensibilidad (Boura-Halfon & Zick, 2009). El segundo, b) mediante el mejoramiento en la expresión del supresor de señalización de citoquinas (SOCS), proteína que se une al RI y reduce la capacidad de fosforilación de IRS-1 (Ueki et al, 2004). Por último, c) mediante la desestabilización de la interacción entre el RI y caveolina-1 (Cav-1) (Sekimoto et al, 2012), una proteína integral de membrana que mejora la transducción de la señal de insulina a través de la unión directa a la subunidad β del RI (Nystrom et al, 1999). Por lo tanto, existe fuerte evidencia respaldando el considerar a TNF- α como un disruptor de la señalización de

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

insulina. También, se ha propuesto que IL-6 es otra citoquina que juega un papel importante en el desarrollo de resistencia a la insulina en el tejido adiposo. Al respecto, se ha observado que la expresión de IL-6 se correlaciona positivamente con resistencia a insulina en el tejido adiposo tanto *in vivo* como *in vitro* (Bastard et al, 2002). Asimismo, se ha demostrado que IL-6 disminuye la expresión de IRS-1 y GLUT-4, induciendo resistencia a la insulina en células 3T3-L1 (Rotter et al, 2003). Por otro lado, se ha sugerido también una relación de IL-1 β con la insulinoresistencia en adipocitos. Un estudio de Gao y cols. demostró una reducción en la expresión génica y proteica en IRS-1, Akt y GLUT-4 en adipocitos diferenciados expuestos a IL-1 β (Gao et al, 2014). Al respecto, el bloqueo del receptor de IL-1 con anakinra, un antagonista del receptor de IL-1, mejora la glicemia, la función de la célula β pancreática y reduce los niveles sistémicos de IL-6 y proteína C reactiva en pacientes diabéticos (Larsen et al, 2007). Estos estudios sugieren que diversas citoquinas proinflamatorias están relacionadas con disminución de la sensibilidad a la insulina en seres humanos.

Tomando en conjunto todo lo anterior, dada la documentada capacidad del CaSR para aumentar la expresión de TNF- α , IL-6 e IL-1 β (Cifuentes et al, 2010) y la mencionada relación entre estas citoquinas y la disminución de la sensibilidad a insulina, es posible pensar que la estimulación del CaSR deteriora la señalización de la insulina en adipocitos maduros.

1.6.- Actividad endocrina en el tejido adiposo: Producción de factores de secreción

El tejido adiposo, considerado hace algunos años exclusivamente como un depósito de las reservas energéticas, es hoy reconocido como un integrador de procesos homeostáticos (respuesta inmune, control de la presión arterial, homeostasis ósea y la tiroides y la función reproductiva). Los procesos homeostáticos en el adipocito están coordinados principalmente a través de la síntesis y liberación de hormonas (Rosen & Spiegelman, 2006). La pérdida de función endocrina normal de los adipocitos se asocia al exceso de ingesta calórica, la sobrecarga metabólica y la hipertrofia en el tejido adiposo (Skurk et al, 2007). La disfunción endocrina conduce entre otros, al aumento de leptina y la disminución de la secreción de adiponectina, adipoquinas conocidas por su origen principalmente adiposo y su relevancia metabólica (Fantuzzi, 2005). Estas hormonas tienen un papel primordial en varios

procesos fisiológicos, entre los que se incluyen la ingesta de alimentos, la regulación del equilibrio energético, la acción de la insulina y el metabolismo de la glucosa. Así, dada su importancia desde el punto de vista metabólico, se espera que una alteración en su expresión y/o modificaciones post-traduccionales desencadenen una serie de complicaciones relacionadas con la obesidad (Trujillo & Scherer, 2006).

En los últimos años, la proteína citosólica de unión de ácidos grasos 4 del tejido adiposo (aP2) ha surgido como una molécula de integración de señales intracelulares de lípidos bajo condiciones de estrés metabólico (Furuhashi & Hotamisligil, 2008). A continuación se abordan en detalle las características de las principales adipocinas de interés en esta tesis.

1.6.1.- Leptina

La leptina es una proteína codificada por el gen *ob* (Zhang et al, 1994) que se expresa casi exclusivamente en los adipocitos (Carbone et al, 2012). La secreción de leptina tiene un ritmo circadiano (sus niveles aumentan un 30% en la noche) y está controlada por hormonas, citoquinas y nutrientes. Su expresión aumenta por la acción de insulina y glucocorticoides que están asociados a un balance energético positivo, mientras que las catecolaminas disminuyen la producción de leptina durante un balance energético negativo (Lee & Fried, 2009).

La regulación de la secreción de leptina en el tejido adiposo ha sido escasamente estudiada, sin embargo la evidencia sugiere que podría estar regulada en el ayuno, cuando el nivel de leptina en plasma se reduce drásticamente. Igualmente, después de una comida donde los niveles de leptina aumentan rápidamente (Wang et al, 2014). La función principal de leptina se relaciona con el control del apetito, al interferir con los sistemas reguladores de este proceso a nivel hipotalámico (Hauner, 2005). El patrón de secreción de esta proteína muestra que sus niveles circulantes se correlacionan directamente con la masa grasa corporal y el tamaño de los adipocitos (Carbone et al, 2012). Sin embargo, en sujetos obesos se ha observado una hiperleptinemia que coexiste con la pérdida de la capacidad de respuesta a la leptina. Este fenómeno se ha definido como leptino resistencia, considerándose la restauración de la sensibilidad a la leptina como una estrategia útil para tratar la obesidad (Aragonès et al, 2016). Por otro lado, se ha observado que la deficiencia de leptina se relaciona con un aumento del tejido adiposo, evidenciándose que, los ratones con una mutación

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

en el gen de la leptina (ratones *ob/ob*) o en el gen del receptor de leptina (ratones *db/db*), así como sujetos humanos con mutaciones en estos mismos genes, son masivamente obesos (Kim et al, 2007). Por esto, la desregulación de la liberación de leptina en los adipocitos da lugar a un desequilibrio en la homeostasis de la energía (Farooqi and O'Rahilly, 2009), lo que indica que el control adecuado de la secreción de leptina es crucial para la fisiología normal del tejido adiposo.

1.6.2.- Adiponectina

La adiponectina es una proteína de secreción que se produce principalmente en los adipocitos y su expresión está inducida frente a la presencia de insulina y durante la diferenciación adipocitaria (Carbone et al, 2012). La expresión de adiponectina está regulada por PPAR γ , dada la presencia de un PPRE en el promotor de su gen (Iwaki et al, 2003).

Durante el proceso de secreción de adiponectina existen modificaciones a nivel post-traduccionales pudiendo encontrarse como la proteína completa o como un fragmento que consiste en el dominio globular C-terminal, conocido como adiponectina globular (Tilg & Moschen, 2006). La adiponectina completa puede existir en circulación como un trímero (adiponectina de bajo peso molecular con 70-90 KDa); un hexámero, que consta de dos trímeros unidos por un enlace disulfuro (adiponectina peso molecular medio), o un multímero de alto peso molecular (APM) (12 a 18 monómeros con 500 KDa aproximadamente) con una amplia gama de actividades biológicas (Giannessi et al, 2007). De hecho, se ha observado que la forma de APM es la forma activa, y su relación con la adiponectina total parece estar estrechamente correlacionada con la sensibilidad a la insulina. Este antecedente está sustentado en que los pacientes diabéticos poseen una relación adiponectina de APM/adiponectina total disminuida en comparación con sujetos controles (Pajvani et al, 2004).

En contraste con las otras adipoquinas, la expresión y niveles circulantes de adiponectina están correlacionados negativamente con el índice de masa corporal, la resistencia a la insulina y la diabetes mellitus 2. Al respecto se ha observado que la pérdida de peso resulta en un aumento en los niveles circulantes, lo que indica que la disminución en la producción de adiponectina en obesidad es reversible (Hauner, 2005). Este hecho está respaldado por la regulación negativa en los niveles de adiponectina por parte de citoquinas inflamatorias tales como TNF α e IL-6 (Fantuzzi,

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

2005), lo que podría explicar los niveles más bajos de adiponectina en suero en individuos que son obesos. De esta forma, una de las consecuencias esperables de la inflamación en el tejido adiposo, es la alteración (disminución) en la producción de adiponectina en el adipocito.

1.6.3.- Proteína de unión de ácidos grasos 4 (FABP4)/ aP2

La isoforma de FABP que se expresa en mayor cantidad en el tejido adiposo y adipocitos maduros es FABP4 (aP2). Esta proteína, también conocida como chaperona de lípidos intracelulares, que regula el tráfico de lípidos, puede unirse reversiblemente con alta afinidad a ligandos hidrófobos, tales como ácidos grasos saturados e insaturados de cadena larga, eicosanoides y otros lípidos. La proteína aP2 facilita activamente el transporte de ácidos grasos a organelos específicos en la célula para la oxidación en la mitocondria o peroxisomas; regulación transcripcional mediada por lípidos en el núcleo; señalización, tráfico y síntesis de membranas en el retículo endoplasmático (RE); y regulación de la actividad enzimática y el almacenamiento de lípidos en el citoplasma (Furuhashi & Hotamisligil, 2008). La expresión de esta proteína está altamente inducida durante la diferenciación adiposa y es transcripcionalmente controlada por PPAR γ , dexametasona e insulina (Furuhashi et al, 2015).

aP2 es secretada por los adipocitos mediante un mecanismo en parte asociado a microvesículas. Sin embargo no depende del tráfico vesicular convencional en el RE y el aparato de Golgi, sino que estaría asociado a vías dependientes a AC-PKA y GC (guanilato ciclase)-PKG y/o un mecanismo dependiente de calcio intracelular (Mita et al, 2015). Estos alcances permiten indicar que aP2 posee un mecanismo de secreción no clásico.

Se ha observado que ratones knockout para aP2 están protegidos de la resistencia a la insulina asociada a la obesidad y la diabetes mellitus (Hotamisligil 1996). Posteriormente se publicó que las concentraciones de aP2 circulantes se asocian a variables antropométricas y a la distribución de la grasa corporal, y están aumentadas en los sujetos con sobrepeso u obesidad, en comparación con las personas delgadas (Xu et al, 2006).

Por otro lado, se ha demostrado que aP2 posee efectos directos en múltiples tipos de células, estableciéndose que aumenta la producción de glucosa hepática *in vivo* e *in vitro* (Cao et al, 2013). Por esto, aP2 se convierte en una muy interesante

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

señal que comunica el tejido adiposo y el hígado para regular el metabolismo de la glucosa.

1.7.- Almacenamiento de triglicéridos en el tejido adiposo y hepático

1.7.1.- Lipogenesis adiposa:

En adipocitos diferenciados, la acumulación de grasa está determinada por el balance entre la síntesis de ácidos grasos y triglicéridos (ambos procesos aquí descritos bajo el término lipogénesis) y la degradación de los triglicéridos (lipólisis) para posteriormente oxidar los ácidos grasos. La síntesis de triglicéridos es un proceso crucial y estrictamente regulado, que se produce principalmente en el tejido adiposo, pero también en otros órganos como el hígado (Saponaro et al, 2015). La regulación de la lipogénesis esta dada por hormonas, como la insulina y catecolaminas, de acuerdo al estado nutricional (ayuno/alimentación) y el ejercicio (Large et al, 2004). La gran mayoría de los triglicéridos adiposos resulta de la esterificación de ácidos grasos circulantes, que provienen de la dieta durante el periodo postprandial.

Es bien sabido que el almacenamiento de ácidos grasos en el tejido adiposo impide lipotoxicidad en otros tejidos (Moreno-Indias & Tinahones, 2015). Sin embargo, en la obesidad uno de los aspectos que caracteriza a la disfunción adiposa se relaciona con una menor capacidad de captar ácidos grasos libres (Gaggini et al, 2015). Por lo tanto, se ha sugerido que la vía lipogénica estaría regulada a la baja en la obesidad, al menos a nivel de expresión de genes (Ortega et al, 2010). Nuestro laboratorio evaluó preliminarmente este antecedente a partir de la expresión génica de algunos marcadores de lipogénesis a las 16 y 48 horas de exposición a cinacalcet, constatando que la estimulación del CaSR disminuye la expresión génica de GPD a partir de las 16 horas y de LPL a las 48 horas (Anexo 1).

Desde una perspectiva que aborda todo el organismo, se entiende que la incapacidad de las células adiposas para manejar adecuadamente los ácidos grasos hace que el exceso de lípidos disponible se dirija hacia otros tejidos. Este flujo de lípidos hacia otros órganos resulta en el depósito ectópico (y tóxico) de grasa en tejidos con gran actividad metabólica, como el hígado (Liu et al, 2014). Así, la vía de la lipogénesis adiposa es una herramienta para mantener y controlar la homeostasis de energía en una comunicación continua entre los tejidos oxidativos y órganos periféricos (Saponaro et al, 2015). Sin embargo, la acumulación de grasa en el hígado (esteatosis

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

hepática) se asocia a patología inflamatoria y fibrótica de este órgano (Ginsberg et al, 2006).

1.7.2.- Lipogenesis hepática

La esteatosis hepática puede resultar de: a) flujo aumentado de ácidos grasos libres hacia el hígado desde depósitos adiposos, b) mayor síntesis de ácidos grasos en el hígado a partir de la lipogénesis *de novo*, c) flujo aumentado de ácidos grasos provenientes de la dieta, d) menor oxidación hepática de ácidos grasos y e) menor secreción de VLDL. El aporte de ácidos grasos a través de vena porta, causa esteatosis, inflamación y estrés oxidativo que contribuyen al daño y disfunción de los hepatocitos (Saponaro et al, 2015).

La acumulación de grasa hepática provoca esteatosis, que se define como la acumulación de triglicéridos en el citoplasma de los hepatocitos que representan más del 5% de peso húmedo de hígado (Gómez-Lechón et al, 2007). Si bien la acumulación hepática de triglicéridos responde a un espectro que va desde esteatosis simple hasta esteatohepatitis crónica, que puede progresar a cirrosis, esta patología es conocida como uno de los factores clave de insuficiencia metabólica relacionada con la obesidad (Tilg & Moschen, 2008). La contribución relativa de las distintas fuentes de ácidos grasos al pool de triglicéridos hepáticos en hígados humanos con esteatosis es: 59% a partir de ácidos grasos no esterificados, 26,1% desde la lipogénesis *de novo* y 14,9% desde la dieta (Donnelly et al, 2005). Por lo tanto, la mayor parte de los triglicéridos hepáticos derivan de ácidos grasos libres no esterificados, generados por la incapacidad del adipocito para almacenar triglicéridos adecuadamente, una característica de la disfunción del tejido adiposo.

La esteatosis hepática en seres humanos cursa con la acumulación en gran parte de ácido palmítico y oleico (Puri et al, 2007). El ácido oleico es un ácido graso omega-9 monoinsaturado y el producto final de la síntesis *de novo* de ácidos grasos (Araya et al, 2004). Se ha reportado que el ácido oleico se encuentra significativamente elevado tanto en el suero circulante como en el perfil de triglicéridos hepáticos de pacientes con esteatosis hepática (Malhi & Gores, 2008). Esta observación puede asociarse a que este ácido graso es un producto importante de la lipólisis adiposa y fuente principal de ácidos grasos libres en sujetos con esteatosis hepática. Además, se ha demostrado que el ácido oleico aumenta el

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

contenido de lípidos en células HepG2 (Ricchi et al, 2009), dado que se incorpora preferentemente al triglicérido (Listenberger et al, 2003). Estos datos sugieren a la línea celular HepG2 como un buen modelo *in vitro* de esteatosis hepática (Kwan et al, 2012).

La síntesis de triglicéridos puede evaluarse a través de marcadores donde destacan; la proteína 1 ligante al elemento regulador de esteroides (SREBP-1c), la sintasa de los ácidos grasos (FAS) y las diacilglicerido aciltransferasa 1 y 2 (DGAT1/2), que se describirán brevemente a continuación.

1.7.2.1.- Proteína 1c ligante al elemento regulador de esteroides (SREBP-1c)

El SREBP-1c es un factor de transcripción que desempeña un papel clave en el metabolismo de ácidos grasos hepáticos porque activa transcripcionalmente la cascada de enzimas lipogénicas, incluyendo FAS (Palou et al, 2008). La insulina activa la transcripción del gen SREBP-1c a través de la síntesis de una forma precursora de SREBP-1c (pSREBP-1c), que está anclada en la membrana del retículo endoplasmático. La insulina activa la escisión proteolítica de la forma precursora, translocando hacia el núcleo la forma madura de SREBP-1c (mSREBP-1c) que se une a elementos de respuesta a esteroides (SRE) en el promotor de genes lipogénicos, incluyendo la FAS (Poupeau & Postic, 2011).

En el hígado, la expresión de SREBP-1c se observa sobre-regulada en modelos de ratones con obesidad y la sobreexpresión génica de SREBP-1c induce esteatosis hepática. Esto sugiere que un aumento en la abundancia de SREBP-1c en el hígado contribuye a la patogénesis de la esteatosis (Takashima et al, 2009). Por el contrario, ratones knockout de SREBP-1 mostraron una disminución en la síntesis *in vivo* de ácidos grasos en el hígado (Shimano et al, 1997). Sin embargo, la inducción de genes lipogénicos se redujo en aproximadamente un 50%, pero no se eliminó completamente mediante ablación SREBP-1c (Liang et al, 2002). Por lo tanto, la actividad de SREBP-1c por sí sola no podría ser responsable por completo de la lipogénesis en el hígado.

1.7.2.2.- Diacilglicerido aciltransferasa 1 y 2 (DGAT1/2)

Las DGATs son enzimas que se encuentran principalmente en el retículo endoplásmico y catalizan la etapa final en la síntesis de triglicéridos a partir de la acil-

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

CoA y diacilglicerol. Las enzimas DGATs determinan el flujo de lípidos hacia el triglicérido y aunque su actividad está determinada por la disponibilidad de sustrato, se ha observado que la sobreexpresión de enzimas DGATs en células hepáticas de ratones conducen a la acumulación de triglicéridos intracelulares (Monetti et al, 2007).

Dos DGATs han sido identificadas, DGAT1 y DGAT2. Estas enzimas pertenecen a dos familias de genes distintos, indicando que tienen funciones especializadas a pesar de que catalizan la misma reacción (Liu et al, 2008). En los mamíferos, DGAT1 se expresa en el músculo esquelético, piel, intestino y testículos, con menores niveles de expresión en hígado y tejido adiposo, mientras que DGAT2 está expresada en altos niveles en hepatocitos y adipocitos (Zammit et al, 2008). Los datos disponibles sugieren que DGAT2 posee mayor afinidad por ciertos sustratos que DGAT1 (Yen et al, 2008), observando en ensayos de competición que DGAT1 prefiere sustratos monoinsaturados (oleoil-CoA) en comparación con sustratos saturados (palmitoil-CoA) (Cases et al, 2001).

Dado que DGAT1 y DGAT2 juegan un rol importante en la síntesis hepática de triglicéridos, se ha indicado que ambas enzimas poseen diferencias funcionales en el hígado. Mientras que DGAT2 es principalmente responsable de la incorporación de ácidos grasos de síntesis endógena a los triglicéridos, DGAT1 juega un papel más importante en la esterificación de ácidos grasos exógenos (Qi et al, 2012). Debido a que la mayoría de los triglicéridos que produce el hígado se destinan a secreción/síntesis de VLDL, y a que DGAT2 está asociado a esta función, dicha enzima podría ser un blanco terapéutico para el tratamiento de la hipertrigliceridemia, la esteatosis hepática y la obesidad (Liu et al, 2008).

1.8.- Formulación del problema

Nuestro laboratorio ha estudiado la participación del CaSR en las alteraciones relacionadas con la obesidad e inflamación a nivel de tejido adiposo. Dada la capacidad del CaSR para elevar la expresión de citoquinas en el tejido adiposo, se generaría un ambiente proinflamatorio asociado a consecuencias funcionales tales como alteración en la adipogénesis, deterioro de la señalización de insulina, alteración en el manejo de triglicéridos y modificación en la expresión de adipoquinas. Es así como la estimulación del CaSR mantendría el estado

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

disfuncional local y por lo tanto, las complicaciones asociadas a la obesidad. Para complementar lo observado en el tejido adiposo, y por su relevancia a nivel sistémico, esta tesis propuso también explorar la participación del CaSR en la desregulación de la funcionalidad del tejido hepático. El papel del CaSR en el tejido hepático permitiría sugerir que el almacenamiento de triglicéridos en el hígado puede verse alterado ante la activación de esta proteína (exacerbada en obesidad), con lo cual podremos aproximarnos a describir un mecanismo más completo en términos fisiológicos.

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

II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

II.1.- Hipótesis

Como fue señalado anteriormente, antecedentes obtenidos en nuestro laboratorio nos permiten sugerir que la activación del CaSR genera un ambiente proinflamatorio en el tejido adiposo, lo que ejercería un efecto negativo sobre distintos aspectos de su funcionamiento (Cifuentes et al, 2008, 2010, 2012). Basados en el efecto esperado de este estado proinflamatorio, la presente tesis se centró en estudiar consecuencias funcionales de la activación del CaSR por cinacalcet, específicamente sobre el proceso adipogénico, la señalización de insulina, el almacenamiento de los triglicéridos y la actividad secretora en células adiposas.

Hipótesis: **“La activación del CaSR en células adiposas humanas afecta negativamente su funcionalidad”**.

Específicamente, la activación de CaSR determina:

- a) menor expresión génica de PPAR γ , GPD, LPL y FAS durante el proceso de diferenciación de preadipocitos
- b) nivel reducido de fosforilación de Akt en adipocitos diferenciados
- c) menor expresión de adiponectina y mayor expresión leptina y aP2 en adipocitos diferenciados
- d) menor contenido de triglicéridos y la expresión génica de PPAR γ , GPD, LPL y FAS en adipocitos diferenciados, lo que contribuye a la generación de adipocitos que exhiben una menor diferenciación adipogénica, menor almacenamiento de los triglicéridos, alteración de la actividad secretora y un deterioro en la señalización de insulina.

Sobre la base de una estrecha comunicación entre las células adiposas y hepáticas, establecida por el flujo de ácidos grasos no esterificados desde el tejido adiposo hacia el tejido hepático, en el contexto de un adipocito disfuncional, la segunda hipótesis de este trabajo es: **“la activación del CaSR aumenta el contenido de triglicéridos en hepatocitos en relación con un aumento en la expresión génica de SREBP1c, FAS y DGAT1/2”**

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

II.2.- Objetivo General

- Determinar el efecto de la activación del receptor sensor de calcio (CaSR) sobre la funcionalidad (diferenciación adiposa, señalización de insulina, almacenamiento de triglicéridos y expresión de adipoquinas) de células adiposas humanas.
- Evaluar el efecto de la activación del CaSR sobre el almacenamiento de triglicéridos en hepatocitos humanos.

II.3.- Objetivos Específicos

II.3.1. Evaluar el efecto de la activación del CaSR sobre la diferenciación adipogénica

3.1.1. Evaluar la respuesta adipogénica mediante la expresión de genes en preadipocitos LS14 expuestos a cinacalcet durante la adipogénesis

3.1.2. Contrastar los resultados de la línea celular LS14 con cultivos primarios de adipocitos humanos

II.3.2. Evaluar el efecto de la activación del CaSR sobre la señalización de insulina

3.2.1. Evaluar la activación (fosforilación) de proteínas intracelulares de señalización de insulina (PKB/Akt y/o IRS-1) en adipocitos maduros humanos LS14 diferenciados

3.2.2. Contrastar los resultados de la línea celular LS14 con adipocitos aislados de tejido adiposo visceral humano.

II. 3.3. Evaluar el efecto de la activación del CaSR sobre el almacenamiento de triglicéridos en adipocitos

3.3.1. Evaluar la acumulación de triglicéridos en adipocitos LS14 diferenciados expuestos a cinacalcet

3.3.2. Evaluar la expresión de genes lipogénicos en adipocitos LS14 diferenciados expuestos a cinacalcet

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

II.3.4. Evaluar el efecto de la activación del CaSR sobre actividad secretora de adipocitos

3.4.1. Evaluar la expresión y/o secreción de leptina, adiponectina y aP2 en adipocitos LS14 diferenciados expuestos a cinacalcet

3.4.2. Contrastar las observaciones con cultivos primarios de adipocitos y/o explantes de tejido adiposo humano

II.3.5.- Evaluar el efecto de la activación del CaSR sobre el manejo de triglicéridos en modelo celular hepático

4.1.1. Evaluar el contenido intracelular de triglicéridos en hepatocitos HepG2 expuestos a cinacalcet

4.1.2. Evaluar la expresión de genes lipogénicos en hepatocitos HepG2 expuestos a cinacalcet

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

III. MATERIALES Y MÉTODOS

III.1.- Línea celular LS14

Esta línea celular derivada de un liposarcoma humano exhibe las características de las células preadiposas humanas y cursa la diferenciación adipogénica, ante la exposición a un cocktail adipogénico (Hugo et al, 2006). Su uso como modelo para el estudio de la estimulación del CaSR en la diferenciación adipogénica está avalado por los resultados obtenidos durante el curso de los proyectos realizados en el Laboratorio de Nutrición Básica y Epidemiología Genética, particularmente los proyectos Fondecyt (1110157 y 1150651) en los que se enmarcó esta tesis (Cifuentes et al, 2010, 2012).

El cultivo de células LS14 se realizó según los procedimientos habituales utilizados en el laboratorio. Las células fueron crecidas en un medio DMEM: F12 (1:1) suplementado con antibióticos (penicilina y estreptomycin) y con 10% de suero fetal bovino (SFB) en un incubador con atmósfera controlada (5% CO₂ y 37°C).

III.2.- Explantes de tejido adiposo humano y cultivos de adipocitos humanos primarios

III.2.1.- Sujetos

Los voluntarios fueron pacientes sometidos a cirugía abdominal electiva en la Clínica Indisa, en Santiago de Chile. Durante la cirugía se extrajeron aproximadamente entre 10 y 15 g de grasa visceral abdominal (epiplón mayor) que fueron obtenidas a partir de adultos de ambos sexos. Todos los participantes del estudio firmaron un consentimiento informado (aprobado por el Comité de Ética del INTA y por el Servicio de Salud Metropolitano Oriente).

III.2.2.- Obtención y cultivo de preadipocitos a partir de explantes de tejido adiposo

Una vez realizada la cirugía, las muestras de tejido adiposo fueron transportadas a nuestro laboratorio, sumergidas en solución salina estéril. En el laboratorio, el tejido se lavó varias veces con solución salina, y fue picado en trozos pequeños (2-3 mm²) eliminando todo el tejido conectivo visible, coágulos de sangre y los vasos sanguíneos. Para la obtención de preadipocitos, el tejido adiposo fue

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

sometido a digestión para aislar los adipocitos y las células progenitoras de adipocitos (contenidas en la fracción estroma vascular), de acuerdo al procedimiento previamente descrito (Cifuentes & Rojas, 2008). El tejido fue incubado con 1 g/L de colagenasa tipo I (Worthington Biochemical Corp. Lakewood, NJ, USA) a 37 °C durante 60 minutos. Luego se filtró a través de gasa estéril y se separaron los adipocitos flotantes. El remanente de la digestión se centrifugó a 800xg durante 10 minutos, se eliminó el sobrenadante y el pellet celular se resuspendió para luego sembrarlo en DMEM: F12 (1:1) suplementado con FBS al 10% y antibióticos al 1% (penicilina-estreptomina).

III.2.3.- Obtención de adipocitos aislados del tejido adiposo

Luego de la separación de los adipocitos flotantes y después de 3 lavados con solución HBSS, se preparó una suspensión de adipocitos al 25% en M-199, para experimentos de señalización de insulina.

III.3.- Diferenciación adipogénica

Para diferenciar las células preadiposas LS14 y primarias a adipocitos, se sembró células progenitoras a una densidad de 35.000-40.000 células/cm², y se las expuso al medio adipogénico, consistente en DMEM: F12 1:1 (sin SFB) suplementado de isobutilmetilxantina (IBMX) 0,5 mM, insulina 10 µg/mL y dexametasona 0,25 µM. A partir del séptimo día de diferenciación y ante la constatación bajo el microscopio de cambios morfológicos y la presencia de gotas citoplasmáticas de lípidos, se realizaron los experimentos, manteniendo en el medio de cultivo las condiciones de diferenciación.

III.4.- Línea celular HepG2

La línea celular HepG2 de la American Type Culture Collection (ATCC) fue derivada de un carcinoma hepatocelular humano (HB-8065) y ha sido validada como modelo de hepatocitos humanos (Bokhari et al, 2007). Las células HepG2 fueron mantenidas en un medio mínimo esencial (MEM), con suero fetal bovino (SFB) al 10% suplementado con antibióticos al 1% (penicilina/estreptomina). Las células fueron crecidas en una atmósfera controlada a 37 °C con 5% de CO₂.

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

III.5.- Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR)

El ARN total se obtuvo luego de lisar las células utilizando Trizol® (Invitrogen, Life Technologies INC., USA). El ARN fue extraído utilizando el Mini Kit PureLink™ RNA (Invitrogen), de acuerdo a las indicaciones del fabricante. La transcripción reversa se realizó usando High Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems, USA). La expresión de RNAm se evaluó en Step-one Real-time PCR System (Applied Biosystems, USA), utilizando SYBR® FAST qPCR Kit (Applied Biosystems). Se utilizaron partidores que han sido previamente validados en nuestro laboratorio (Tabla 1). Las condiciones de los ciclos térmicos consistieron en una preincubación de 20 seg a 95 °C seguido de 40 ciclos a 95 °C durante 3 segundos y 60 °C durante 30 seg. Los resultados se normalizaron por el gen GAPDH que mostró una expresión estable para todos los ensayos, siendo además utilizado como control interno de cada experimento. La expresión se calculó usando el modelo Pfaffl (Pfaffl, 2001). Todos los ensayos se realizaron en duplicado.

Tabla 1. Secuencia de partidores para PCR en tiempo real

Target mRNA	Acceso	Partidor Forward (5'→ 3')	Partidor Reverse (5'→ 3')
CaSR	NM_001178065	GATGAGACAGATGCCAGTGC	AAAGAGGGTGAGTGCGATCC
PPAR γ	NM_015869.4	AGCAAAGGCGAGGGCGATCTTG	GGATGGCCACCTCTTTGCTCTGC
LPL	NM_000237.2	TGGTGATCCATGGCTGGACGGT	AGCCCGCGGACACTGGGTAA
FAS	NM_004104.4	GGAAGCTGCCAGAGTCGGAGAACT	TGAGGGTCCATCGTGTGTGCCT
GPD	NM_005276.2	GGCTGAGGCCTTTGCGCGTA	ACTGGCTGGCCCTCGTAGCA
SREBP1c	NM_001005291.2	ACACAGCAACCAGAAACTCAAG	AGTGTGTCTCCACCTCAGTCT
DGAT1	NM_012079.5	GAGCTACCCGGACAATCTGA	AGCTGGGTGAAGAACAGCAT
DGAT2	NM_032564.3	GGCAGGCAACTTCCGAATGCCT	AAAGCCCTTGCGGTTCCGCA
GAPDH*	NM_002046	GAAGGTGAAGGTCGGAGTCAAC	CAGAGTTAAAGCAGCCCTGGT

*Gen control (Housekeeping).

III.6.- PCR y electroforesis en gel de agarosa

Para el análisis de la expresión del CaSR en células hepáticas, las amplificaciones se realizaron a partir del templado descrito en el punto 5, utilizando la enzima Gotaq Master Mix (Promega, USA) en el termociclador Biometra® Personal Cycler (Göttingen, Alemania). Las condiciones de los ciclos fueron: preincubación de 2

Receptor sensor de calcio (CaSR) y disfunción del tejido adiposo: diferenciación, señalización de insulina, almacenamiento de triglicéridos, expresión de adipocinas y manejo de triglicéridos en el hígado

minutos a 95 °C seguido de 40 ciclos a 95 °C durante 30 segundos, 60 °C durante 30 segundos y 72 °C durante 30 segundos, finalizando con una extensión a 72 °C durante 5 minutos. El producto de PCR se observó por electroforesis en un gel de agarosa (1,5% en buffer TBE 1X), teñido con bromuro de etidio al 1% y corrido entre 40-60 minutos a 80 volts. Las bandas de ADN fueron observadas bajo luz UV.

III.7.- Cuantificación del contenido de triglicéridos por fluorimetría

Para la medición de triglicéridos, las células fueron tratadas con 0,25% de solución de tripsina e incubadas a 37°C por 10 minutos o hasta que se perdiera su adherencia a la placa de cultivo. Posteriormente fueron lavadas con PBS e incubadas con Nile Red (Sigma N-3013) 1µl/ml disuelto en PBS por 5-7 minutos a temperatura ambiente. La fluorescencia fue evaluada utilizando filtros 485nm de excitación y 572nm de emisión mediante el instrumento Synergy 2 (Biotek®). Los resultados fueron normalizados por el contenido de proteína medida mediante el método basado en el ácido bicinonínico (Pierce).

III.8.- Tinción con Oil Red O

Para la tinción de las gotas de lípidos se retiró el medio de cada pocillo y las células fueron lavadas en PBS al 10%. Luego, las células fueron fijadas en formaldehído al 10% durante 1 hora a temperatura ambiente y posteriormente lavadas dos veces en PBS, dejando el tercer lavado con isopropanol al 60%. Se removió el isopropanol y cada pocillo se secó completamente antes de agregar la solución de Oil Red O (Sigma-Aldrich) al 0.35% (seis partes de Oil Red O y cuatro partes de agua desionizada) en isopropanol durante 10 min a temperatura ambiente, seguido del lavado en 1 mL en agua tres veces para eliminar el colorante no unido. Las gotas de lípidos de las células fueron visualizadas utilizando un microscopio invertido (MOTIC AE2000) conectado a una cámara digital (Olympus DP71).

III.9.- Evaluación de la viabilidad celular

Se evaluó viabilidad celular por colorimetría a través del ensayo CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (MTS) (Promega, USA) de acuerdo a las condiciones descritas por el fabricante en un espectrofotómetro de escaneo multipocillo ELx808 microplate reader (BioTek Instruments, Inc, USA). Las células

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

HepG2 fueron sembradas a una densidad de 3×10^3 células/cm². Después de 24 horas de incubación se realizó un cambio de medio y se inició el tratamiento de las células en las condiciones experimentales por 72 horas. Posteriormente cada pozo fue tratado con 20 µL del reactivo 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium (MTS) y se incubó por 3 horas a 37 °C. El colorante de formazán producido por las células metabólicamente activas se cuantificó a través de la medición de absorbancia a una longitud de onda de 490 (restándole la lectura a 630nm para descartar el background de acuerdo con las recomendaciones del fabricante).

III.10.- Evaluación de la expresión de proteínas

III.10.1.- Obtención de lisado celular

Posterior a los tratamientos de las células, se removió el medio de cultivo. En condiciones de frío, se lavaron las células 3 veces con PBS (Dulbeco, Gibco) y se procedió a su lisis con un tampón que contiene: Hepes 50 mM (pH 7,4); NaCl 150mM; MgCl₂ 2 mM; EGTA 2 mM; 1% Triton X-100; Glicerol 10%, más inhibidores de proteasa y fosfatasa: PMSF 2 mM; Pepstatina 2 µg/mL; Leupeptina 2 µg/mL; Aprotinina 10 µg/mL; Ortovanadato de sodio 1 mM. Las placas fueron raspadas para coleccionar todo el lisado celular, el que fue transferido a tubos Eppendorf. Se separó la fracción insoluble por centrifugación a 12.000 g. La fracción soluble (sobrenadante) fue traspasada a un nuevo tubo y se congeló a -80 °C hasta su análisis. En una alícuota se determinó la cantidad de proteína mediante el método del ácido bicinónico.

III.10.2.- Western Blot

Se evaluó la presencia de las proteínas propuestas en los lisados celulares mediante inmunodetección (Western Blot). Cantidades equivalentes de proteína se sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida al 7,5% y 10% (CaSR y P-Akt respectivamente) en condiciones denaturantes, luego las proteínas fueron transferidas a una membrana PDVF utilizando un buffer que contiene Tris (24 mM), glicina (194 mM) y 20% de metanol. Para la inmuno detección, y previo bloqueo de la membrana con una solución de leche descremada al 3% en solución Tris con 0,05% de Tween 20 (Sigma), se utilizaron anticuerpos que reconocen la proteína CaSR (6D4) (Santa Cruz Biotechnology, Inc), Hsp90 (Santa Cruz Biotechnology, Inc), Phospo-Akt (ser473) (Cell

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

Signaling 9271), Akt (Cell Signaling 9272). La detección de los complejos inmunes se realizó a través de la incubación con anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa, seguido de la incubación con los sustratos de la enzima y expuestos a placas sensibles a quimoluminiscencia. Las imágenes fueron digitalizadas y la densidad de las bandas fue cuantificada mediante el programa Image J (National Institutes of Health, USA).

III.11.- Análisis estadístico de los datos

Para comparar las diferencias entre las células controles y tratadas, las variables se evaluaron utilizando estadística no paramétrica, dado que el tamaño muestral fue inferior a 20. Para establecer diferencias entre 2 condiciones experimentales se consideró la prueba de Wilcoxon y para aquellos análisis que tenían más de 2 condiciones experimentales se evaluó la prueba de Friedman, con comparaciones múltiples de Dunns, según correspondiera. Los datos se muestran en las figuras con sus medianas y fue considerado significativo un valor de p inferior a 0,05. Los experimentos fueron realizados un mínimo de 3 veces.

Para el análisis de asociación de expresión génica se utilizó una correlación de Spearman y se usó la información de todos los genes estudiados en los adipocitos. Dado que se generó una matriz con todos los genes, se realizó una corrección del valor p por comparaciones múltiples ($k(k-1)/2$, donde k=número de genes) para disminuir la probabilidad de aparición de falsos positivos. En esta circunstancia la significancia del 5% se corrigió por una de 0,2%. De acuerdo a esta corrección se consideró un valor p significativo menor a 0,002 (Martinez-Cambor, 2012).

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

IV. RESULTADOS

Con el fin de evaluar distintos aspectos funcionales de la activación del CaSR en el tejido adiposo, la presente tesis abordó los efectos de la estimulación de esta proteína sobre la diferenciación adipogénica, el manejo de triglicéridos, la expresión de adipoquinas y la señalización de insulina en el adipocito.

También se evaluó el efecto de la estimulación de CaSR en hepatocitos, otro modelo relevante en el contexto de las enfermedades asociadas a la obesidad.

IV.1.- Evaluación del efecto de la activación del CaSR sobre la diferenciación adipogénica

IV.1.1.- Diferenciación de células LS14

Como primer paso, se realizó la validación de la diferenciación de los preadipocitos LS14 luego de 10 días de exposición al cocktail adipogénico. En este contexto adipogénico, se evaluó el contenido intracelular de triglicéridos y la expresión génica de diversos marcadores de adipocito diferenciado, como son los marcadores adipogénicos PPAR γ , GPD, LPL y FAS, y los factores de secreción aP2 y adiponectina.

En la figura 1 se observa que la diferenciación de células LS14 incrementa 134% el contenido de lípidos intracelulares, indicando que el protocolo experimental usado incrementa el contenido celular de triglicéridos. La diferenciación adiposa también se evaluó morfológicamente, constatándose el paso de una forma alargada, tipo fibroblasto, hacia una redondeada, tipo adipocito, así como la presencia de gotas de lípidos citoplásmicos, luego de 10 días de diferenciación (Figura 1).

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

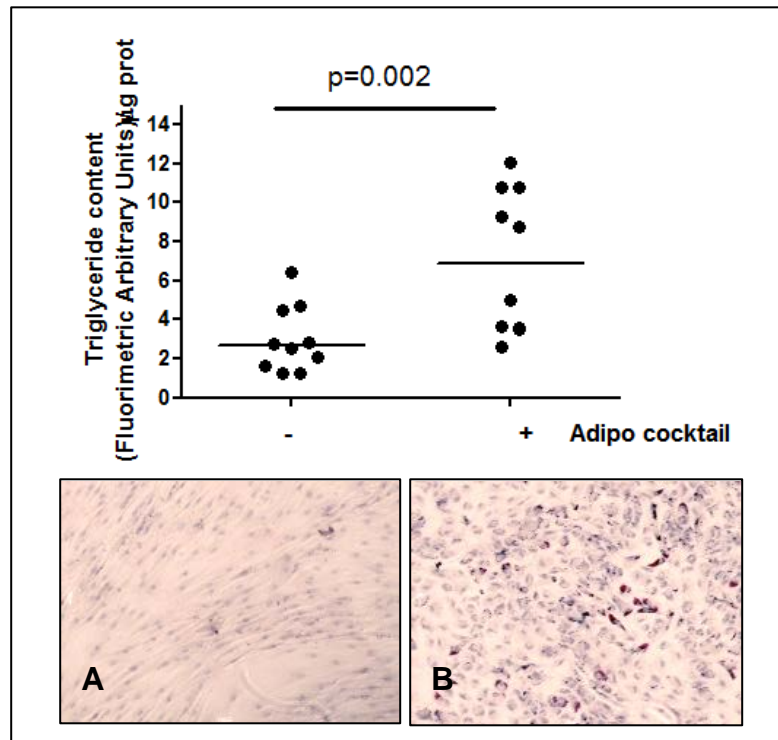


Figura 1. Contenido de triglicéridos en células LS14. Células LS14 después de 10 días de exposición al cocktail adipogénico comparado con las células control no expuestas. El contenido de triglicéridos se evaluó por fluorimetría usando Nile Red. Las barras representan la mediana. Prueba de Wilcoxon para datos pareados (n=10). Las fotografías representan células LS14 después de 10 días de exposición al cocktail adipogénico (B) comparado con las células control no expuestas (A). El contenido de triglicéridos se evaluó con tinción de Oil Red O (10x).

La validación de la diferenciación también consideró la evaluación de genes de adipocito diferenciado, incluyendo PPAR γ , GPD, LPL y FAS, y los factores de secreción aP2 y adiponectina. Todos los experimentos fueron normalizados por la expresión de GAPDH, gen control que manifestó un comportamiento estable e independiente de los tratamientos en la línea celular LS14 (Anexo 2). Como se observa en la Figura 2, las células LS14 mostraron un aumento significativo en la expresión de marcadores adipogénicos con respecto al cultivo control no diferenciado.

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

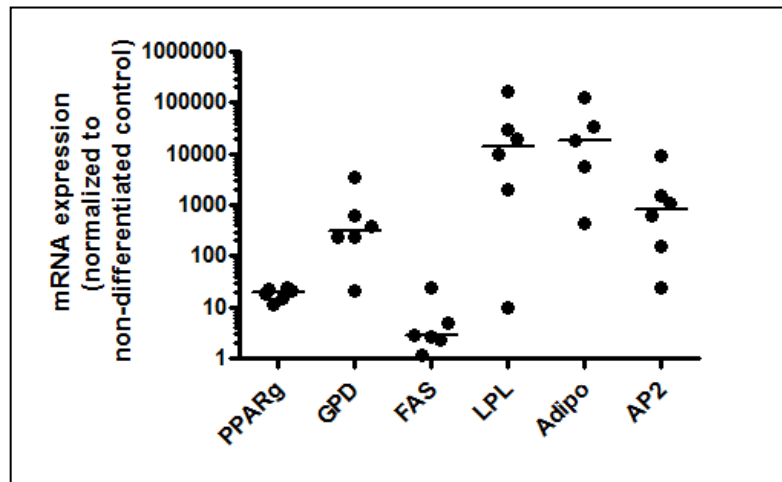


Figura 2. Expresión de genes adipogénicos en células LS14. Expresión de marcadores de adipocito maduro después de 10 días de exposición al estímulo adipogénico (qPCR). GAPDH se utilizó como control interno. Resultados normalizados a 1 (representa el control no diferenciado). Las barras horizontales representan la mediana para cada gen, $p < 0,0001$, prueba de Wilcoxon para una muestra (versus valor 1). Dadas las diferencias en la magnitud de la respuesta entre los diferentes genes, los datos se expresan en escala logarítmica ($n=6$ experimentos, realizados cada uno en duplicado). (Villaruel et al, 2013).

Cabe destacar que los ciclos umbral (CT) en células diferenciadas y controles para todos los genes expuestos confirman que existe expresión basal de RNAm, demostrando que las grandes diferencias entre células controles y diferenciadas no son un artificio matemático producto de un extremadamente bajo o “inexistente” nivel basal (Anexo 3).

Una vez validado el cocktail de diferenciación, se comprobó el efecto de la exposición a cinacalcet de manera simultánea a este estímulo sobre la respuesta de genes que codifican para marcadores adipogénicos.

IV.1.2.- Efecto de la activación del CaSR sobre la respuesta adipogénica en preadipocitos de la línea celular LS14

Para observar el efecto del agonista alostérico del CaSR en el proceso de diferenciación adipogénica, se expuso preadipocitos LS14 a cinacalcet (1 μ M). Esta concentración de cinacalcet fue previamente validada en experimentos de nuestro grupo (Cifuentes & Rojas, 2008) y no tiene efectos sobre la muerte celular (Anexo 4).

Las células LS14 fueron expuestas a cinacalcet junto con la adición del cocktail adipogénico, manteniéndose ambos estímulos durante todo el proceso. Se evaluó la expresión de PPAR γ , GPD, FAS, LPL, adiponectina y aP2 después de 10 días de estimulación. Al evaluar la respuesta adipogénica, se observó un aumento significativo en la expresión génica de PPAR γ , GPD, FAS, adiponectina y aP2 (LPL muestra una tendencia al aumento) en relación al control diferenciado expuesto al vehículo (Figura 3).

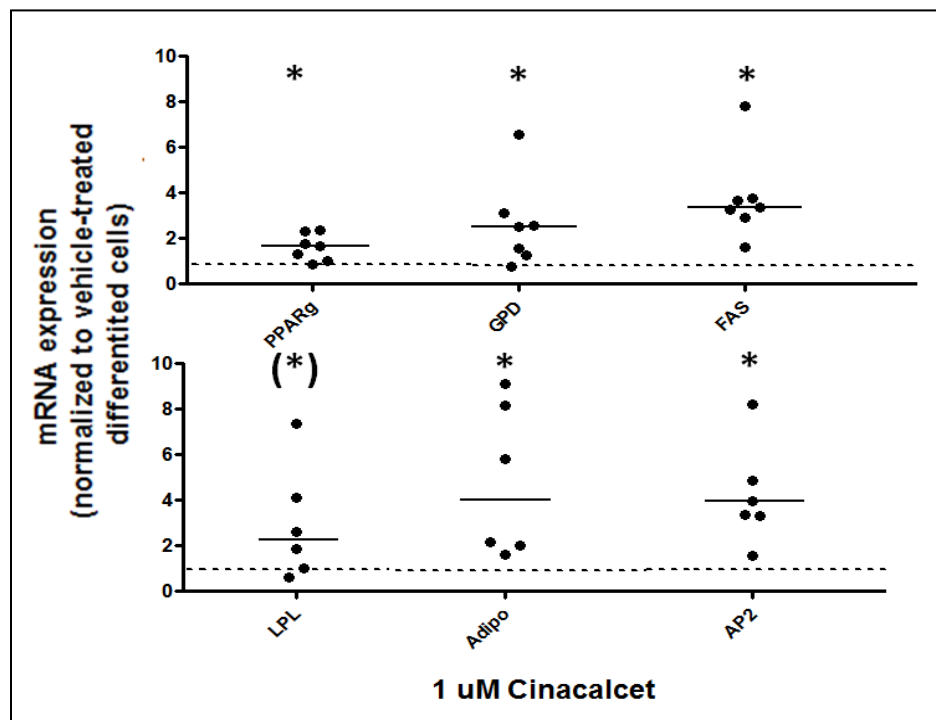


Figura 3. Efecto de cinacalcet sobre la expresión de marcadores adipogénicos en células LS14. Células LS14 diferenciadas durante 10 días y expuestas simultáneamente a 1 μ M de cinacalcet. Resultados normalizados a 1 representado por la línea de puntos (control expuesto al vehículo). Las barras horizontales representan la mediana, * $p < 0,05$, (*) $p = 0,09$, prueba de Wilcoxon para una muestra (versus valor 1) ($n=6-7$ experimentos, realizados cada uno en duplicado) (Villarroel et al, 2013).

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

Adicionalmente destacamos que la estimulación del CaSR sin el cocktail de diferenciación no representa un cambio en la expresión de marcadores que codifican para genes de diferenciación adiposa (Anexo 5), pudiendo validar que la exposición a cinacalcet no tiene efectos adipogénicos por si solo.

IV.1.3.- Efecto de la activación del CaSR sobre la respuesta adipogénica en preadipocitos derivados de tejido adiposo humano

En los cultivos primarios de tejido adiposo omental (Figura 4), el estímulo adipogénico de manera simultánea a la exposición a cinacalcet durante 10 días generó un aumento significativo en la expresión de LPL, GPD, aP2 y adiponectina. Este antecedente es consistente con la respuesta observada en células LS14.

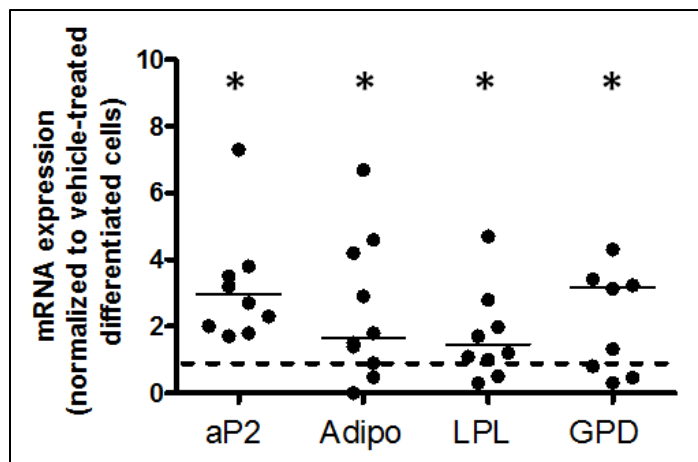


Figura 4. Efecto de cinacalcet sobre la expresión de marcadores adipogénicos en preadipocitos derivados de tejido adiposo humano. Cultivo primario de preadipocitos humanos diferenciados durante 10 días y exposición simultánea a cinacalcet (1 μ M), normalizada por el control diferenciado expuesto al vehículo (valor 1, representado por la línea de puntos). La figura representa la mediana, * $p < 0,0001$ para cada gen frente a su control, prueba de Wilcoxon para una muestra (versus valor 1) ($n = 10$ sujetos evaluados en duplicado) (Villarrol et al, 2013).

Receptor sensor de calcio (CaSR) y disfunción del tejido adiposo: diferenciación, señalización de insulina, almacenamiento de triglicéridos, expresión de adipocinas y manejo de triglicéridos en el hígado

IV.2.- Evaluación del efecto de la activación del CaSR sobre la señalización de insulina

El tejido adiposo del obeso se caracteriza frecuentemente por la infiltración de macrófagos proinflamatorios, la generación de un mayor número de especies reactivas de oxígeno y un aumento en la producción de citoquinas proinflamatorias. Estos fenómenos ocurren mayormente en el tejido adiposo visceral (en comparación con el subcutáneo), y podrían estar involucrados en la resistencia a la insulina, ya que interfieren con la ruta de la señalización de esta hormona. Nuestra evidencia de la producción de citoquinas proinflamatorias, junto con un aumento de la adipogénesis visceral (sección anterior) asociados a la activación del CaSR, nos llevó a estudiar si estos eventos podrían asociarse con una alteración en la sensibilidad a la insulina en adipocitos LS14 y viscerales en cultivo primario.

Para evaluar la señalización de insulina en células LS14 expuestas a cinacalcet, determinamos el efecto de la activación del CaSR sobre la fosforilación de Akt. La figura 5 indica que la activación del CaSR inducida por cinacalcet no produce un cambio significativo en la fosforilación de Akt, ya sea en condiciones basales o ante el estímulo con insulina.

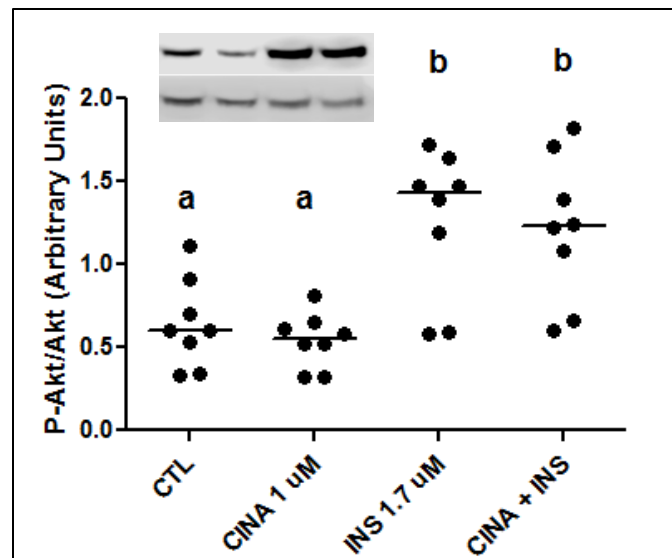


Figura 5. Efecto de la activación del CaSR sobre la señalización de la insulina en adipocitos diferenciados LS14. Las células fueron deprivadas de insulina por 3 horas y el contenido de proteína Akt fosforilada y total se evaluó por Western blot después de 15 minutos de exposición a la insulina (1,7 μ M) luego de una preincubación (1 hora) con cinacalcet 1 μ M. Diferentes letras representan diferencias significativas ($p < 0,05$), prueba de Friedman y de comparación múltiple de Dunns ($n = 8$). El inserto muestra un blot representativo.

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

Con el objeto de comparar estos resultados con los obtenidos en un modelo de cultivo primario, se evaluó la activación de Akt en adipocitos aislados desde tejido adiposo humano. Como se observa en la figura 6, y consistente con lo observado en células LS14, la activación del CaSR no muestra una respuesta en la fosforilación de Akt en adipocitos aislados de tejido adiposo visceral.

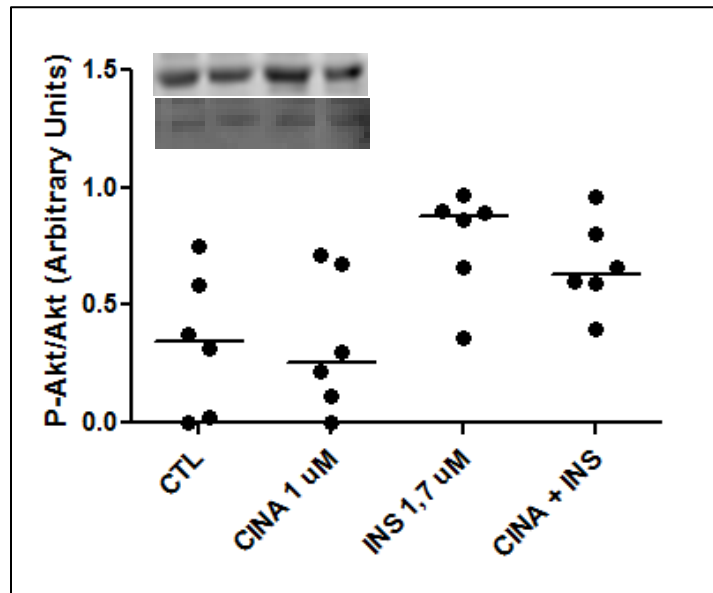


Figura 6. Efecto de la activación del CaSR sobre la señalización de la insulina en adipocitos aislados de tejido adiposo humano. Las células fueron deprivadas de insulina por 3 horas y el contenido de proteína Akt fosforilada y total se evaluó por Western blot después de 15 minutos de exposición a la insulina (1,7 μ M) luego de una preincubación (1 hora) con cinacalcet 1 μ M. Prueba de Friedman ($p=0,1$). El inserto muestra un blot representativo. ($n=6$).

Dado la variabilidad de la respuesta a la insulina en adipocitos aislados se analizaron las muestras de manera individual, pudiendo observar que existen sujetos que efectivamente responden al efecto de la insulina, sin embargo existe otro grupo de muestras que no varía la abundancia de p-Akt frente al estímulo insulínico. Este último grupo tiene como característica que la cantidad basal de p-Akt es elevada, lo que no podría explicar la ausencia de aumentos significativos por efecto de la insulina. La mayor cantidad basal de p-Akt podría guardar relación con hiperinsulinemia, asociada a la obesidad presente en todos los sujetos (datos no mostrados). Para ambos grupos de pacientes donantes de tejido adiposo (respondedores y no respondedores a insulina) se analizaron las características antropométricas y bioquímicas (Anexo 6), no apreciándose diferencias en los parámetros metabólicos ni de composición corporal en adipocitos aislados provenientes de sujetos en cuyos adipocitos p-Akt respondió a la

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

insulina comparado con los que no respondieron al efecto de la insulina en el medio de cultivo.

De acuerdo a los resultados antes mostrados, donde se observó una mayor expresión de genes adipogénicos por efecto de la estimulación del CaSR durante la diferenciación de adipocitos, cabe preguntarse si la activación de esta proteína puede afectar otros procesos relevantes en el metabolismo del tejido adiposo. Siguiendo esta idea, se decidió explorar en la acumulación de triglicéridos en el tejido adiposo visceral. Por esto, el tercer objetivo de esta investigación abordó el estudio del efecto de cinacalcet sobre el manejo de los triglicéridos en la línea celular LS14.

IV.3.- Evaluación del efecto de la activación del CaSR sobre el manejo de triglicéridos en adipocitos

La generación de triglicéridos precisa la participación de una variedad de enzimas que comprometen la síntesis de ácidos grasos y de glicerol-3-fosfato. Este trabajo estudió el efecto de la estimulación del CaSR sobre el contenido de triglicéridos intracelulares y la expresión de marcadores lipogénicos (PPAR γ , LPL, FAS y GPD) en adipocitos LS14.

IV.3.1- Efecto de la activación del CaSR sobre el contenido intracelular de triglicéridos en la línea celular LS14

Para estas determinaciones, el protocolo experimental difiere del expuesto en la Figura 3 debido a que para observar el efecto de la activación del CaSR sobre el manejo de los triglicéridos necesitamos contar con adipocitos que muestren lípidos intracelulares, por lo tanto estos experimentos precisan adipocitos diferenciados por 7 días y luego estimulados con cinacalcet.

Para este objetivo, se evaluó la acumulación de lípidos mediante el método fluorimétrico, donde se observó que la activación del CaSR disminuye en un 21% el contenido de triglicéridos en adipocitos LS14 diferenciados *in vitro*, en comparación con las células diferenciadas expuestas al vehículo (Figura 7).

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

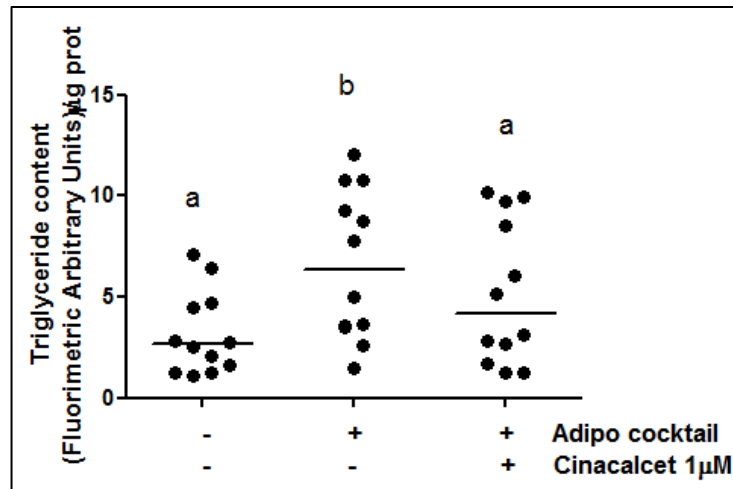


Figura 7. Efecto de cinacalcet sobre el contenido de triglicéridos en células LS14. Adipocitos LS14 diferenciados por 7 días y expuestos a cinacalcet (1 µM) por 72 horas (día 7 al 10). El contenido de triglicéridos fue medido por fluorimetría usando Nile Red. Diferentes letras representan diferencias significativas ($p < 0,05$), prueba de Friedman y comparación múltiple de Dunns (n=12).

La disminución del contenido de triglicéridos intracelulares ante la activación del CaSR, fue un hallazgo inesperado, dada nuestra observación anterior del efecto pro adipogénico en preadipocitos tratados con Cinacalcet (Figura 3). Sin embargo es plausible que la respuesta a cinacalcet del adipocito ya diferenciado sea distinta a la del preadipocito tratado con cinacalcet durante su proceso de diferenciación en forma continua por 10 días. Este resultado podría estar explicado por la presencia de triglicéridos intracelulares y el desarrollo de una fisiología adaptada para manejar lípidos, en el caso de los adipocitos diferenciados, que no poseen los preadipocitos.

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

IV.3.2.- Efecto de la activación del CaSR sobre la expresión de marcadores lipogénicos en la línea celular LS14

Para confirmar la disminución de los triglicéridos por efecto de la activación del CaSR, se evaluó la expresión de genes lipogénicos (PPAR γ , GPD, LPL y FAS) en células LS4 diferenciadas. Se observó que el tratamiento con cinacalcet disminuye la expresión de las enzimas lipogénicas GPD en un 34% y LPL 20% (Figura 8), lo que resulta consistente con la disminución de los triglicéridos intracelulares expuesta anteriormente.

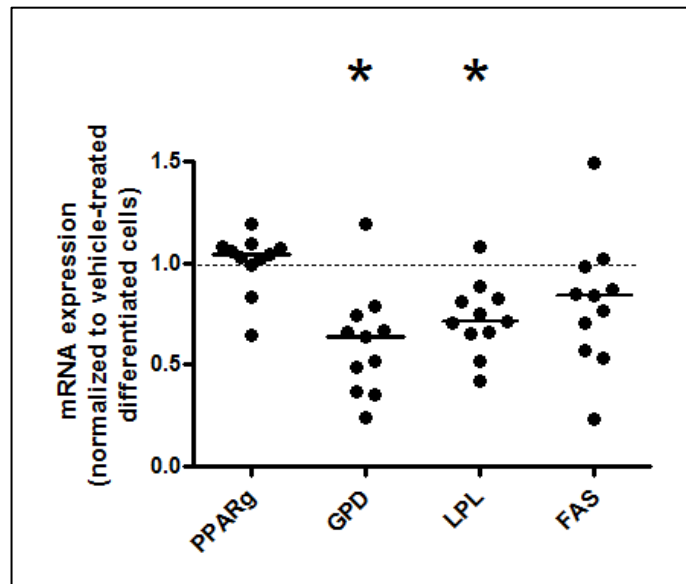


Figura 8. Efecto de cinacalcet sobre la expresión del RNAm de marcadores lipogénicos (PPAR γ , GPD, LPL, FAS) en células adiposas LS14 diferenciadas. Los adipocitos LS14 fueron diferenciados por 7 días y tratados el día 7 con cinacalcet 1 μ M durante 24 horas. Las barras horizontales representan mediana para cada gen frente a su propio control diferenciado tratado con vehículo, normalizado al valor 1 (representado por la línea). * $p < 0.05$, prueba de Wilcoxon para una muestra (versus valor 1) ($n=10$ experimentos, realizados cada uno en duplicado).

Dada la estrecha relación que se puede esperar entre la expresión génica de PPAR γ , GDP, LPL y FAS, se evaluó la asociación de la expresión entre estos marcadores en respuesta a la exposición a cinacalcet en adipocitos humanos diferenciados de la línea celular LS14.

Receptor sensor de calcio (CaSR) y disfunción del tejido adiposo: diferenciación, señalización de insulina, almacenamiento de triglicéridos, expresión de adipocinas y manejo de triglicéridos en el hígado

IV.3.3.- Asociación entre la expresión de marcadores lipogénicos en adipocitos LS14 ante la exposición a cinacalcet.

Al analizar el proceso lipogénico encontramos que podría existir una relación entre la expresión génica de enzimas involucradas en la acumulación de triglicéridos en adipocitos diferenciados estimulados con cinacalcet. Entre estas posibles relaciones propusimos evaluar la asociación de GPD y dos enzimas involucradas en diferentes rutas que proveen ácidos grasos: LPL que libera ácidos grasos desde triglicéridos lipoproteicos y FAS que sintetiza ácidos grasos *de novo*. Además también se muestra la asociación entre LPL y FAS. Como fue señalado en la sección métodos, en estas evaluaciones la significancia se establece en $p < 0,002$.

En la Figura 9 se observa que al relacionar GPD y LPL existe una fuerte tendencia a una directa relación ($p = 0,008$), involucrando un efecto del CaSR sobre la síntesis de triglicéridos a partir del glicerol-3-fosfato (reacción catalizada por GPD) y la contribución de ácidos grasos provenientes de la dieta dado por LPL. El estudio de asociación entre GPD y FAS mostró una correlación significativa, podría sugerir que ambas enzimas trabajan de manera concertada en la síntesis del triglicérido frente a la estimulación del CaSR. No obstante, podemos indicar que este no es un efecto generalizado para todos los genes relacionados con el metabolismo lipídico, ya que al estimular el CaSR no se observa una correlación entre LPL y FAS ($p = 0,262$).

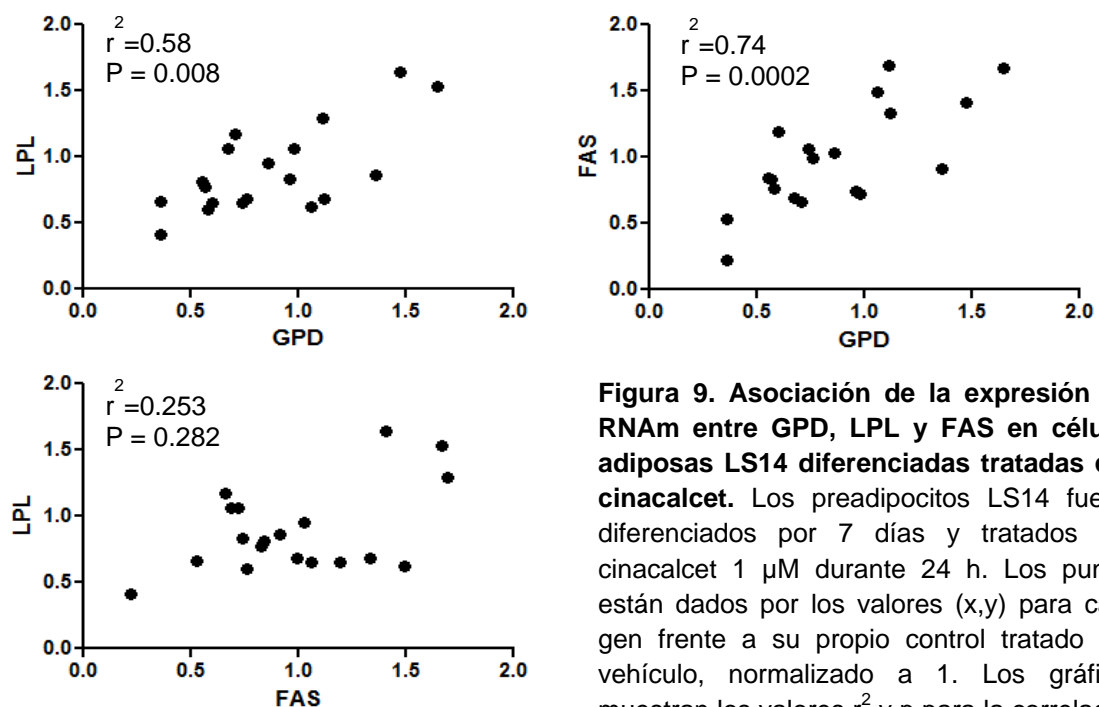


Figura 9. Asociación de la expresión del RNAm entre GPD, LPL y FAS en células adiposas LS14 diferenciadas tratadas con cinacalcet. Los preadipocitos LS14 fueron diferenciados por 7 días y tratados con cinacalcet 1 μ M durante 24 h. Los puntos están dados por los valores (x,y) para cada gen frente a su propio control tratado con vehículo, normalizado a 1. Los gráficos muestran los valores r^2 y p para la correlación de Spearman ($n = 18$).

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

Si bien la relevancia de la acumulación de triglicéridos en el tejido adiposo es indiscutible, el adipocito es considerado como mucho más que una célula de almacenaje. En la actualidad se le reconoce como una célula capaz de sintetizar y liberar un gran número de factores endocrinos, paracrinos y autocrinos de naturaleza lipídica y proteica. Por esto, el conocimiento del tejido adiposo como órgano secretor y endocrino, permite comprender la relación entre éste y la inflamación, la resistencia a la insulina y la enfermedad cardiovascular.

IV.4.- Evaluación del efecto de la activación del CaSR sobre actividad secretora

El tejido adiposo blanco libera productos de secreción que intervienen en la regulación de la homeostasis glucídica (aP2), y la ingesta y el gasto energético (leptina, adiponectina), entre muchos otros. Dado el origen principalmente adiposo y la relevancia metabólica de estos productos de secreción (Fantuzzi, 2005), la presente tesis abordó el efecto de cinacalcet sobre la expresión de aP2, leptina y adiponectina en células adiposas LS14 sometidas a diferenciación adipogénica.

IV.4.1.- Efecto de la activación del CaSR sobre la expresión de aP2, leptina y adiponectina en adipocitos LS14

Para este objetivo, se trabajó con un modelo de adipocitos diferenciados por 7 días y luego expuestos a cinacalcet, dado que estos adipocitos tienen la capacidad de secretar adipoquinas. Estos experimentos mostraron que la activación del CaSR disminuye la expresión (RNAm) de adiponectina, no obstante aP2 ($p=0,23$) y leptina ($p=0,29$) no muestran diferencias frente a la exposición a cinacalcet (Figura 10).

Receptor sensor de calcio (CaSR) y disfunción del tejido adiposo: diferenciación, señalización de insulina, almacenamiento de triglicéridos, expresión de adipocinas y manejo de triglicéridos en el hígado

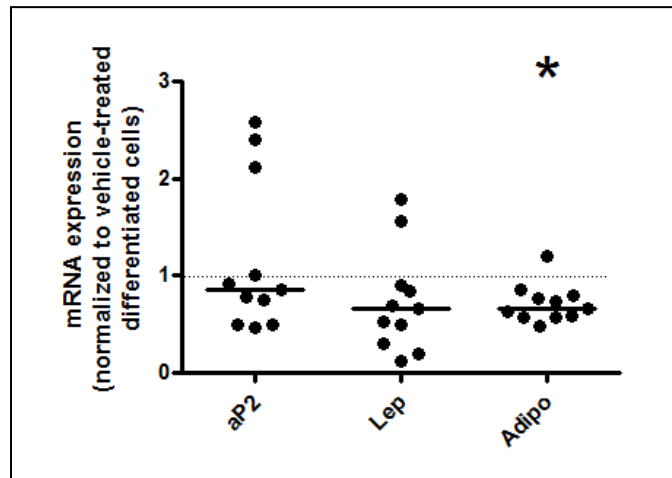


Figura 10. Efecto de cinacalcet sobre la expresión de genes que codifican para productos de secreción (aP2, leptina y adiponectina) en células adiposas LS14 diferenciadas. Los adipocitos LS14 fueron diferenciados por 7 días y tratados con cinacalcet 1 μ M durante 24 h. Las barras horizontales representan mediana para cada gen frente a su propio control tratado con vehículo, normalizado a 1. * $P < 0.05$ vs 1, Prueba de Wilcoxon, (n=10 experimentos, realizados cada uno en duplicado).

Se ha descrito que en un contexto de compromiso metabólico (obesidad, resistencia a la insulina), el tejido adiposo omental muestra una alteración en la expresión de factores de secreción (leptina, adiponectina) y genes lipogénicos (GPD, LPL) (Poulain-Godefroy et al, 2008). Por esto, quisimos evaluar si luego de estimular el CaSR, la expresión de adiponectina (adipoquina que responde a cinacalcet) y enzimas lipogénicas (representadas por GPD, LPL y FAS) se asocian.

Receptor sensor de calcio (CaSR) y disfunción del tejido adiposo: diferenciación, señalización de insulina, almacenamiento de triglicéridos, expresión de adipocinas y manejo de triglicéridos en el hígado

IV.4.2.- Asociación entre la expresión de adiponectina y marcadores lipogénicos en adipocitos LS14 ante la exposición a cinacalcet

Al analizar la correlación de adiponectina con genes lipogénicos (Figura 11) se demuestra la solidez en la relación de esta adipocina con GPD ($p=0,001$) y una sugerente tendencia al relacionar adiponectina y LPL ($p=0,005$). Esto podría indicar que existe una correlación entre la expresión génica de adiponectina y enzimas lipogénicas que aportan triglicéridos desde fuentes exógenas, cuando las células son expuestas a cinacalcet. No obstante, la relación de adiponectina y FAS no es significativa.

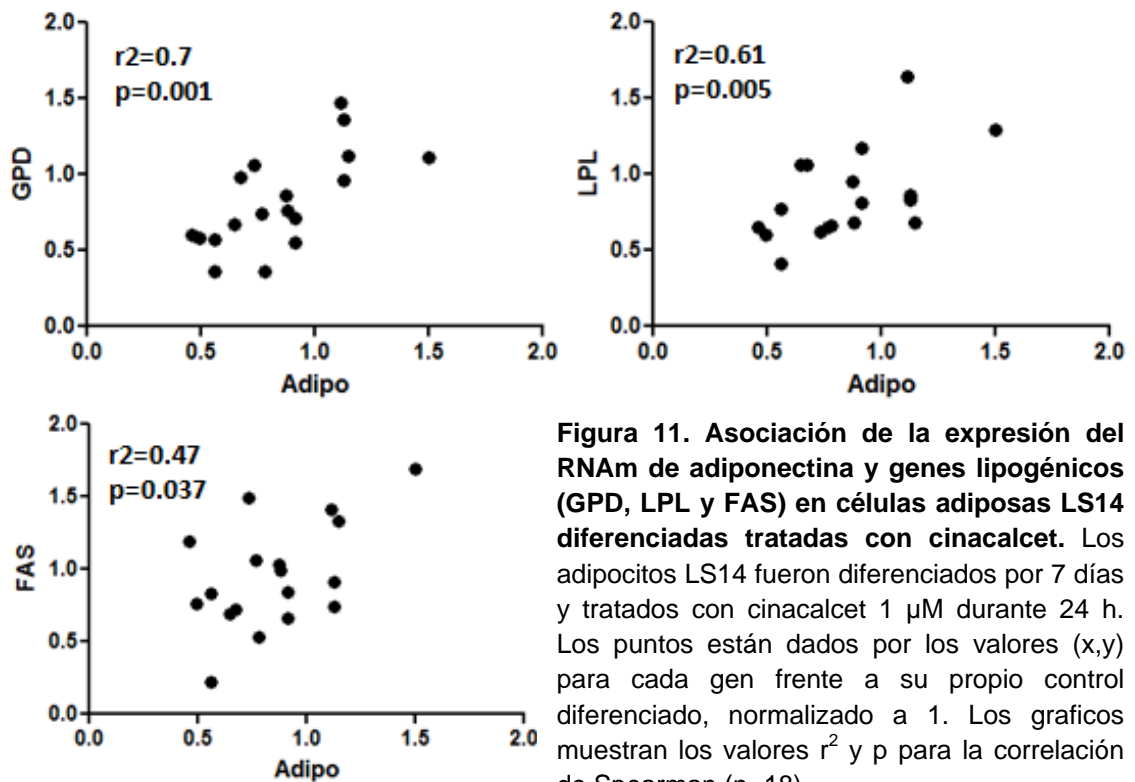


Figura 11. Asociación de la expresión del RNAm de adiponectina y genes lipogénicos (GPD, LPL y FAS) en células adiposas LS14 diferenciadas tratadas con cinacalcet. Los adipocitos LS14 fueron diferenciados por 7 días y tratados con cinacalcet 1 μ M durante 24 h. Los puntos están dados por los valores (x,y) para cada gen frente a su propio control diferenciado, normalizado a 1. Los graficos muestran los valores r^2 y p para la correlación de Spearman ($n=18$).

Considerando que hemos asociado la activación del CaSR con un aumento de la diferenciación adipogénica y una disminución de la acumulación de triglicéridos acompañado de una disminución en la expresión génica de GPD, LPL y adiponectina en adipocitos viscerales, se propone que, ante la activación de esta proteína existiría una capacidad reducida para almacenar lípidos en los adipocitos. La menor capacidad de almacenamiento de lípidos podría determinar mayor cantidad de ácidos grasos libres circulantes que, a nivel de organismo completo, podría favorecer la generación

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

de depósitos ectópicos de lípidos, aumentando entre otros, los triglicéridos hepáticos. Dada la relevancia del tejido hepático en el manejo de los triglicéridos circulantes y la susceptibilidad de su propio funcionamiento cuando acumula lípidos (esteatosis hepática), nos propusimos determinar los efectos de la estimulación del CaSR sobre el manejo de lípidos en células hepáticas, a nivel de contenido de triglicéridos y de expresión de genes lipogénicos.

IV.5.- Evaluación el efecto de la activación del CaSR sobre el manejo de triglicéridos en hepatocitos

La causa más común de depósito ectópico de lípidos en el hígado es el aumento de la ingesta calórica, excediendo el gasto energético y la capacidad de almacenamiento adecuado en el tejido adiposo. Este aspecto, resulta en un “rebalse” energético del tejido adiposo hacia el hígado. La incapacidad del tejido adiposo para almacenar lípidos provoca depósito de grasa ectópica que incluye la generación de esteatosis hepática (Saponaro et al, 2015).

IV.5.1.- Identificación del CaSR en células hepáticas humanas

La expresión del CaSR está ampliamente descrita en diferentes tejidos del organismo. Sin embargo, esta proteína aún no ha sido identificada en células hepáticas humanas. En la figura 12 se muestra la expresión del RNAm y la proteína del CaSR en células hepáticas HepG2. Hasta donde sabemos, este estudio es el primero que ha observado la presencia del CaSR en la línea celular de hepatocitos humanos HepG2.

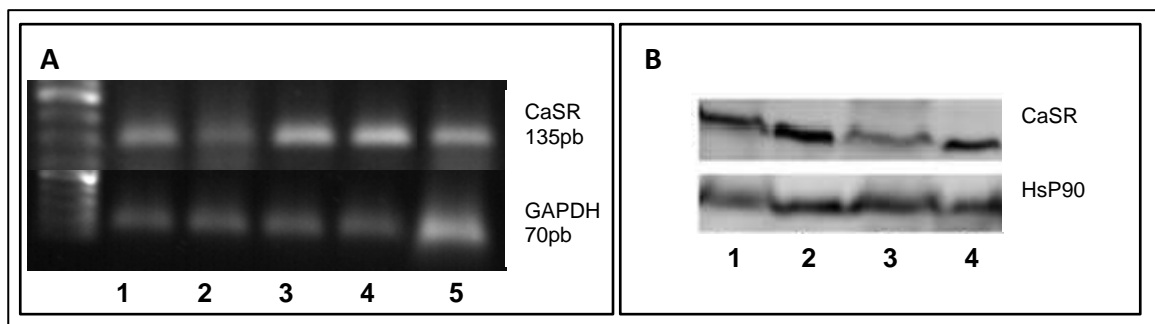


Figura 13. Expresión del CaSR en células hepáticas HepG2. A: Fotografía de la abundancia del ARNm (producto de PCR) para el CaSR en células HepG2 (carril 1-2), células HepG2 que sobreexpresan CaSR (carril 3-4), tejido paratiroideo (carril 5). Como control interno fue usado GAPDH. B: Western Blot que muestra la expresión del CaSR en células HepG2 (carriles 1 y 3) y células Caco-2 como control positivo (carriles 2 y 4). Se utilizó Hsp90 como control de carga

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

Para observar la acumulación de triglicéridos en un ambiente alto en ácidos grasos (ante una menor capacidad del tejido adiposo para almacenar triglicéridos inducida por cinacalcet, se espera una mayor disponibilidad de ácidos grasos en circulación), establecimos un modelo de células HepG2 expuestas a ácido oleico. Dado el riesgo de lipotoxicidad en este modelo, en primer lugar determinamos la viabilidad de estas células frente a dos concentraciones diferentes de ácido oleico (Kwan et al, 2012).

IV.5.2.- Viabilidad de células HepG2

El ensayo de viabilidad demostró que el ácido oleico (0,3 mM y 0,6 mM) no afecta la supervivencia celular (Figura 13). La viabilidad entre los distintos tratamientos no difirió significativamente versus el control tratado con vehículo (barra oscura), dado que las diferencias entre las distintas condiciones experimentales no superó el 15%.

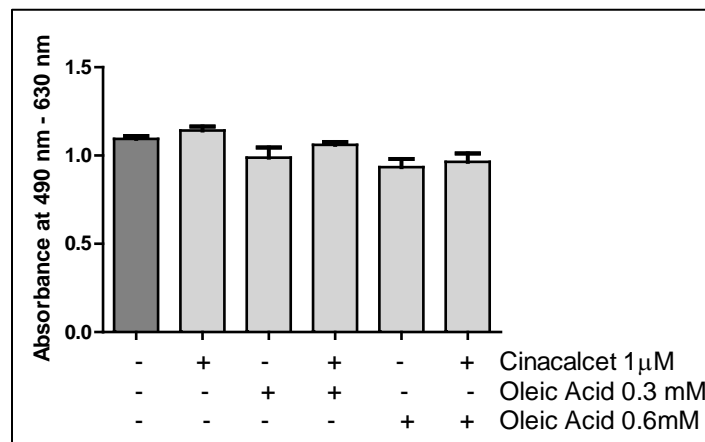


Figura 13. Viabilidad de células HepG2. Células tratadas por 72 horas con cinacalcet (1 μ M), ácido oleico (0,3 y 0,6 mM) y sus combinaciones. La viabilidad celular fue medida por el ensayo MTS. Las barras representan media \pm SEM de la absorbancia a 490 nm (menos 630 nm). Prueba de Wilcoxon. El experimento fue realizado en triplicado (n=1).

Con estos datos, se evaluó el efecto de 0,6 mM de ácido oleico sobre la acumulación intracelular de triglicéridos.

IV.5.3.- Efecto del ácido oleico sobre el contenido de triglicéridos intracelulares en células HepG2

La Figura 14 muestra que el contenido de triglicéridos intracelulares en células HepG2 aumenta en un 103% luego de 3 días de exposición a 0,6 mM de ácido oleico. Adicionalmente y para confirmar visualmente estos resultados, se tiñeron las gotas de lípidos con Oil Red O, observando, de acuerdo a lo esperado, una mayor cantidad de lípidos en aquellas células HepG2 expuestas a ácido oleico.

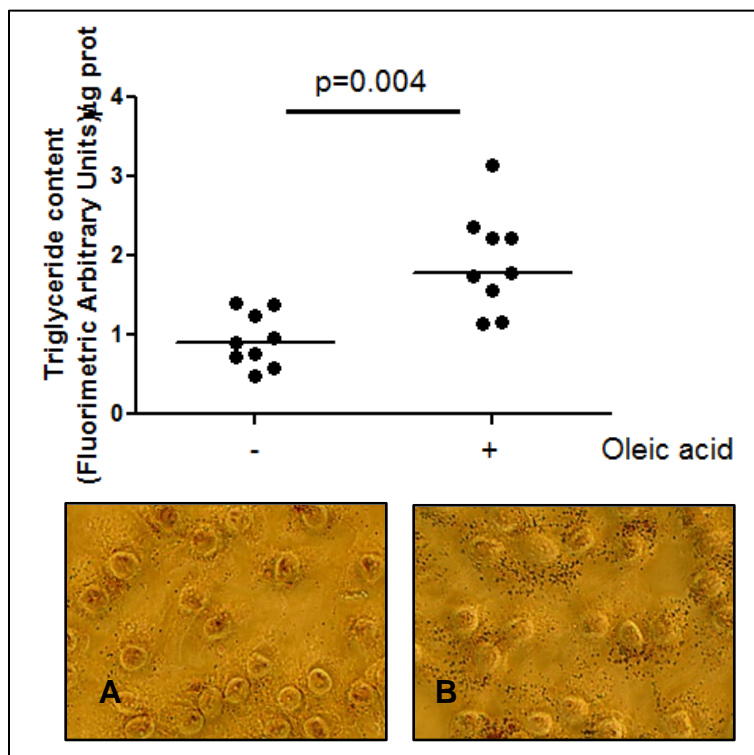


Figura 14. Efecto del ácido oleico sobre el contenido de triglicéridos en células HepG2. Células HepG2 expuestas por 72 horas a ácido oleico (0,6 mM). Evaluación de la acumulación de lípidos por fluorimetría usando Nile Red. Las barras horizontales representan la mediana para cada condición. Prueba de Wilcoxon para datos pareados (n=9). Las fotografías representan células HepG2 después de 3 días de exposición al ácido oleico (B) comparado con las células control no expuestas (A). El contenido de triglicéridos se evaluó con tinción de Oil Red O (10x).

En estas condiciones, consideradas un modelo de sobreoferta lipídica (Garcia et al, 2011), es que evaluamos el efecto de la activación del CaSR. Esto representaría, de acuerdo a lo discutido previamente, el modelo de lipotoxicidad generado, consistente con la hipótesis de nuestro trabajo.

Receptor sensor de calcio (CaSR) y disfunción del tejido adiposo: diferenciación, señalización de insulina, almacenamiento de triglicéridos, expresión de adipocinas y manejo de triglicéridos en el hígado

IV.5.4.- Evaluación el efecto de la activación del CaSR sobre el contenido de triglicéridos en la línea celular HepG2

En la Figura 15 se observa que cinacalcet elevó en un 21% el contenido de triglicéridos en células HepG2 expuestas a un ambiente con ácido oleico 0,6 mM. Este resultado apoyaría el concepto de que la activación del CaSR potencia un aumento intracelular de lípidos en un ambiente de sobreoferta lipídica.

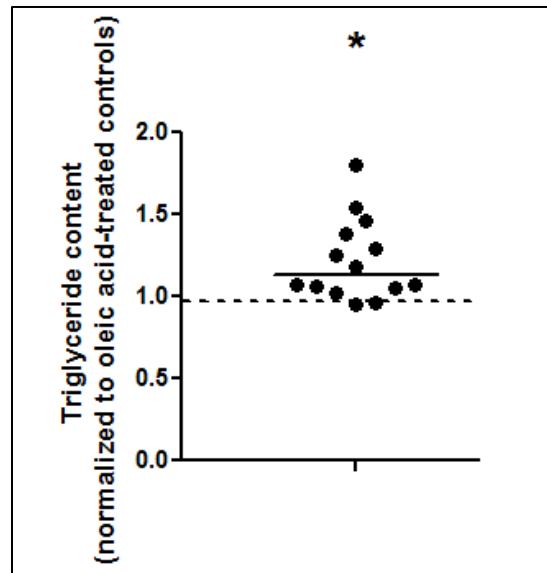


Figura 15. Efecto de cinacalcet sobre el contenido de triglicéridos en células HepG2 expuestas a ácido oleico. Células incubadas 72 horas con ácido oleico 0,6 mM y cinacalcet 1 μ M. Cuantificación de la acumulación de triglicéridos por fluorimetría usando Nile Red. La barra horizontal representa la mediana frente a su propio control tratado con ácido oleico, normalizado a 1. * $P < 0.05$ vs 1, Prueba de Wilcoxon (n=14)

Luego de observar el efecto de la estimulación del CaSR sobre el contenido de triglicéridos en presencia de ácido oleico, evaluamos este efecto sobre la expresión del RNAm de factores lipogénicos hepáticos.

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

IV.5.5.- Efecto de la activación del CaSR sobre la expresión de genes lipogénicos en la línea celular HepG2

Durante la formación de grasa hepática participa un gran número de factores de transcripción y enzimas. Entre ellos, se evaluó la expresión de SREBP1c, FAS, DGAT1 y DGAT2 (Figura 16). Los efectos de la activación del CaSR sobre la expresión de los genes propuestos se esperan durante el primer día de exposición a cinacalcet, dado que los cambios sobre el RNAm se desarrollan en etapas tempranas de la estimulación. Por esto, evaluamos el efecto de cinacalcet a las 24 horas de exposición.

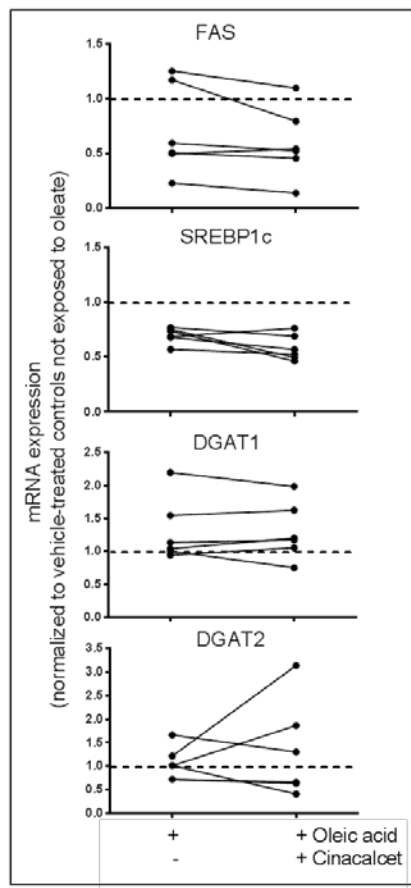


Figura 16. Efecto de cinacalcet sobre la expresión de genes que codifican proteínas relacionadas con procesos lipogénicos (SREBP1c, FAS, DGAT1 y DGAT2) en células HepG2 expuestas a ácido oleico. Células HepG2 expuestas por 24 horas a cinacalcet 1 μ M en presencia de ácido oleico 0,6 mM. Como control interno fue utilizado GAPDH. La línea punteada representa las células control no expuestas a ácido oleico, normalizado a 1. Prueba de Wilcoxon para datos pareados (representado por la línea que conecta los puntos) (n=6, experimentos realizados cada uno en duplicado).

La activación del CaSR en presencia de ácido oleico no determinó diferencias en la abundancia de los RNAm evaluados en células HepG2. Sin embargo se observaron tendencias hacia una disminución de la expresión para FAS y SREBP1c ($p = 0,06$ y $0,09$, respectivamente). Cabe destacar que la evaluación de la expresión de estos factores fue determinada luego de 24 horas de exposición al tratamiento (cinacalcet), por lo que no podríamos descartar una respuesta ante la activación del CaSR mantenida por más tiempo o bien que la respuesta se haya producido en forma más temprana.

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

V. DISCUSIÓN

Los resultados de esta tesis permiten asociar la activación del CaSR con diferentes anomalías metabólicas asociadas a la obesidad, a nivel de: diferenciación adiposa, almacenamiento de triglicéridos y expresión de adipoquinas en el modelo adiposo y el manejo de triglicéridos en un modelo hepático.

V.1.- Efecto de la activación del CaSR sobre la diferenciación adipogénica

Con la inducción de la adipogénesis, las células preadiposas modifican su fenotipo y expresan genes específicos de adipocitos diferenciados y acumulan gotas de grasa (Green & Meuth, 1974). Al evaluar el efecto de la activación del CaSR por 10 días sobre la diferenciación adipogénica en adipocitos de la línea celular LS14, observamos un aumento de la expresión de los marcadores adipogénicos PPAR γ , FAS, GPD, aP2 y adiponectina en comparación con las células control expuestas al vehículo. En el caso de LPL, se observó una tendencia hacia el mismo efecto ($p = 0,09$). Estos resultados son consistentes con los determinados en el estudio de He et al., quien observó un efecto adipogénico (aumento en la expresión de PPAR γ y genes río abajo incluyendo LPL y GPD) luego de la estimulación del CaSR con cloruro de gadolinio en la línea celular adiposa SW872, usando un protocolo adipogénico con ácido oleico y evaluado a las 72 horas (He et al, 2012). Nuestros hallazgos fueron confirmados luego de 10 días de diferenciación en células LS14 y adipocitos omentales humanos en cultivo primario, usando el calcimimético cinacalcet como activador del CaSR (Villarroel et al, 2013).

La activación del CaSR produce aumentos rápidos y transitorios en los niveles de Ca²⁺ citosólico, mediante su movilización desde las reservas intracelulares y el aumento de su afluencia a través de los canales de Ca²⁺ sensibles al voltaje en la membrana de la célula (Chen y Goodman, 2004). Se ha demostrado que el incremento de Ca²⁺ intracelular en etapas avanzadas de adipogénesis es capaz de aumentar la expresión de marcadores de diferenciación adiposa como GPD y PPAR γ (Shi et al, 2000). Dada esta evidencia, es razonable suponer que la activación del CaSR en tejido adiposo visceral puede desempeñar un papel en el desarrollo de comorbilidades asociadas a la obesidad mediante el aumento de Ca²⁺ intracelular, afectando distintos

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

procesos metabólicos en tejido adiposo incluyendo a la adipogénesis (Villarreal et al, 2014).

El proceso de adipogénesis es de gran importancia para mantener un tejido adiposo funcional, capaz de manejar adecuadamente eventuales excesos de lípidos, que dañan otros órganos y que conducen a las consecuencias metabólicas y cardiovasculares de la obesidad (Smith & Hammarstedt, 2010). Es importante señalar que los efectos favorables de la adecuada expansión de grasa se limitan a los beneficios de la expansibilidad de la grasa subcutánea y no la adipogénesis visceral. De hecho, la acumulación de grasa visceral durante el desarrollo de la obesidad se correlaciona con la inflamación patológica y resistencia a la insulina (Hamdy et al, 2006).

Estudios previos de nuestro laboratorio sugieren que la estimulación del CaSR puede ser un factor relevante que contribuye a la perpetuación de un ambiente inflamatorio en el tejido adiposo visceral (Cifuentes et al, 2010, 2012), que junto a un estímulo adipogénico pueden favorecer los efectos cardiovasculares y metabólicos deletéreos de la acumulación de dicha grasa. Junto a estos efectos consideramos plausible que la activación del CaSR se relacionara también con un defecto en la señalización de la insulina.

V.2.- Efecto de la activación del CaSR sobre la señalización de insulina en adipocitos

La activación de diferentes vías de señalización intracelular originadas por efecto de la insulina sobre su receptor, determinan la respuesta de la proteína intracelular de señalización de insulina Akt. Contrario a lo hipotetizado, al evaluar la activación (fosforilación en serina 473) de esta quinasa en adipocitos humanos LS14, nuestros resultados sugieren que la estimulación del CaSR por cinacalcet no generó una respuesta. Este fenómeno puede estar explicado por la existencia de señales que determinan efectos contrapuestos. Por un lado, se ha establecido que la señalización del CaSR mediada por PI3K lleva a la fosforilación y activación de Akt (Dvorak et al, 2004) y por el otro lado se ha asociado la estimulación del CaSR con menor sensibilidad a la insulina (efecto mediado por Akt), secundaria a inflamación (Gao et al, 2014). Concordantemente, nuestro grupo ha previamente encontrado que la estimulación del CaSR en el tejido adiposo provoca aumento en la expresión de

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

moléculas inflamatorias como TNF- α , IL-6 e IL-1 β (Cifuentes et al, 2010) y que éstas reducen la sensibilidad a la insulina (Lumeng et al, 2007)

Nuestros resultados en el modelo de adipocitos aislados del tejido adiposo humano no respondieron al efecto de cinacalcet en presencia de insulina, esto debido posiblemente en parte a que los adipocitos viscerales son por definición resistentes a la insulina (al menos en relación a las células adiposas subcutáneas) (Thorne et al, 2010), pudiendo dificultar la observación del efecto esperado en este modelo. Al describir las características antropométricas y bioquímicas de los donantes de tejido adiposo en función de la respuesta de p-Akt a la insulina, se pudo establecer que todos los sujetos eran obesos. Sin embargo no se observaron diferencias para los triglicéridos séricos ($p=0,5$), masa grasa ($p=0,5$) o masa muscular ($p=0,25$) entre los sujetos donde la fosforilación de Akt en adipocitos en cultivo aumentó o no en respuesta a insulina. Es importante destacar que la falta de diferencias estadísticamente significativas podría ser consecuencia del bajo número de sujetos analizados, por lo que estos datos son preliminares y necesitan ser confirmados con una mayor cantidad de donantes. Especulando en relación a estas sugerentes variables (triglicéridos, masa grasa y masa muscular) podríamos haber esperado que los sujetos donde P-Akt no responde a la insulina (deterioro de la vía de señalización de la insulina) tengan una mayor concentración de triglicéridos en sangre (Park et al, 2015), un mayor % de masa grasa (Zhang et al, 2015) y un menor contenido de masa muscular (Moon, 2014).

Es importante destacar que en adipocitos existen vías de transporte de glucosa independiente de Akt, este aspecto limita la interpretación de nuestros datos dado que la insulina podría ejercer efectos sobre la translocación de GLUT4 por vías paralelas a la fosforilación de Akt. Estas vías involucran la formación de un complejo proteico entre proteínas adaptadoras de Cbl (APS/CAP/Cbl), que permite la fosforilación de esta última proteína por el RI, para finalmente llevar a la translocación de GLUT4 hacia la membrana plasmática. Por otra parte, la activación de 2 isoformas de PKCs atípicas (λ y ζ) inducidas por insulina también las involucra en favorecer el transporte de glucosa inducido por la insulina por un mecanismo independiente de Akt (McCarthy & Elmendorf, 2007).

Siguiendo la idea de la promoción de un tejido adiposo disfuncional provocado por la estimulación del CaSR, y el aumento de la adipogénesis asociado a esta

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

proteína, nuestra hipótesis planteó un aumento de acumulación de triglicéridos (lipógenesis) en adipocitos diferenciados.

V.3.- Efecto de la activación del CaSR sobre el manejo de triglicéridos en adipocitos

Los adipocitos diferenciados son células de una vida media muy larga (se ha estimado en 10 años aproximadamente) (Rydén et al, 2013) y su función primordial es la de almacenar lípidos en forma de triglicéridos. Durante el proceso de lipogénesis, se requiere la acción de algunas enzimas como GPD, LPL y FAS, que poseen un fino control transcripcional (Vazquez-Vela et al, 2008). PPAR γ es el factor de transcripción considerado el “regulador maestro” del metabolismo de los lípidos en el adipocito, controlando la expresión de numerosos factores relacionados con la síntesis de triglicéridos. La síntesis de triglicéridos consiste en la esterificación de ácidos grasos en el glicerol-3-fosfato, sintetizado por la acción de la enzima GPD. Por su parte, la mayor cantidad de ácidos grasos almacenados provienen (en condiciones de una dieta occidental típica) de la dieta y son captados por el adipocito, luego de ser hidrolizados mediante la acción de la LPL. Otra vía de obtención de ácidos grasos puede darse a partir su síntesis desde moléculas no lipídicas, donde participa principalmente la enzima FAS, que genera palmitato a partir de acetil-CoA. Dada la relevancia de la lipogénesis en el funcionamiento del adipocito y del tejido adiposo, este trabajo estudió el efecto de la activación del CaSR sobre este proceso. Se observó que dicha activación disminuye el contenido de triglicéridos, acompañado de una disminución en la expresión génica de GPD y LPL en células LS14 diferenciadas. Consistente con lo anterior, nuestros resultados permiten especular que la activación del CaSR afectaría la síntesis de triglicéridos a partir de ácidos grasos provenientes de la dieta, indicando que el efecto de cinacalcet podría ser específico para esta vía lipogénica. Las implicancias fisiológicas de que GPD y LPL participen colectivamente en la síntesis de triglicéridos (Wallace et al, 2014) son considerables, ya que, como se señaló, en condiciones de la típica alimentación occidental en humanos, es desde la dieta de donde proviene la mayor parte del sustrato lipídico para la síntesis de triglicéridos (Georgiadi & Kersten, 2012). La disminución en la expresión génica de GPD en nuestro modelo de estudio podría ser respaldada con evidencia que demuestra una disminución del 50% en la actividad específica de la enzima GPD en adipocitos de

obesos en comparación con la de los sujetos no obesos (Cifuentes et al, 2008). Este antecedente apoyaría la relación de la estimulación del CaSR y la disminución de GPD, debido a que la activación del CaSR podría estar exacerbada en la obesidad (Cifuentes et al, 2010). A partir de esta idea también podemos destacar un estudio realizado en muestras de tejido adiposo omental de mujeres, que mostró una menor expresión de GPD y LPL en pacientes eutróficas al compararlas con aquellas obesas con deterioro de la función insulínica (Poulain-Godefroy et al, 2008). Este comportamiento podría estar explicando una potencial supresión de las vías lipogénicas por corresponder a un mecanismo de defensa contra la expansión excesiva y la acumulación de grasa (Ortega et al, 2010).

Por otro lado, en esta tesis no se observó una respuesta de PPAR γ y FAS por efecto de la activación del CaSR. *In vivo* PPAR γ regula el flujo de ácidos grasos libres hacia los adipocitos, a través del aumento de la expresión de LPL, promoviendo así la disponibilidad de ácidos grasos libres provenientes de las lipoproteínas circulantes (Gurnell M, 2005). Esto estaría indicando que los efectos de la activación del CaSR a las 24 horas probablemente no están mediados por PPAR γ . Sin embargo, trabajo previo del laboratorio ha podido establecer que la expresión génica de PPAR γ disminuiría a las 72 horas de exposición a cinacalcet (Anexo 1), posiblemente consistente con la mencionada relación entre PPAR γ y LPL.

De acuerdo a la observación expuesta en el primer objetivo, que muestra un efecto adipogénico en preadipocitos tratados con cinacalcet durante 10 días de diferenciación, la disminución en el almacenamiento de triglicéridos fue un resultado inesperado, debido a que se podía intuir que la activación del CaSR aumentaría el contenido de lípidos. Sin embargo, cabe destacar que el protocolo de estudio difiere, siendo el utilizado para este objetivo adipocitos diferenciados por 7 días y luego estimulados con cinacalcet. La disminución de triglicéridos en adipocitos expuestos a cinacalcet sugiere la posible participación del CaSR en el deterioro de la lipogénesis visceral, que se asocia con un tejido adiposo menos capaz de almacenar adecuadamente los ácidos grasos disponibles. Esta idea está de acuerdo con la teoría expuesta por Moreno-Indias y Tinahones, quienes proponen un deterioro en la capacidad lipogénica del tejido adiposo entre las principales causas de los trastornos metabólicos asociados a la obesidad (Moreno-Indias & Tinahones, 2015). Esto puede

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

gatillar un nivel elevado de ácidos grasos libres circulantes que se acumularían en depósitos ectópicos (Christodoulides et al, 2009), con complicaciones funcionales en órganos como el hígado, páncreas y músculo esquelético, entre otros.

Nuestras observaciones de asociaciones en las respuestas de los factores lipogénicos (PPAR γ , GPD, LPL y FAS) al estímulo de cinacalcet mostraron una correlación significativa entre GPD y FAS y una interesante tendencia entre GPD y LPL ($p=0,008$). Este hallazgo está en acuerdo con los resultados de Wallace et al., quienes luego de evaluar genes lipogénicos (PPAR γ , GPD, LPL y FAS) en tejido adiposo perirrenal de corderos con alimentación normal, encontraron una relación positiva de la expresión (RNAm) entre PPAR γ y GPD ($p=0.022$), entre GPD y LPL ($p=0.023$) y entre LPL y FAS ($p=0.01$), independiente del crecimiento prenatal y del sexo del animal (Wallace et al, 2014). Por tanto, cabe destacar que la expresión coordinada entre GPD y LPL observada en animales normales se mantiene en reapesta a la activación del CaSR. Al respecto, queda por dilucidar si cinacalcet tiene un efecto simultáneo sobre ambas enzimas (GPD – FAS, GPD – LPL), si el efecto es directo sobre una y la segunda responde en forma secundaria o si bien se ejerce un efecto sobre un (o más) factor(es) intermediario(s) que a su vez influye(n) sobre ambas enzimas.

V.4.- Efecto de la activación del CaSR sobre genes relacionados con la actividad secretora en adipocitos

La importancia del tejido adiposo blanco como productor de numerosas sustancias con acción endocrina, paracrina y autocrina (Moreno & Martinez, 2002) motivaron nuestra evaluación de factores de secreción en células adiposas LS14 diferenciadas expuestas a cinacalcet. Nuestros resultados apuntan a que la activación del CaSR disminuye la expresión de adiponectina en adipocitos, mientras que aP2 y leptina no reponen frente a la exposición a cinacalcet. La disminución del RNAm de adiponectina está vinculada con la obesidad, la inflamación y el fenotipo disfuncional en el tejido adiposo omental (Poulain-Godefroy et al, 2008), sustentado en una observación de adipocitos 3T3-L1 maduros estimulados con TNF- α que mostraron una expresión de adiponectina disminuída (Palacios-Ortega et al, 2015).

En relación a leptina, este trabajo observó una gran variabilidad en la respuesta, por lo que no se pudo llegar a una idea concluyente. La leptina es un factor

proinflamatorio que ayuda a perpetuar la inflamación crónica de la obesidad y se observa elevada en sujetos obesos (Paz-Filho et al, 2012). Un estudio que comparó el tejido omental de mujeres eutróficas v/s obesas mostró en estas últimas niveles significativamente mayores en la expresión de leptina, acompañado de menores niveles de adiponectina (Poulain-Godefroy et al, 2008). Sin embargo, se ha demostrado que la inflamación también podría disminuir la expresión de leptina en células adiposas diferenciadas (Palacios-Ortega et al, 2015) y que esta reducción estaría asociada a una disminución en el contenido de triglicéridos intracelulares. Estos antecedentes podrían explicar el variable comportamiento de esta adipoquina en nuestro trabajo.

En relación a aP2, la activación del CaSR no modificó la expresión génica de esta proteína, no obstante, un trabajo posterior del laboratorio ha confirmado un aumento de la expresión proteica de aP2 en explantes de tejido adiposo. Este último dato obtenido a partir de una concentración mayor del calcimimético (2 μ M) está en acuerdo con lo mostrado en la literatura. La relación entre la activación del CaSR y el aumento de aP2 podría estar basada en que la síntesis de esta última desde las células adiposas aumenta directamente por el calcio intracelular, efecto observado luego de estimular el CaSR (He et al, 2012). Interesantemente, también podríamos especular que el aumento de aP2 se relacionaría con una disminución en el contenido de triglicéridos mediado por lipólisis (Coe et al, 1999), ya que se ha postulado que aP2 activa la lipasa sensible a hormonas (HSL) regulando la lipólisis (Smith et al, 2008). De hecho, los adipocitos deficientes en aP2 exhiben una reducción en la lipólisis (Coe et al, 1999). La secreción de aP2 por los adipocitos se relaciona con la disfunción metabólica observada en la obesidad. Se ha reportado que ratones deficientes en esta proteína exhiben una marcada protección frente a comorbilidades asociadas a la obesidad (Furuhashi et al, 2007). Adicionalmente, se ha observado que ratones obesos poseen una producción de aP2 aumentada, que actuaría sobre el hígado para estimular la gluconeogénesis y por consiguiente elevar la glucosa circulante (Cao et al, 2013). Por tal razón, nuestros hallazgos nos permiten proponer que esta proteína podría ser un nexo interesante entre la función adiposa y hepática a través de la activación del CaSR.

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

V.5.- Efecto de la activación del CaSR sobre el manejo de triglicéridos en hepatocitos

Hasta donde conocemos, la presencia del CaSR en células hepáticas humanas no ha sido reportada, por lo que esta tesis corresponde a la primera evidencia al respecto. La información previa fue reportada en tejido de ratas, demostrándose que se expresa CaSR y que la exposición a $GdCl_3$ (un agonista del CaSR) puede causar un aumento en el Ca^{2+} intracelular y el flujo de bilis (Canaff et al, 2001). La expresión del CaSR ha sido también descrita en la línea celular BRL (derivada de hígado de rata búfalo), donde su activación gatilla un aumento de Ca^{2+} intracelular (Xing et al, 2010). El presente trabajo de tesis demostró con éxito la presencia del CaSR en la línea celular de hepatocitos humanos HepG2, lo que nos permitirá estudiar la participación del CaSR en este modelo y en el desarrollo de comorbilidades asociadas a la obesidad, como la esteatosis hepática.

Se ha descrito que el ácido oleico induce cambios morfológicos en células HepG2 similares a los que ocurren en la esteatosis de hepatocitos (Janorkar et al, 2009) y se ha demostrado que promueve mayor acumulación de triglicéridos y es menos apoptótico que el ácido palmítico en cultivos de células hepáticas (Ricchi et al, 2009). En nuestro estudio, el ácido oleico no mostró efectos sobre la viabilidad celular, consistente con el estudio de Cui et al. (Cui et al, 2010), donde se demostró que 0,6 mM de ácido oleico no afecta la apoptosis ni se relaciona con cambios en la alanina transaminasa (ALT), lo que indica que la acumulación de lípidos inducida no representa toxicidad directa en células HepG2.

Basados en las manifestaciones de disfuncionalidad del tejido adiposo visceral, es plausible proponer que la exposición de células adiposas a cinacalcet favorecería la liberación de ácidos grasos hacia otros órganos como el hígado, y que la activación del CaSR en células hepáticas aumentaría la acumulación de triglicéridos cuando estas células son expuestas a un ambiente con concentraciones elevadas de ácido oleico. Estos resultados permiten plantear al CaSR como una proteína que favorecería esteatosis hepática en sujetos obesos. A nivel fisiológico, se ha demostrado que personas obesas con esteatosis hepática presentan una disminución en la concentración de adiponectina en sangre (Fabbrini et al, 2015), hecho que también sería consistente con nuestras observaciones tras la activación del CaSR en adipocitos.

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

Cinacalcet no afectó la expresión del RNAm de PPAR γ , SREBP1c, FAS o DGAT1/2 en presencia de ácido oleico en células HepG2. SREBP-1c es el factor de transcripción más importante la regulación de la lipogénesis *de novo* en el hígado y es responsable de la regulación de los genes implicados en la biosíntesis de ácidos grasos, incluyendo FAS (Palou et al, 2008). Sin embargo, se ha demostrado que este factor de transcripción no compromete la expresión génica de DGAT1 o DGAT2 (Horton et al, 2003). La ausencia de respuesta en la transcripción hepática de los factores lipogénicos analizados podría ser un fenómeno esperable ya que la transcripción hepática del gen que codifica SREBP-1c es estimulado por insulina (Weickert & Pfeiffer, 2006), que no fue una condición experimental aplicada en este trabajo. Por otro lado, no se puede descartar que el comportamiento de los genes estudiados fuese una respuesta propia de una ventana de tiempo no representativa, o que la respuesta observada se desarrollara con la finalidad de compensar la sobreoferta de ácidos grasos en el medio. Al respecto, un estudio realizado en mujeres con obesidad mórbida destacó que la expresión hepática de SREBP1c y FAS tiene una relación inversa con el grado de esteatosis, es decir, disminuye cuando el grado de esteatosis aumenta. Esto indicaría que, en este tipo de obesidad extrema, la vía lipogénica hepática parece estar regulada hacia la baja en un estado de esteatosis severa (Auguet et al, 2014). Un estudio en células HepG2 demostró que la esteatosis inducida por ácido oleico se asocia con un aumento de la producción y secreción de TNF α y disminución de la expresión de PPAR α (factor de transcripción relacionado al aumento de la oxidación de ácidos grasos y protección contra la esteatosis) en las células HepG2 (Cui et al, 2010). Esto podría sugerir que el ácido oleico es capaz de activar mecanismos para perpetuar el estado esteatótico (Seo et al, 2008).

Dada la falta de respuesta de los genes lipogénicos hepáticos estudiados al tratamiento con cinacalcet, el aumento en el contenido de triglicéridos necesitaría ser explicado por la activación de otras vías. A partir de esto, y dados los antecedentes de que la activación del CaSR se asocia a un estado inflamatorio en varios tipos de células (Cifuentes et al, 2012, Abdullah et al, 2006, Wu et al, 2015) y que citoquinas proinflamatorias como IL-1 β contribuyen a la esteatosis hepática en ratones (Nov et al, 2013), la vía inflamatoria podría entregar algunas respuestas del aumento en el contenido de triglicéridos. En un trabajo posterior a la realización de esta tesis, nuestro grupo observó que la activación del CaSR eleva la expresión de TNF- α , IL-6 e IL-1 β en

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

hepatocitos HepG2 (Anexo 7), con lo que podríamos sugerir a la inflamación como un mediador entre la activación del CaSR y una alteración en el manejo de triglicéridos hepáticos.

La asociación de la inflamación con una menor lipogénesis adiposa y mayor lipogénesis hepática fue reportada en un estudio que mostró que mediante la promoción de inflamación adiposa, mediada por IL-1 β , se limita la capacidad de expansión del tejido graso, apoyando una acumulación de grasa ectópica en los hepatocitos (Nov et al, 2013). Además, Yang et al. reportó que la inflamación crónica (característica de la obesidad) promueve la acumulación hepática de lípidos en un modelo de ratón, asociado con una disminución en la expresión de PPAR γ en el tejido adiposo epididimal, conduciendo a un aumento de ácidos grasos circulantes (Yang et al, 2015). Finalmente, es posible sugerir que la infiltración grasa del hígado puede estar influenciada por la acumulación de grasa visceral, ya que el hígado graso puede ser una consecuencia de la movilización de ácidos grasos característica de los depósitos viscerales (Verrijken et al, 2010).

En síntesis, dado el carácter multisistémico de la obesidad y como una forma de integrar una respuesta fisiológica del manejo de triglicéridos frente a la activación del CaSR (adiposa y hepática), nuestros resultados son compatibles con la hipótesis de que la activación de CaSR está relacionada con una disminución en el contenido de triglicéridos en adipocitos y un aumento en la acumulación de triglicéridos en hepatocitos bajo condiciones de sobreoferta de lípidos.

V.6.- Cinacalcet, potenciales alcances clínicos

El uso de un agonista alostérico del CaSR como cinacalcet, permite observar una respuesta específica del receptor, este hecho reduce la probabilidad de observar un efecto no deseado que incluya la activación de otras vías.

La dosis terapéutica oral inicial recomendada de cinacalcet es de 30 mg una vez al día (St Peter et al, 2015). Estudios que evaluaron las propiedades farmacocinéticas de cinacalcet en pacientes sanos, mostraron que se alcanzan concentraciones máximas en sangre (Cmax) para dosis de 50, 75 y 100 mg/día de 12, 17,2 y 43,1 ng/mL respectivamente (Lee et al, 2012). Otro estudio realizado en 42 voluntarios sanos alcanzó concentraciones máximas de cinacalcet en sangre de 7,68, 17 y 31,3 ng/mL con una dosis única de 25, 50 y 100 mg respectivamente. Mientras que la administración diaria

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

durante 7 días de 50 mg de cinacalcet alcanzó una Cmax de 20,6 ng/mL (Liu et al, 2016). Cinacalcet en nuestros experimentos *in vitro* se trabajó en una concentración de 1 μ M, dosis previamente validada (Cook et al, 2015) y que se encuentra 10 veces más concentrada en comparación a la concentración en sangre de un paciente que ingiere una dosis de 100 mg de cinacalcet (0,1 μ M) (Lee et el, 2012, Liu et al, 2016). Por lo tanto, nuestros experimentos se realizaron bajo condiciones suprafisiológicas del fármaco, hecho que no difiere del uso de otros fármacos *in vitro*.

En búsqueda de una posible asociación entre la obesidad, sus comorbilidades y el uso de cinacalcet, es interesante destacar que un estudio en ratas nefrectomizadas observó que el uso oral de cinacalcet durante 14 días provocó una ganancia de peso significativa en comparación con aquellas ratas controles (Nakagawa et al, 2008). En humanos, se reportó que el uso de cinacalcet también mostró un aumento en el peso corporal en un paciente con hiperparatiroidismo secundario, acompañado de una respuesta compensatoria en los parámetros metabólicos (Bahner et al, 2008). Las posibles explicaciones incluyen que la activación del CaSR en órganos periféricos podría inhibir procesos de degradación de proteínas en el músculo (Mitch, 2006) o favorecer el incremento de depósitos grasos en el tejido adiposo visceral (Villarreal et al, 2014). No obstante, es importante notar que los usuarios de cinacalcet (hiperparatiroides secundarios a insuficiencia renal crónica, en diálisis) no constituyen el mejor modelo de estudio dado que sufren múltiples complicaciones metabólicas e inflamatorias que comprometen su estado nutricional.

VI. LIMITACIONES

La activación del CaSR se caracteriza por un concepto conocido como señalización sesgada por el ligando, selectividad funcional o agonismo parcial (Kenakin & Christopoulos, 2013). El sesgo por agonista es un fenómeno referido a que la activación del CaSR en una determinada condición puede determinar una selectividad hacia vías de señalización intracelular que se acoplen a efectos fisiológicos no esperados (Kenakin, 2011). Se ha demostrado que según el agonista y las condiciones experimentales determinadas, se puede activar preferentemente distintas vías de señalización, presentando una mayor modulación de algunas vías sobre otras (Cook et al, 2015). Así, no podemos descartar que ante un estímulo diferente al evaluado en este trabajo, los resultados puedan ser distintos.

El uso *in vitro* de cinacalcet en concentraciones suprafisiológicas puede constituir una eventual limitación al momento de extrapolar nuestros resultados a pacientes, debido a que podemos estar exacerbando una respuesta que fisiológicamente no procede o podemos estar observando eventos que *in vivo* no suceden por efecto del fármaco.

Con respecto al efecto del CaSR sobre la señalización de insulina (como se discutió en punto V.2), la existencia de vías que modulan la actividad de los transportadores de glucosa independiente de Akt limitan la interpretación de nuestros datos. La insulina podría modular su efecto por una vía paralela a la activación de Akt, por lo que una falta de respuesta no necesariamente reflejaría una disminución en el transporte de glucosa.

Referente al modelo de estudio y sobre la base de que en el tejido adiposo conviven otros tipos celulares, es necesario considerar que los datos obtenidos están limitados a la respuesta aislada de los adipocitos. Es decir, podrían existir fenómenos que en este modelo no han podido ser demostrados, debido a limitaciones intrínsecas a esta metodología, pero que en el contexto del órgano completo podrían observarse, como por ejemplo producto de la comunicación paracrina con macrófagos que exacerbarían el potencial inflamatorio).

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

VII. PROYECCIONES

El carácter multisistémico de la obesidad hace que sea necesario su estudio desde una perspectiva que integre distintos órganos y sistemas involucrados. Es por esto que como pasos siguientes planteamos la necesidad de explorar mecanismos moleculares que involucren la activación del CaSR tanto en el tejido adiposo completo como en su relación con otros órganos. En este sentido, los hallazgos de este trabajo permiten plantear la relevancia de continuar con el hígado como un blanco de estudio, dado que este tejido refleja diversas comorbilidades asociadas a la obesidad, que podrían estar determinadas en parte por la activación del CaSR.

En acuerdo con que la condición proinflamatoria subyace a la obesidad, y a la activación del CaSR como uno de los mediadores de la inflamación adiposa, proponemos que la activación del CaSR en el tejido hepático podría asociarse con procesos inflamatorios en este órgano. Así también, planteamos en el futuro la evaluación de nuevos genes y proteínas (IRS1, Akt) involucradas en otros aspectos de la disfuncionalidad hepática (sensibilidad a la insulina) asociadas a la estimulación del CaSR.

Por otro lado, esta tesis abordó el efecto de la estimulación del CaSR a partir de un agente farmacológico, exponemos también la necesidad de que nuevas investigaciones puedan abordar la activación de esta proteína con agonistas fisiológicos. Un candidato de interés en nuestro laboratorio es la espermina, un agonista del CaSR cuyos niveles séricos se encuentran aumentados en niños obesos (Codoñer-Franch et al, 2011). Es posible que la espermina juegue un rol en la aparición de comorbilidades asociadas a la obesidad mediante la activación del CaSR. Asimismo, dada la necesidad de confirmar los efectos que observamos mediados por la activación del CaSR, es necesario utilizar técnicas como el silenciamiento génico o el uso de inhibidores del CaSR que permitan validar los resultados obtenidos.

Si bien nuestros resultados son promisorios, aún quedan temáticas pendientes de responder, entre ellas la explicación de la disminución de los triglicéridos en los adipocitos LS14 por efecto del CaSR, y las posibles implicancias de esta proteína en el tejido hepático. Esto aumenta las proyecciones de nuestro estudio, dado que esta tesis representó una línea base para futuros trabajos que están abordando mecanismos moleculares y vínculos endocrinos y paracrinos de la activación del CaSR.

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

A nivel clínico, el espectro de pacientes tratados en la actualidad con cinacalcet se reduce principalmente a aquellos con insuficiencia renal o cáncer de paratiroides, en quienes (hasta donde podemos saber) no se han realizado estudios sistemáticos con datos que relacionen su uso con morbilidades asociadas a la obesidad.

VIII. CONCLUSIONES

1.- Nuestros resultados muestran que la activación CaSR se asocia con una elevación en la expresión de marcadores adipogénicos. A pesar de que la adipogénesis está asociada con sensibilidad a la insulina y la adecuada función adiposa en tejido adiposo subcutáneo, los alcances en adipocitos viscerales serían patogénicos, especialmente en el contexto de inflamación y sobrealimentación.

2.- La activación del CaSR no ejercería un efecto sobre la señalización de insulina a través de la fosforilación de Akt, contrario a nuestra hipótesis.

3.- Los adipocitos LS14 estimulados con cinacalcet, muestran un menor contenido de triglicéridos, consistente con la disminución en la expresión génica de las enzimas lipogénicas GPD y LPL.

4.- En relación a la respuesta endocrina de los adipocitos por efecto de cinacalcet, podemos destacar la disminución en la expresión génica de adiponectina, sin efecto sobre los genes que codifican para leptina o aP2.

5.- El CaSR está presente en una línea celular de hepatocitos humanos y su estimulación, en un contexto de sobreoferta lipídica, aumenta el contenido de triglicéridos.

Estas observaciones en conjunto, sugieren que la activación de CaSR podría determinar una mayor cantidad de adipocitos viscerales disponibles y a su vez, aquellos adipocitos diferenciados exhiben una menor cantidad de lípidos en relación a adipocitos controles. Con esto podemos plantear que la activa diferenciación y la posible presencia de mayor cantidad de ácidos grasos libres (dada la menor capacidad de almacenamiento) por efecto de la activación del CaSR, apoya el modelo disfuncional del tejido adiposo propuesto. Adicionalmente, la menor expresión de adiponectina apoya dicho modelo, siendo un evento que se debe confirmar en términos de abundancia proteica.

Para ilustrar los resultados expuestos, proponemos el siguiente modelo (Figura 17), que representa la interacción entre la activación del CaSR en el tejido adiposo y hepático y las manifestaciones de disfuncionalidad metabólica asociadas a la obesidad.

Receptor sensor de calcio (CaSR) y disfunción del tejido adiposo: diferenciación, señalización de insulina, almacenamiento de triglicéridos, expresión de adipocinas y manejo de triglicéridos en el hígado

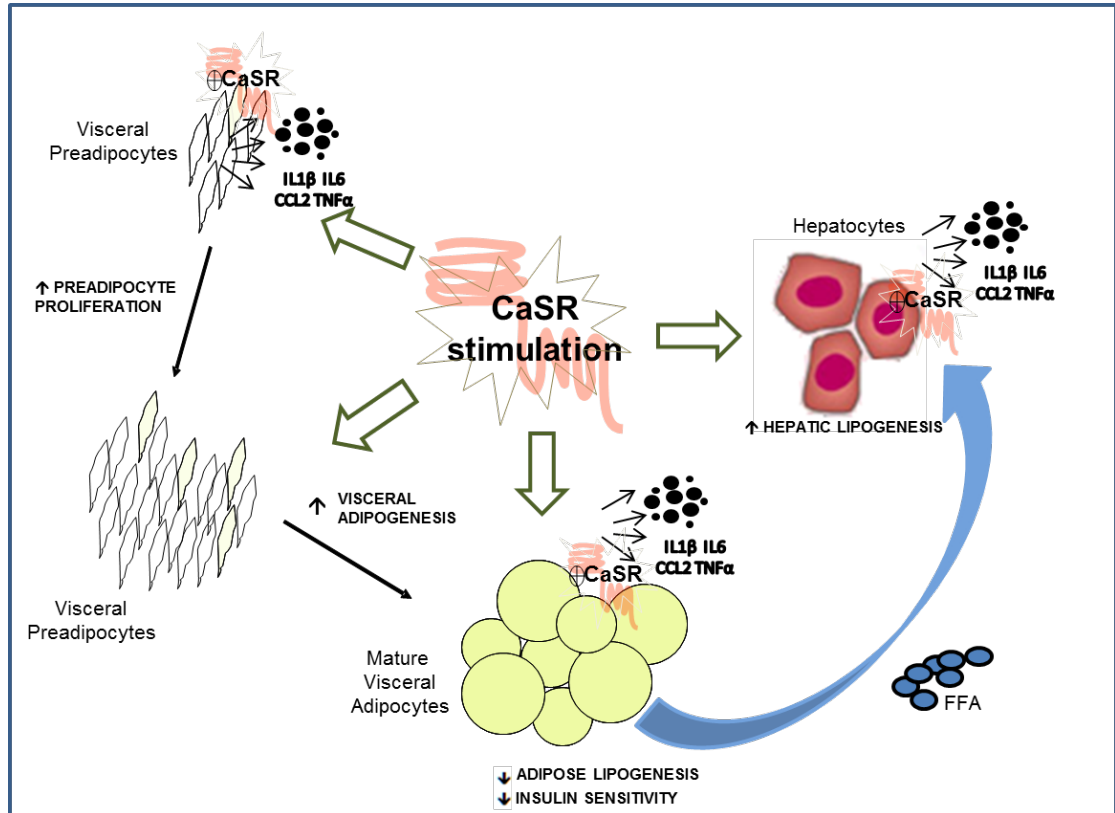


Figura 17. Mecanismo propuesto para la interacción entre la activación del CaSR en el tejido adiposo y hepático y las manifestaciones de disfuncionalidad metabólica asociadas a la obesidad. La activación del CaSR en preadipocitos se asocia con una elevación en la expresión de marcadores adipogénicos, mientras que la estimulación del CaSR en adipocitos diferenciados muestran un menor contenido de triglicéridos, consistente con la disminución en la expresión génica de las enzimas lipogénicas. En relación a la respuesta endocrina de los adipocitos por efecto de cinacalcet, se observó una disminución en la expresión génica de adiponectina. Por otro lado, en un contexto de sobreoferta lipídica, cinacalcet aumenta el contenido de triglicéridos en células hepáticas (ver detalles en el texto).

IX. REFERENCIAS

1. Abdullah et al. NFAT regulates calcium-sensing receptor-mediated TNF production. *Am J Physiol Renal Physiol* 290:1110-7, 2006
2. Abeyrathna & Su. The critical role of Akt in cardiovascular function. *Vascul Pharmacol* 74:38-48, 2015
3. Abranches et al. Obesity and diabetes: the link between adipose tissue dysfunction and glucose homeostasis. *Nutr Res Rev* 28:121-32, 2015
4. Adamczak & Wiecek. The adipose tissue as an endocrine organ. *Semin Nephrol* 33:2-13, 2013
5. Aragonès et al. Modulation of leptin resistance by food compounds. *Mol Nutr Food Res*, 2016
6. Araya et al. Increase in long-chain polyunsaturated fatty acid n-6/n-3 ratio in relation to hepatic steatosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Clin Sci* 106:635-643, 2004
7. Auguet et al. Altered fatty acid metabolism-related gene expression in liver from morbidly obese women with non-alcoholic fatty liver disease. *Int J Mol Sci* 15:22173-87, 2014
8. Bahner et al. Use of cinacalcet HCl to achieve the recommended targets of bone metabolism in a patient with therapy-resistant renal hyperparathyroidism. *J Ren Nutr* 18:383-8, 2008
9. Bastard et al. Adipose tissue IL-6 content correlates with resistance to insulin activation of glucose uptake both in vivo and in vitro. *J Clin Endocrinol Metab* 87, 2084-9, 2002.
10. Bays et al. Pathogenic potential of adipose tissue and metabolic consequences of adipocyte hypertrophy and increased visceral adiposity. *Expert Rev Cardiovasc Ther* 6:343-68, 2008
11. Bensinger & Tontonoz. Integration of metabolism and inflammation by lipid-activated nuclear receptors. *Nature* 454:470-7, 2008
12. Bokhari et al. Culture of HepG2 liver cells on three dimensional polystyrene scaffolds enhances cell structure and function during toxicological challenge. *J Anat* 211:567-76, 2007
13. Boura-Halfon & Zick. Phosphorylation of IRS proteins, insulin action, and insulin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 296, E581–E591, 2009
14. Breitwieser. Minireview: the intimate link between calcium sensing receptor trafficking and signaling: implications for disorders of calcium homeostasis. *Mol Endocrinol* 26:1482-95, 2012

Receptor sensor de calcio (CaSR) y disfunción del tejido adiposo: diferenciación, señalización de insulina, almacenamiento de triglicéridos, expresión de adipocinas y manejo de triglicéridos en el hígado

15. Brennan & Conigrave. Regulation of cellular signal transduction pathways by the extracellular calcium-sensing receptor. *Curr Pharm Biotechnol* 10:270-81, 2009
16. Brown et al. Cloning and characterisation of an extracellular Ca²⁺-sensing receptor from bovine parathyroid. *Nature* 366:575-580, 1993
17. Canaff & Hendy. Calcium-sensing receptor gene transcription is up-regulated by the proinflammatory cytokine, interleukin-1beta. Role of the NF-kappaB PATHWAY and kappaB elements. *J Biol Chem* 280:14177-88, 2005
18. Canaff et al. Extracellular calcium-sensing receptor is expressed in rat hepatocytes coupling to intracellular calcium mobilization and stimulation of bile flow. *Biol Chem* 276:4070-9, 2001
19. Canaff et al. The proinflammatory cytokine, interleukin-6, up-regulates calcium-sensing receptor gene transcription via Stat1/3 and Sp1/3. *J Biol Chem* 283:13586-600, 2008
20. Cao et al. Adipocyte Lipid Chaperone aP2 Is a Secreted Adipokine Regulating Hepatic Glucose Production. *Cell Metab* 17:768-78, 2013
21. Carbone et al. Immunological functions of leptin and adiponectin. *Biochimie* 94:2082-8, 2012
22. Cases et al. Cloning of DGAT2, a second mammalian diacylglycerol acyltransferase, and related family members. *J Biol Chem* 276: 38870-6, 2001
23. Cavanaugh et al. Behind the curtain: cellular mechanisms for allosteric modulation of calcium-sensing receptors. *Br J Pharmacol* 165:1670-7, 2012
24. Ceglia et al. Activation of the calcium sensing receptor stimulates gastrin and gastric acid secretion in healthy participants. *Osteoporos Int* 20:71-8, 2009
25. Chakravarti et al. Calcium-sensing receptor in cancer: good cop or bad cop? *Endocrine* 35:271-84, 2009
26. Chen & Goodman. Role of the calcium-sensing receptor in parathyroid gland physiology. *Am J Physiol Renal Physiol* 286:1005-11, 2004
27. Christodoulides et al. Adipogenesis and WNT signalling. *Trends Endocrinol Metab* 20:16-24, 2009
28. Cifuentes & Rojas. Antilipolytic effect of calcium-sensing receptor in human adipocytes. *Mol Cell Biochem* 319:17-21, 2008
29. Cifuentes et al. Calcium sensing receptor activation elevates proinflammatory factor expression in human adipose cells and adipose tissue. *Mol Cell Endocrinol* 361:24-30, 2012
30. Cifuentes et al. Calcium-sensing receptor expression in human adipocytes. *Endocrinology* 146:2176-9, 2005

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

31. Cifuentes et al. Differences in lipogenesis and lipolysis in obese and non-obese adult human adipocytes. *Biol Res* 41:197-204, 2008
32. Cifuentes et al. Obesity-associated proinflammatory cytokines increase calcium sensing receptor (CaSR) protein expression in primary human adipocytes and LS14 human adipose cell line. *Arch Biochem Biophys* 500:151-6, 2010
33. Codoñer-Franch et al. Polyamines are increased in obese children and are related to markers of oxidative/nitrosative stress and angiogenesis. *J Clin Endocrinol Metab* 96:2821-5, 2011
34. Coe et al. Targeted disruption of the adipocyte lipid-binding protein (aP2 protein) gene impairs fat cell lipolysis and increases cellular fatty acid levels. *J Lipid Res* 40:967-72, 1999
35. Conigrave & Ward. Calcium-sensing receptor (CaSR): Pharmacological properties and signaling pathways. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism* 27:315-31, 2013
36. Cook et al. Biased allosteric modulation at the CaS receptor engendered by structurally diverse calcimimetics. *Br J Pharmacol* 172:185-200, 2015
37. Cristancho & Lazar. Forming functional fat: a growing understanding of adipocyte differentiation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 12:722-34, 2011
38. Cui et al. Quantification and mechanisms of oleic acid-induced steatosis in HepG2 cells. *Am J Transl Res* 2:95-104, 2010
39. Danforth. Failure of adipocyte differentiation causes type II diabetes mellitus? *Nature Genet* 26:13, 2000
40. Del Pozo et al. Expression profile in omental and subcutaneous adipose tissue from lean and obese subjects. Repression of lipolytic and lipogenic genes. *Obes Surg* 21:633-43, 2011
41. Dong. Cinacalcet: An oral calcimimetic agent for the management of hyperparathyroidism. *Clin Ther* 27:1725-51, 2005
42. Donnelly et al. Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Invest* 115:1343-51, 2005
43. Drolet et al. Hypertrophy and hyperplasia of abdominal adipose tissues in women. *Int J Obes* 32:283-91, 2008
44. Dvorak et al. Physiological changes in extracellular calcium concentration directly control osteoblast function in the absence of calciotropic hormones. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:5140-5, 2004
45. Fabbrini et al. Metabolically normal obese people are protected from adverse effects following weight gain. *J Clin Invest* 125:787-95, 2015

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

46. Fantuzzi. Adipose tissue, adipokines, and inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 115:911-9, 2005
47. Farooqi & O'Rahilly. Leptin: a pivotal regulator of human energy homeostasis. *Am J Clin Nutr* 89:980S-4S, 2009
48. Frühbeck et al. The adipocyte: a model for integration of endocrine and metabolic signaling in energy metabolism regulation. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 280:E827-47, 2001
49. Furuhashi & Hotamisligil. Fatty acid-binding proteins: role in metabolic diseases and potential as drug targets. *Nat Rev Drug Discov* 7:489- 503, 2008
50. Furuhashi et al. Fatty Acid-Binding Protein 4 (FABP4): Pathophysiological Insights and Potent Clinical Biomarker of Metabolic and Cardiovascular Diseases. *Clin Med Insights Cardiol* 8:23-33, 2015
51. Furuhashi et al. Treatment of diabetes and atherosclerosis by inhibiting fatty-acid-binding protein aP2. *Nature* 447:959-65, 2007
52. Gaggini et al. Not all fats are created equal: adipose vs. ectopic fat, implication in cardiometabolic diseases. *Horm Mol Biol Clin Investig* 22:7-18, 2015
53. Gao et al. Interleukin-1 β mediates macrophage-induced impairment of insulin signaling in human primary adipocytes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 307:E289-304, 2014
54. Garcia et al. Cellular glutathione in fatty liver in vitro models. *Toxicol In Vitro* 25:1501-6, 2011
55. García-Fuentes et al. Hypoxia is associated with a lower expression of genes involved in lipogenesis in visceral adipose tissue. *J Transl Med* 13:373, 2015
56. Georgiadi & Kersten. Mechanisms of Gene Regulation by Fatty Acids. *Adv Nutr* 3:127-34, 2012
57. Giannessi et al. Adiponectin circulating levels: a new emerging biomarker of cardiovascular risk. *Pharmacol Res* 56:459-67, 2007
58. Ginsberg et al. Metabolic syndrome: Focus on dyslipidemia. *Obesity* 14:41-9, 2006
59. Gómez-Lechón et al. A human hepatocellular in vitro model to investigate steatosis. *Chem Biol Interact* 165:106-16, 2007
60. Gonzales & Orlando. Role of adipocyte-derived lipoprotein lipase in adipocyte hypertrophy. *Nutr Metab* 4:22, 2007
61. Gray et al. Activation of the extracellular calcium-sensing receptor initiates insulin secretion from human islets of Langerhans: involvement of protein kinases. *J Endocrinol* 190:703-10, 2006
62. Green & Meuth. An established pre-adipose cell line and its differentiation in culture. *Cell* 3:127-133, 1974

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

63. Guilherme et al. Adipocyte dysfunctions linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9:367-77, 2008
64. Gurnell. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma and the regulation of adipocyte function: lessons from human genetic studies. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 19:501-23, 2005
65. Hamdy et al. Metabolic obesity: the paradox between visceral and subcutaneous fat. *Curr. Diabetes Rev* 2:367-73, 2006
66. Hauner. Secretory factors from human adipose tissue and their functional role. *Proc Nutr Soc* 64:163-9, 2005
67. He et al. The calcium-sensing receptor promotes adipocyte differentiation and adipogenesis through PPARgamma pathway. *Mol Cell Biochem* 361:321-8, 2012
68. Hendy et al. The CASR gene: Alternative splicing and transcriptional control, and calcium-sensing receptor (CaSR) protein: Structure and ligand binding sites. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism* 27:285-301, 2013
69. Herman & Kahn. Glucose transport and sensing in the maintenance of glucose homeostasis and metabolic harmony. *Clin. Invest* 116:1767-75, 2006
70. Hirsch & Han. Cellularity of rat adipose tissue: effects of growth, starvation, and obesity. *J Lipid Res* 10:77-82, 1969
71. Horton et al. Combined analysis of oligonucleotide microarray data from transgenic and knockout mice identifies direct SREBP target genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:12027-32, 2003
72. Hotamisligil et al. Adipose expression of tumor necrosis factor- α : direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science* 259:87-91, 1993
73. Hotamisligil et al. Uncoupling of obesity from insulin resistance through a targeted mutation in aP2, the adipocyte fatty acid binding protein. *Science* 274:1377-9, 1996
74. Hresko & Mueckler. mTOR.RICTOR is the Ser473 kinase for Akt/protein kinase B in 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem* 280:40406-16, 2005
75. Hugo et al. LS14: a novel human adipocyte cell line that produces prolactin. *Endocrinology* 147:306-13, 2006
76. Ibrahim. Subcutaneous and visceral adipose tissue: structural and functional differences. *Obes Rev* 11:11-8, 2010
77. Iwaki et al. Induction of adiponectin, a fat-derived antidiabetic and antiatherogenic factor, by nuclear receptors. *Diabetes* 52:1655-63, 2003
78. Janicic et al. Mapping of the calcium-sensing receptor gene (CASR) to human chromosome 3q13.3-21 by fluorescence in situ hybridization, and localization to rat chromosome 11 and mouse chromosome 16. *Mamm Genome* 6: 798-801, 1995

Receptor sensor de calcio (CaSR) y disfunción del tejido adiposo: diferenciación, señalización de insulina, almacenamiento de triglicéridos, expresión de adipocinas y manejo de triglicéridos en el hígado

79. Janorkar et al. Development of an in vitro cell culture model of hepatic steatosis using hepatocyte-derived reporter cells. *Biotechnology and Bioengineering* 102:1466-74, 2009
80. Jensen-Urstad & Semenkovich. Fatty acid synthase and liver triglyceride metabolism: housekeeper or messenger?. *Biochim Biophys Acta* 1821:747-53, 2012
81. Jung & Choi. Obesity and its metabolic complications: the role of adipokines and the relationship between obesity, inflammation, insulin resistance, dyslipidemia and nonalcoholic fatty liver disease. *Int J Mol Sci* 15:6184-223, 2014
82. Kelly et al. Global burden of obesity in 2005 and projections to 2030. *Int J Obes* 32:1431-7, 2008
83. Kenakin & Christopoulos. Signalling bias in new drug discovery: detection, quantification and therapeutic impact. *Nat Rev Drug Discov* 12: 205–216, 2013
84. Kenakin. Functional selectivity and biased receptor signaling. *J Pharmacol Exp Ther* 336: 296–302, 2011
85. Kim et al. Obesity-associated improvements in metabolic profile through expansion of adipose tissue. *J Clin Invest* 117:2621-37, 2007
86. Kwan et al. Inhibition of DNA-dependent protein kinase reduced palmitate and oleate-induced lipid accumulation in HepG2 cells. *Eur J Nutr* 52:1621-30, 2012
87. Large et al. Metabolism of lipids in human white adipocyte. *Diabetes Metab* 30:294-309, 2004
88. Larsen et al. Interleukin-1-receptor antagonist in type 2 diabetes mellitus. *N Engl J Med* 356:1517-26, 2007
89. Lee & Fried. Integration of hormonal and nutrient signals that regulate leptin synthesis and secretion. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 296:E1230-8, 2009
90. Lee et al. Pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of the calcimimetic agent cinacalcet (KRN1493) in healthy male Korean subjects: a randomized, open-label, single ascending-dose, parallel-group study. *Clin Ther* 34:1160-9, 2012
91. Lee et al. The calcium-sensing receptor regulates the NLRP3 inflammasome through Ca₂p and cAMP. *Nature* 492: 123-7, 2012
92. Li et al. Review: Epigenetic regulation of adipocyte differentiation and adipogenesis. *J Zhejiang Univ Sci B* 11:784-91, 2010
93. Liang et al. Diminished hepatic response to fasting/refeeding and liver X receptor agonists in mice with selective deficiency of sterol regulatory element-binding protein-1c. *J Biol Chem* 277:9520-8, 2002
94. Listenberger et al. Triglyceride accumulation protects against fatty acid-induced lipotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:3077-82, 2003

Receptor sensor de calcio (CaSR) y disfunción del tejido adiposo: diferenciación, señalización de insulina, almacenamiento de triglicéridos, expresión de adipocinas y manejo de triglicéridos en el hígado

95. Liu et al. Knockdown of acyl-CoA:diacylglycerol acyltransferase 2 with antisense oligonucleotide reduces VLDL TG and ApoB secretion in mice. *Biochim Biophys Acta* 1781:97-104, 2008
96. Liu et al. Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Properties of Cinacalcet (KRN1493) in Chinese Healthy Volunteers: A Randomized, Open-Label, Single Ascending-Dose and Multiple-Dose, Parallel-Group Study. *Clin Ther* 38:348-57, 2016
97. Liu et al. Roles of chronic low-grade inflammation in the development of ectopic fat deposition. *Mediators of inflammation* 2014: 418185, 2014
98. Lodhi et al. Lipoexpediency: de novo lipogenesis as a metabolic signal transmitter. *Trends Endocrinol Metab* 22:1-8, 2011
99. Lumeng et al. Macrophages block insulin action in adipocytes by altering expression of signaling and glucose transport proteins. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 292:E166-74, 2007
100. Ma et al. Control of adipocyte differentiation in different fat depots; implications for pathophysiology or therapy. *Front Endocrinol (Lausanne)* 6:1, 2015
101. Magno et al. The calcium-sensing receptor: a molecular perspective. *Endocr Rev* 32:3-30, 2011
102. Malhi & Gores. Molecular mechanisms of lipotoxicity in nonalcoholic fatty liver disease. *Semin. Liver Dis* 28:360-9, 2008
103. Marcocci & Cetani. Update on the use of cinacalcet in the management of primary hyperparathyroidism. *J Endocrinol Invest* 35:90-5, 2012
104. Mariman & Wang. Adipocyte extracellular matrix composition, dynamics and role in obesity. *Cell Mol Life Sci* 67:1277-92, 2010
105. Martinez-Camblor. Ajuste del valor-p por contrastes múltiples. *Rev Chil Salud Pública* 16: 225-32, 2012
106. Mayas et al. Decrease in FASN expression in adipose tissue of hypertensive individuals. *Am J Hypertens* 22:1258-62, 2009
107. McArdle et al. Mechanisms of obesity-induced inflammation and insulin resistance: insights into the emerging role of nutritional strategies. *Front Endocrinol* 4:52, 2013
108. McCarthy & Elmendorf. GLUT4's itinerary in health & disease. *Indian J Med Res* 125:373-88, 2007
109. Menendez et al. Fatty acid synthase: association with insulin resistance, type 2 diabetes, and cancer. *Clin Chem* 55:425-38, 2009

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

110. Miedlich et al. Homology modeling of the transmembrane domain of the human calcium sensing receptor and localization of an allosteric binding site. *J Biol Chem* 279, 7254-63, 2004
111. Mita et al. FABP4 is secreted from adipocytes by adenylyl cyclase-PKA- and guanylyl cyclase-PKG-dependent lipolytic mechanisms. *Obesity* 23:359-67, 2015
112. Mitch. Proteolytic mechanisms, not malnutrition, cause loss of muscle mass in kidney failure. *J Ren Nutr* 16: 208–211, 2006
113. Monetti et al. Dissociation of hepatic steatosis and insulin resistance in mice overexpressing DGAT in the liver. *Cell Metab* 6: 69–78, 2007
114. Moon. Low skeletal muscle mass is associated with insulin resistance, diabetes, and metabolic syndrome in the Korean population: the Korea National Health and Nutrition Examination Survey (KNHANES) 2009-2010. *Endocr J* 61:61-70, 2014
115. Moreno & Martínez. Tejido adiposo: órgano de almacenamiento y órgano secretor. *Anales Sist Sanit Navar*; 25:29-39, 2002
116. Moreno-Indias & Tinahones. Impaired adipose tissue expandability and lipogenic capacities as ones of the main causes of metabolic disorders. *J Diabetes Res*. 2015
117. Nakagawa et al. Cinacalcet does not affect longitudinal growth but increases body weight gain in experimental uraemia. *Nephrol Dial Transplant* 23:2761-7, 2008.
118. Nakamura et al. Regulation of energy metabolism by long-chain fatty acids. *Prog Lipid Res* 53:124-44, 2014
119. Nielsen et al. Inhibition of PTH secretion by interleukin-1 beta in bovine parathyroid glands in vitro is associated with an up-regulation of the calcium-sensing receptor mRNA. *Biochem Biophys Res Commun* 238, 880-5, 1997
120. Nov et al. Interleukin-1 β regulates fat-liver crosstalk in obesity by auto-paracrine modulation of adipose tissue inflammation and expandability. *PLoS One* 8:e53626, 2013
121. Nystrom et al. Caveolin-1 interacts with the insulin receptor and can differentially modulate insulin signaling in transfected Cos-7 cells and rat adipose cells. *Mol Endocrinol* 13:2013-24, 1999
122. Ortega et al. The gene expression of the main lipogenic enzymes is downregulated in visceral adipose tissue of obese subjects. *Obesity* 18:13-20, 2010
123. Osborn & Olefsky. The cellular and signaling networks linking the immune system and metabolism in disease. *Nat Med* 18:363-74, 2012
124. Padhi & Harris. Clinical pharmacokinetic and pharmacodynamic profile of cinacalcet hydrochloride. *Clin Pharmacokinet* 48:303-11, 2009

Receptor sensor de calcio (CaSR) y disfunción del tejido adiposo: diferenciación, señalización de insulina, almacenamiento de triglicéridos, expresión de adipocinas y manejo de triglicéridos en el hígado

125. Pajvani et al. Complex distribution, not absolute amount of adiponectin, correlates with thiazolidinedione mediated improvement in insulin sensitivity. *J Biol Chem* 279:12152–62, 2004
126. Palacios-Ortega et al. Effect of TNF-Alpha on Caveolin-1 Expression and Insulin Signaling During Adipocyte Differentiation and in Mature Adipocytes. *Cell Physiol Biochem* 36:1499-516, 2015
127. Palou et al. Sequential changes in the expression of genes involved in lipid metabolism in adipose tissue and liver in response to fasting. *Pflugers Arch* 456:825-36, 2008
128. Park et al. Triglyceride is a useful surrogate marker for insulin resistance in Korean women with polycystic ovary syndrome. *Yonsei Med J* 56:785-92, 2015
129. Paz-Filho et al. Leptin: molecular mechanisms, systemic pro-inflammatory effects, and clinical implications. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 56:597–607, 2012
130. Pfaffl. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29:e45, 2001
131. Poulain-Godefroy et al. Inflammation is associated with a decrease of lipogenic factors in omental fat in women. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 295:1-7, 2008
132. Poupeau & Postic. Cross-regulation of hepatic glucose metabolism via ChREBP and nuclear receptors. *Biochim Biophys Acta* 1812:995-1006, 2011
133. Proença et al. New concepts in white adipose tissue physiology. *Braz J Med Biol Res* 47:192-205, 2014
134. Puri et al. A lipidomic analysis of nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 46:1081-90, 2007
135. Qi et al. The use of stable isotope-labeled glycerol and oleic acid to differentiate the hepatic functions of DGAT1 and -2. *J Lipid Res* 53:1106-16, 2012
136. Ricchi et al. Differential effect of oleic and palmitic acid on lipid accumulation and apoptosis in cultured hepatocytes. *J Gastroenterol. Hepatol* 24:830-40, 2009
137. Rosen & MacDougald. Adipocyte differentiation from the inside out. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7: 885-96, 2006
138. Rosen & Spiegelman. Adipocytes as regulators of energy balance and glucose homeostasis. *Nature*. 444, 847-853, 2006
139. Rosen & Spiegelman. PPARgamma: a nuclear regulator of metabolism, differentiation, and cell growth. *J Biol Chem* 276:37731-4, 2001
140. Rossol et al. Extracellular Ca²⁺ is a danger signal activating the NLRP3 inflammasome through G protein-coupled calcium sensing receptors. *Nat Commun* 3:1329, 2012

Receptor sensor de calcio (CaSR) y disfunción del tejido adiposo: diferenciación, señalización de insulina, almacenamiento de triglicéridos, expresión de adipocinas y manejo de triglicéridos en el hígado

141. Rotter et al. Interleukin-6 (IL-6) induces insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes and is, like IL-8 and tumor necrosis factor- α , overexpressed in human fat cells from insulin-resistant subjects. *J Biol Chem* 278:45777-84, 2003
142. Rumberger et al. Role of hexosamine biosynthesis in glucose-mediated up-regulation of lipogenic enzyme mRNA levels: effects of glucose, glutamine, and glucosamine on glycerophosphate dehydrogenase, fatty acid synthase, and acetyl-CoA carboxylase mRNA levels. *J Biol Chem* 278:28547-52, 2003
143. Rydén et al. Adipocyte triglyceride turnover and lipolysis in lean and overweight subjects. *J Lipid Res* 54:2909-13, 2013
144. Saini. Molecular mechanisms of insulin resistance in type 2 diabetes mellitus. *World J Diabetes* 1:68-75, 2010
145. Saponaro et al. The Subtle Balance between Lipolysis and Lipogenesis: A Critical Point in Metabolic Homeostasis. *Nutrients* 7:9453-74, 2015
146. Schäffler & Schölmerich. Innate immunity and adipose tissue biology. *Trends Immunol* 31:228-35, 2010
147. Scheid & Woodgett. Unravelling the activation mechanisms of protein kinase B/Akt. *FEBS Lett* 546:108-12, 2003
148. Schoonjans et al. PPAR α and PPAR γ activators direct a distinct tissue-specific transcriptional response via a PPRE in the lipoprotein lipase gene. *EMBO J* 15:5336-48, 1996
149. Sekimoto et al. Dissociation of the insulin receptor from caveolae during TNF α -induced insulin resistance and its recovery by D-PDMP. *FEBS Lett* 586:191-195, 2012
150. Seo et al. PPAR agonists treatment is effective in a nonalcoholic fatty liver disease animal model by modulating fatty-acid metabolic enzymes. *Gastroenterol Hepatol* 23:102-109, 2008
151. Shi et al. Role of intracellular calcium in human adipocyte differentiation. *Physiol Genomics* 3:75-82, 2000
152. Shimano et al. Elevated levels of SREBP-2 and cholesterol synthesis in livers of mice homozygous for a targeted disruption of the SREBP-1 gene. *J Clin Invest* 100:2115-24, 1997
153. Skurk et al. Relationship between adipocyte size and adipokine expression and secretion. *J Clin Endocrinol Metab* 92:1023-33, 2007
154. Smith & Hammarstedt. Antagonistic effects of thiazolidinediones and cytokines in lipotoxicity. *Biochim Biophys Acta* 1801:377-80, 2010

Receptor sensor de calcio (CaSR) y disfunción del tejido adiposo: diferenciación, señalización de insulina, almacenamiento de triglicéridos, expresión de adipocinas y manejo de triglicéridos en el hígado

155. Smith et al. Mapping of the hormone-sensitive lipase binding site on the adipocyte fatty acid-binding protein (AFABP). Identification of the charge quartet on the AFABP/aP2 helix-turn-helix domain. *J Biol Chem* 283:33536-43, 2008
156. Spalding et al. Dynamics of fat cell turnover in humans. *Nature* 453, 783-7, 2008
157. St Peter et al. Parathyroid hormone change after cinacalcet initiation and one-year clinical outcome risk: a retrospective cohort study. *BMC Nephrol* 16:41, 2015
158. Staels & Fruchart. Therapeutic roles of peroxisome proliferator-activated receptor agonists. *Diabetes* 54:2460-70, 2005
159. Stephens & Pekala. Transcriptional repression of the GLUT4 and C/EBP genes in 3T3-L1 adipocytes by tumor necrosis factor- α . *J Biol Chem* 266:21839-21845, 1991
160. Strawford et al. Adipose tissue triglyceride turnover, de novo lipogenesis and cell proliferation in humans measured with $^2\text{H}_2\text{O}$. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 286:577-88, 2003
161. Takashima et al. Regulation of SREBP1c expression by mTOR signaling in hepatocytes. *Kobe J Med Sci* 55:E45-52, 2009
162. Tfelt-Hansen et al. The calcium-sensing receptor in human disease. *Front Biosci* 8: S377-90, 2003
163. Thorne et al. Increased visceral adipocyte lipolysis-A pathogenic role in nonalcoholic fatty liver disease? *J Clin Endocrinol Metab* 95, E209-E213, 2010
164. Tilg & Moschen. Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity *Nat Rev Immunol* 6:772-83, 2006
165. Tilg & Moschen. Insulin resistance, inflammation, and non-alcoholic fatty liver disease. *Trends Endocrinol Metab* 19:371-9, 2008
166. Trujillo & Scherer. Adipose tissue-derived factors: impact on health and disease. *Endocr Rev* 27:762-78, 2006
167. Tu et al. The role of the calcium-sensing receptor in epidermal differentiation. *Cell Calcium* 35:265-73, 2004
168. Ueki et al. Molecular balance between the regulatory and catalytic subunits of phosphoinositide 3-kinase regulates cell signaling and survival. *Mol Cell Biol* 22:965-77, 2002
169. Ueki et al. Suppressor of cytokine signaling 1 (SOCS-1) and SOCS-3 cause insulin resistance through inhibition of tyrosine phosphorylation of insulin receptor substrate proteins by discrete mechanisms. *Mol Cell Biol* 24, 5434-46, 2004
170. Ullrich et al. Adipose tissue fatty acid composition in humans with lipoprotein lipase deficiency. *J Investig Med* 49:273-5, 2001

Receptor sensor de calcio (CaSR) y disfunción del tejido adiposo: diferenciación, señalización de insulina, almacenamiento de triglicéridos, expresión de adipocinas y manejo de triglicéridos en el hígado

171. Van Dam et al. Akt activation is required at a late stage of insulin-induced GLUT4 translocation to the plasma membrane. *Mol Endocrinol* 19:1067-77, 2005
172. Vazquez-Vela et al. White adipose tissue as endocrine organ and its role in obesity. *Arch Med Res* 39:715–728, 2008
173. Verrijken et al. Visceral adipose tissue and inflammation correlate with elevated liver tests in a cohort of overweight and obese patients. *Int J Obes* 34: 899-907, 2010
174. Villarroel et al. Adipogenic effect of calcium sensing receptor activation. *Mol Cell Biochem* 384:139-45, 2013
175. Villarroel et al. Calcium, obesity, and the role of the calcium-sensing receptor. *Nutr Rev* 72:627-37, 2014
176. Virtue & Vidal-Puig. It's not how fat you are, it's what you do with it that counts. *PLoS Biol* 6:e237, 2008
177. Visscher & Seidell. The public health impact of obesity. *Annu Rev Public Health* 22, 355–75, 2001
178. Wallace et al. Influence of birth weight and gender on lipid status and adipose tissue gene expression in lambs. *J Mol Endocrinol* 53:131-44, 2014
179. Wang & Eckel. Lipoprotein lipase: from gene to obesity. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 297:271-88, 2009
180. Wang et al. Insulin-stimulated leptin secretion requires calcium and PI3K-Akt activation. *Biochem J* [Epub ahead of print], 2014
181. Ward et al. The role of the calcium-sensing receptor in human disease. *Clin Biochem* 45:943-53, 2012
182. Weickert & Pfeiffer. Signalling mechanisms linking hepatic glucose and lipid metabolism. *Diabetologia* 49:1732-41, 2006
183. Weinstock et al. Severe hypertriglyceridemia, reduced high density lipoprotein, and neonatal death in lipoprotein lipase knockout mice. Mild hypertriglyceridemia with impaired very low density lipoprotein clearance in heterozygotes. *J Clin Invest* 96:2555-68, 1995
184. Whiteman et al. Role of Akt/protein kinase B in metabolism. *Trends Endocrinol Metab* 13:444-51, 2002
185. Wu et al. Calcium-sensing receptor in the T lymphocyte enhanced the apoptosis and cytokine secretion in sepsis. *Mol Immunol* 63:337-42, 2015
186. Xing et al. The functional expression of calcium-sensing receptors in BRL cells and related signal transduction pathway responsible for intracellular calcium elevation. *Mol Cell Biochem* 343:13-9, 2010

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

187. Xu et al. Adipocyte fatty acid-binding protein is a plasma biomarker closely associated with obesity and metabolic syndrome. *Clin Chem*; 52:405-13, 2006
188. Yang et al. Impaired adipogenesis in adipose tissue associated with hepatic lipid deposition induced by chronic inflammation in mice with chow diet. *Life Sci* 137:7-13, 2015
189. Yen et al. Thematic review series: glycerolipids. DGAT enzymes and triacylglycerol biosynthesis. *J Lipid Res* 49:2283-301, 2008
190. Yokoyama et al. Cinacalcet for hemodialyzed patients with or without a high PTH level to control serum calcium and phosphorus: ECO (evaluation of cinacalcet HCl outcome) study. *Clin Nephrol* 78:87-92, 2012
191. Zammit et al. Diacylglycerol acyltransferases: Potential roles as pharmacological targets. *Pharmacol Ther* 118:295-302, 2008
192. Zhang et al. Associations of Different Adipose Tissue Depots with Insulin Resistance: A Systematic Review and Meta-analysis of Observational Studies. *Sci Rep* 5:18495, 2015
193. Zhang et al. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 372:425-32, 1994

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

X. AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mis padres y hermanos por confiar y creer en mí. A mi marido por su paciencia y permanente apoyo a mi lado.

A mi directora de tesis, Dra. Mariana Cifuentes, quien permitió el desarrollo de este trabajo, por darme la oportunidad de ampliar mis perspectivas, por su apoyo en todo este proceso, confianza y constante guía académico. Por su disposición, entrega de conocimientos, formación, motivación y amplia calidad humana. A todos las personas del Laboratorio de Nutrición Básica y Epidemiología Genética que me acompañaron estos últimos 5 años, por el estímulo de trabajo, consejos y cooperación para optimizar la realización de esta tesis.

A los profesores integrantes de la comisión evaluadora, Dr. Miguel Llanos, Dr. Diego García y Dr. Víctor Cortés por poner su expertiz al servicio de esta tesis, dedicando su tiempo en correcciones y discusiones que han significado la elaboración de un mejor trabajo.

A la Dra. Susan K. Fried y Dra. Mi- Jeong Lee del Boston Nutrition and Obesity Reaserch Center de Boston University por abrirme las puertas de su laboratorio para perfeccionar metodologías de trabajo en mi modelo de estudio.

A los médicos que colaboraron para que esta tesis saliera adelante. Dr. Leonardo Rodríguez Grunert y su equipo de cirugía de la Clinca Indisa quienes facilitaron las muestras de tejido adiposo. Al Dr. Marco Arrese Jimenez del Laboratorio de Hepatología Experimental de la Pontificia Universidad Católica de Chile quien desinteresadamente aportó con muestras de tejido hepático y su experta visión.

Receptor sensor de calcio (CaSR) y disfunción del tejido adiposo: diferenciación, señalización de insulina, almacenamiento de triglicéridos, expresión de adipocinas y manejo de triglicéridos en el hígado

XI. ANEXOS

XI.1.- La activación del CaSR disminuye la expresión del RNAm de PPAR γ , GPD y LPL en células adiposas LS14 diferenciadas

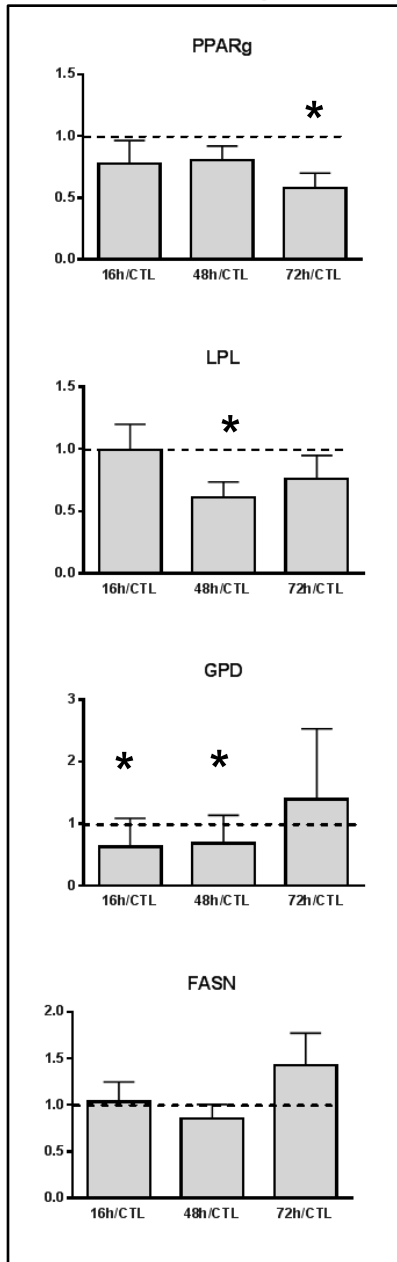


Figura 18. Efecto de cinacalcet sobre la expresión del RNAm de marcadores lipogénicos (PPAR γ , GPD, LPL, FAS) en células adiposas LS14 diferenciadas. Los adipocitos LS14 fueron diferenciados por 7 días y tratados el día 7 con cinacalcet 1 μ M durante 16, 48 y 72 horas. Las figuras representan las medias \pm SEM para cada gen frente a su propio control diferenciado tratado con vehículo, normalizado al valor 1 (representado por la línea). * p < 0.05 vs 1, Prueba de Wilcoxon (n=10).

En la figura 18 se muestra la expresión génica de algunos marcadores de lipogénesis a las 16, 48 y 72 horas de exposición a cinacalcet, confirmando que la estimulación del CaSR disminuye la expresión génica de PPAR γ a las 72 horas, de GPD a partir de las 16 horas y de LPL a las 48 horas. El ARNm de FAS no responde a la activación del CaSR.

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

XI.2.- Estabilidad del ciclo umbral de GAPDH en adipocitos LS14

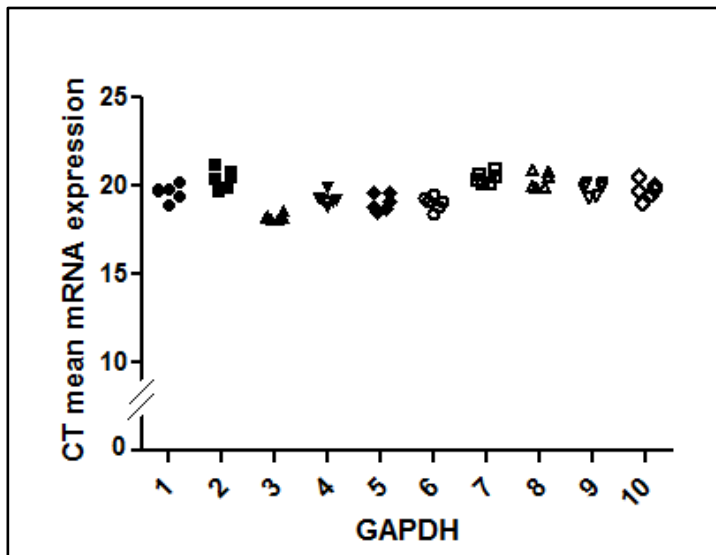


Figura 19. Ciclo umbral para GAPDH como gen housekeeping en 10 experimentos independientes de adipocitos LS14. El eje x representa 10 experimentos (1-10) (n=6 de cada experimento)

Todos los experimentos fueron normalizados por la expresión de GAPDH, gen control que manifestó un comportamiento estable en la línea celular LS14. El coeficiente de variación promedio de GAPDH fue del 2%.

Receptor sensor de calcio (CaSR) y disfunción del tejido adiposo: diferenciación, señalización de insulina, almacenamiento de triglicéridos, expresión de adipocinas y manejo de triglicéridos en el hígado

XI.3.- Los cultivos celulares LS14 poseen una abundancia de RNAm conservada

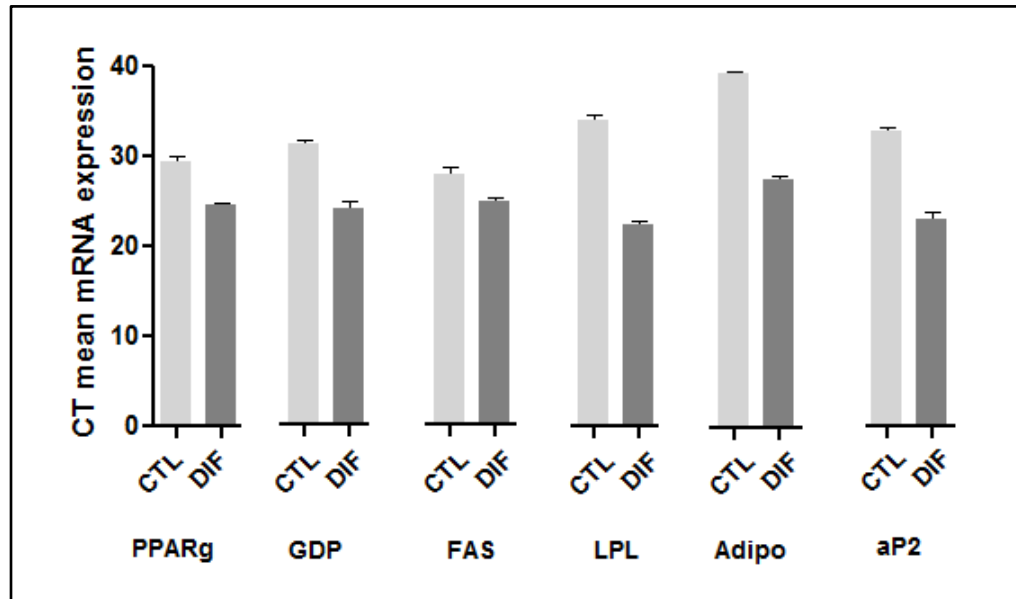


Figura 20. Ciclo umbral promedio de genes que codifican para marcadores adipogénicos en 10 experimentos representativos con células LS14 controles v/s diferenciadas. Las barras representan media \pm SEM.

Las células controles presentaron CTs en un rango de 39 para Adipo a 28 para FAS. Un CT de 39 en Adipo explica la gran diferencia entre células controles y diferenciadas, dado que por el valor basal tan bajo, un pequeño aumento en la abundancia relativa del mensajero se refleja en un cambio sustancial del cálculo de la abundancia relativa (RQ) en la fórmula de Pfaffl (Pfaffl, 2001). Sin embargo, todos los CTs de células diferenciadas son inferiores a 28, confirmando que las células efectivamente poseen una cantidad de RNAm suficiente en células diferenciadas. Así, las diferencias matemáticas entre células controles y diferenciadas no son un artificio que oculte que verdaderamente hay muy poco mensajero.

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

XI.4.- Cinacalcet no afecta la muerte celular de células LS14

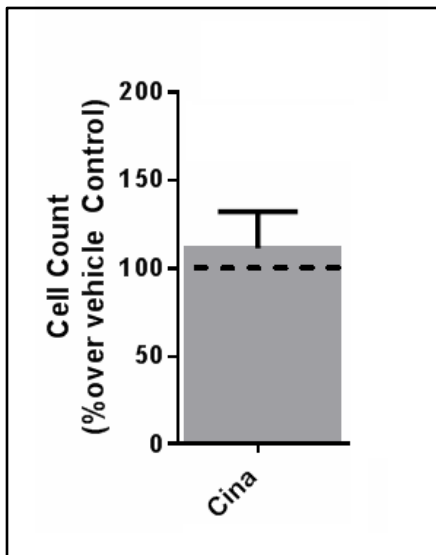


Figura 21. Efecto de cinacalcet sobre la muerte celular de preadipocitos LS14. Preadipocitos expuestos durante 72 horas a cinacalcet. Porcentaje de células muertas, según tinción con azul de tripán y conteo por hemocitometría. Las barras representan la media \pm SEM. Test de Wilcoxon para células expuestas a cinacalcet (2 μ M) comparadas con células control representada por el 100% (línea de puntos) (n=11).

Luego de utilizar el protocolo por exclusión de conteo de células teñidas con azul de tripan, se obtuvo el conteo de células muertas. La figura 21 indica que no se observa una diferencia significativa en el número de células muertas de aquellos cultivos expuestos a cinacalcet en comparación con los cultivos tratados con el vehículo. Estos datos confirman que el calcimimético no tiene efectos sobre la muerte celular en la línea celular LS14.

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

XI.5.- Activación del CaSR no afecta la expresión de marcadores de adipocito diferenciado en preadipocitos LS14

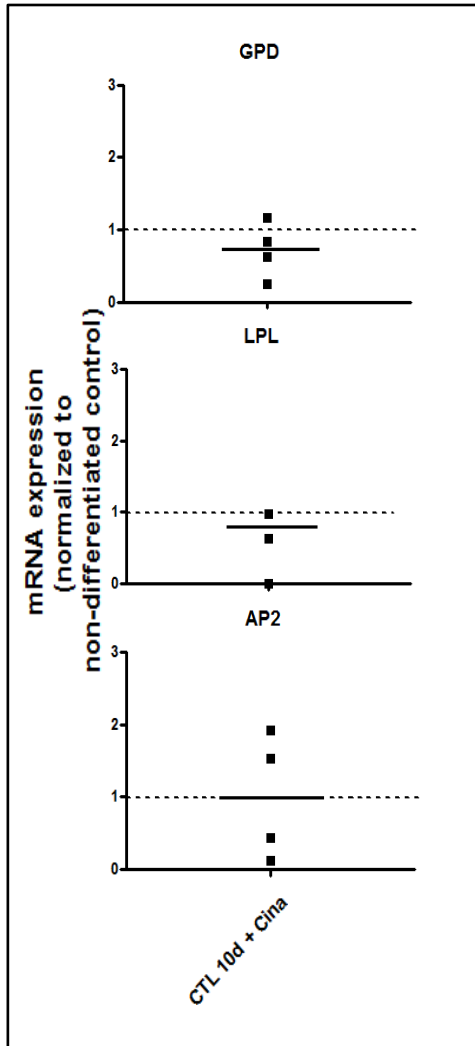


Figura 22. Efecto de cinacalcet sobre marcadores de adipocito diferenciado en células preadiposas LS14 no diferenciadas. Células expuestas a cinacalcet durante 10 días y evaluación de la expresión de marcadores con mayor expresión en el adipocito diferenciado al día 10 (GPD, LPL, aP2). Las figuras representan la mediana (negrita) para cada gen frente a su propio control no diferenciado, normalizado al valor 1 (línea de puntos). Prueba de Wilcoxon no significativa $p > 0,05$ ($n=4$).

En la figura 22 se observa que cinacalcet no tiene efectos sobre la expresión génica de GPD, LPL y aP2 en preadipocitos. Por lo tanto, podemos sugerir que la activación del CaSR no modifica la expresión de marcadores de adipocito maduro en células a las que no se les da el estímulo adipogénico.

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

XI.6.- Tabla 2

Características antropométricas y bioquímicas de los donantes de tejido adiposo

Variable	Responde a insulina (n=3)	No responde a insulina (n=3)	Valor p de Wilcoxon
Genero (M/F)	1/2	0/3	-
Edad (años)	32,3 ± 11,5	26,3 ± 4,2	0,5
IMC (kg/cmt2)	35,2 ± 2,3	34,1 ± 3,9	0,75
CC (cmts)	102,3 ± 8,1	97,7 ± 9,1	0,75
Glicemia (mg/dL)	108,3 ± 44,7	90 ± 4	1
Col-tot (mg/dL)	192,7 ± 40,2	206 ± 35,5	1
Col-HDL (mg/dL)	51,0 ± 4,6	61,7 ± 14	0,5
Col-LDL (mg/dL)	115,0 ± 25,2	114,7 ± 22,1	1
TAG (mg/dL)	133,3 ± 59,1	149,3 ± 49,3	0,5
GCT (%)	42,8 ± 3	45,9 ± 5	0,5
MM (kg)	32,0 ± 6,5	26,2 ± 2,8	0,25

Las variables séricas se obtuvieron a partir de muestras de sangre extraídas en ayuno 3 ± 2 días antes de la cirugía, al mismo tiempo se obtuvieron las variables antropométricas por bioimpedanciometría (Inbody). M: Masculino, F: Femenino, CC: Circunferencia de cintura, Col: Colesterol, TAG: Triglicéridos, GCT: Grasa Corporal Total, MM: Masa Muscular. Variables expresadas como promedio y desviación estándar.

En la tabla 2 se muestra que no se observan diferencias estadísticas en las variables descritas, entre adipocitos aislados provenientes de sujetos donde p-Akt respondió a la insulina comparado con los adipocitos que no respondieron al efecto de la insulina en el medio de cultivo.

Receptor sensor de calcio (CaSR) y disfunción del tejido adiposo: diferenciación, señalización de insulina, almacenamiento de triglicéridos, expresión de adipocinas y manejo de triglicéridos en el hígado

XI.7.- La activación del CaSR eleva la expresión de citoquinas proinflamatorias en hepatocitos HepG2

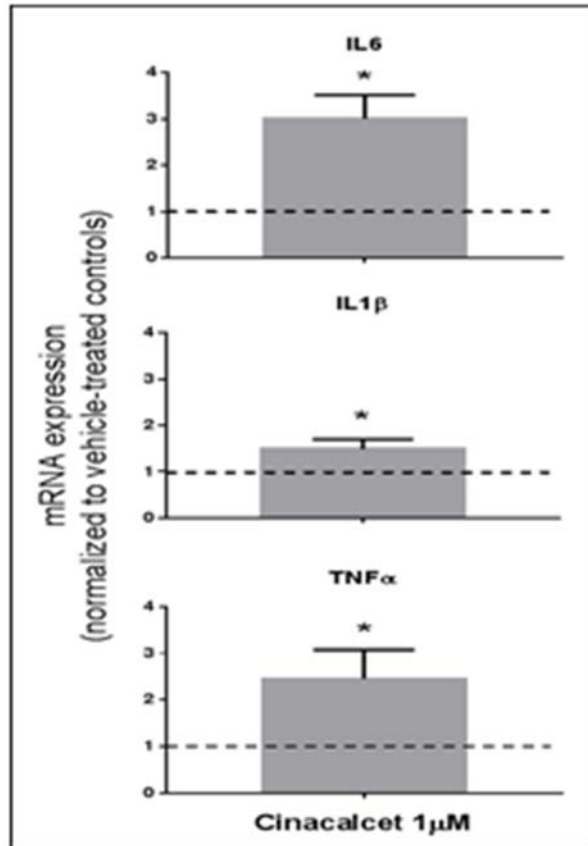


Figura 23. Efecto de cinacalcet sobre la expresión de citoquinas proinflamatorias en células HepG2. Células expuestas a cinacalcet durante 24 horas a cinacalcet (qPCR), usando GAPDH como gen de control interno. * $p < 0,05$, prueba de Wilcoxon. La línea punteada representa las células control expuestas al vehículo (representadas por el valor 1) ($n = 11$).

Las células HepG2 muestran un aumento en la expresión de citoquinas proinflamatorias (IL-6, IL-1 β , TNF- α) cuando se exponen a cinacalcet durante 24 horas (Figura 23). Este antecedente ayuda a explicar la relación entre los procesos inflamatorios y la esteatosis hepática.

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

X.8.- Presentaciones en congresos

CALCIUM SENSING RECEPTOR ACTIVATION INCREASES TRIGLYCERIDE ACCUMULATION IN HEPG2 CELLS

Villarroel P, D' Espessailles A, Arrese M, Cifuentes M

The Liver Meeting 2016, AASLD's Annual Meeting, Boston MA, USA

Presentación Poster

Background: Hepatic fat accumulation may lead to local inflammation and oxidative stress, thus contributing to steatohepatitis development and progression. Our laboratory has reported that activation of the protein calcium sensing receptor (CaSR) has proinflammatory and adipogenic effects in adipose tissue. Aim: to study the effect of CaSR stimulation on intracellular lipid accumulation in human liver cells. Methods: CaSR protein expression was determined in HepG2 cells by immunoblot. To evaluate CaSR-induced intracellular signaling in HepG2 cells, cells were stimulated with 1 μ M cinacalcet (CaSR allosteric activator) and ERK 1/2 phosphorylation was evaluated by immunoblot. A model of hepatic steatosis was established with 0.6 mM oleic acid exposure for 72 hours and cell viability was determined by MTS assay. Intracellular triglycerides were quantitated by fluorimetry. Lipogenic (SREBP1c, FAS, DGAT1, DGAT2) and pro-inflammatory (TNF- α , IL-6, IL-1 β) gene expression in HepG2 cells exposed to cinacalcet 1 μ M for 24 hours was determined by qPCR. Results: CaSR was found to be expressed in HepG2 hepatocytes. Cinacalcet increases the content of p-ERK by 36% ($p < 0.05$) in these cells. Oleic acid (0.6mM, 72 hours) did not affect cell viability ($p > 0.05$) and increased triglyceride content by 103% ($p = 0.0001$). The triglyceride content in cells exposed to cinacalcet in the presence of 0.6mM oleic acid increased by an additional 21% ($p < 0.05$). In these conditions, lipogenic gene expression was not affected, however, the expression of the proinflammatory cytokines TNF- α , IL-6 and IL-1 β increased by 245%, 300% and 50% respectively ($p < 0.05$). Conclusions: This study showed for the first time that CaSR is functionally expressed in HepG2 cells. CaSR stimulation increases triglyceride accumulation on hepatocytes under high (0.6mM) oleic acid conditions, and elevates proinflammatory cytokine expression, suggesting that activation of this receptor may contribute to liver fatty infiltration and a proinflammatory environment.

Receptor sensor de calcio (CaSR) y disfunción del tejido adiposo: diferenciación, señalización de insulina, almacenamiento de triglicéridos, expresión de adipocinas y manejo de triglicéridos en el hígado

CALCIUM SENSING RECEPTOR STIMULATION IN ADIPOSE AND HEPATIC CELLS: POSSIBLE IMPLICATIONS IN THE METABOLIC CONSEQUENCES ASSOCIATED WITH OBESITY*

Villarroel P, Mattar P, Fuentes C, Reyes M, Cifuentes M

The Obesity Society, Annual Meeting during ObesityWeek 2015, Los Angeles CA, USA
Presentación Poster

Background: We have reported that activation of the calcium sensing receptor (CaSR) may be associated with adipose tissue dysfunction. CaSR is a seven transmembrane, G-protein coupled receptor expressed in human adipose cells, and adipose or hepatic stimulation could generate signals affecting liver function. Aim: To evaluate possible effects of adipose and hepatic CaSR stimulation that may influence the metabolic consequences associated with obesity. Methods: Differentiated LS14 adipocytes were exposed to the calcimimetic cinacalcet (1 μ M, 24h). Adipokine gene expression (leptin, adiponectin y aP2) was evaluated by qPCR, and aP2 protein abundance was evaluated by immunoblot. In the human HepG2 hepatic cell line, CaSR expression was assessed by qPCR and the effect of 3-day CaSR stimulation on triglyceride accumulation was evaluated by fluorimetry. Results: CaSR activation in LS14 adipocytes decreased adiponectin expression (P=0.007) and increased aP2 protein expression (p=0.01). The presence of CaSR was verified in HepG2 human cell line, and 72h cinacalcet-treated cells in the presence of oleic acid exhibited an increased triglyceride content (p<0.05). Conclusions: Our data suggest that CaSR activation in mature adipocytes is associated with decreased adiponectin and increased aP2 expression, which may be associated with hepatic insulin resistance and gluconeogenesis, respectively. This, in addition with the observed increased intracellular hepatic triglyceride (a possible marker of hepatic steatosis) suggests that CaSR stimulation could be directly and indirectly involved in the development of the hepatic metabolic consequences associated with obesity.

*1st award poster competition TOS Basic Science Section, the obesity Society

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

CALCIUM SENSING RECEPTOR IMPAIRS ADIPOCYTE TRIGLYCERIDE STORAGE

Villarroel P, Reyes M, Fuentes C, Cifuentes M.

The 2nd International Symposium on the Calcium-sensing Receptor 2015, San Diego CA, USA

Presentación Poster

The main role of adipose tissue is to manage energy supply. Adipocytes are specialized cells that store excess energy in the form of triacylglycerols (TG) and provide fatty acids when required. Dysfunctional adipose tissue is key in the development of obesity-related cardiometabolic diseases. Human adipose cells are among the numerous cell types where the extracellular calcium sensing receptor (CaSR) is expressed, and this may confer the receptor a role in numerous obesity-related processes. We have previously shown that CaSR activation in adipose cells is associated with inflammation and visceral adipogenesis, suggesting a dysfunctional effect. An important unexplored question is whether CaSR influences the adipocyte's ability to store TG, which is crucial to understand the possible whole-body consequences of CaSR-elicited adipose tissue dysfunction. The present work aimed to evaluate the effect of CaSR stimulation on TG accumulation and the expression of lipogenic enzymes in human adipocytes. In-vitro differentiated LS14 adipocytes were exposed to 1 μ M cinacalcet for 72h and TG content was evaluated by fluorimetry (Nile Red). Cinacalcet-treated LS14 adipocytes showed a 30% lower TG content versus the untreated controls ($p < 0.005$). The expression (mRNA) of lipid handling factors was evaluated in LS14 adipocytes treated with cinacalcet 1 μ M for 24h. The calcimimetic decreased the lipogenic enzymes glycerol 3 phosphate dehydrogenase (35%) and lipoprotein lipase (22%), whereas the de novo lipogenic enzyme fatty acid synthase and the master regulator of adipocyte phenotype peroxisome proliferator-activated receptor- γ remained unchanged. Despite the elevation in adipogenesis previously reported; the present observations suggest an effect impairing lipid accumulation. The inability of adipose cells to properly handle incoming fatty acids, particularly under the cellular stress present in obesity, is expected to result in ectopic fat deposition and organ toxicity. This evidence further supports our working hypothesis of a negative impact of CaSR activation in adipose tissue, probably constituting an interesting pharmacological target in obesity-related diseases. The major finding of the present study is that the activation of CaSR decreases TG content and lipogenic enzyme expression in differentiated adipocytes.

Receptor sensor de calcio (CaSR) y disfunción del tejido adiposo: diferenciación, señalización de insulina, almacenamiento de triglicéridos, expresión de adipocinas y manejo de triglicéridos en el hígado

CALCIUM SENSING RECEPTOR ACTIVATION IN HUMAN SUBCUTANEOUS ADIPOSE DEPOTS

Villarroel P, Lee MJ, Karastergiou K, Fried SK, Cifuentes M.

The Obesity Society, Annual Meeting during ObesityWeek 2014, Boston MA, USA

Presentación Poster

Background: The calcium sensing receptor (CaSR) is a seven transmembrane, G-protein coupled receptor expressed in human adipose cells. Our laboratory has proposed that its activation may be associated with a dysfunctional phenotype in omental (Om) adipose tissue, however its presence and role in the subcutaneous (Sc) depot has not been addressed. We determined abundance of CaSR, adipokine expression, lipolytic response and insulin signaling in adipocytes from Sc depots from healthy adults. Methods: CaSR expression was evaluated by Western Blot in human Sc and Om preadipocytes. Differentiated Sc human adipocytes were exposed to the calcimimetic cinacalcet, 1 μ M. The effect of CaSR stimulation (72h exposure to the calcimimetic) on expression of leptin and adiponectin was measured by ELISA. Lipolysis was assessed by glycerol release (fluorimetry). We also evaluated the effect of 3-day CaSR stimulation on insulin sensitivity in adipocytes by measuring AKT phosphorylation. Results: The presence of CaSR was verified in Sc and Om preadipocytes (n=5), without any consistent differences between the two depots. CaSR activation in Sc differentiated adipocytes increased adiponectin (n=5) and tended to increase leptin (n=5). At 72 h cinacalcet decreases glycerol release in 17,3% (n=5), supporting the antilipolytic effect. 72h cinacalcet treated cells also exhibited lower lipolytic rates in isoproterenol stimulated condition (n=2). In addition, we note that CaSR activation decreases insulin-stimulation of AKT phosphorylation at lower concentration (600 pM insulin, n=3). Conclusions: The CaSR is present in human Sc adipocytes, and their relative abundance show no consistent difference compared with adipocytes of Om origin. Our preliminary data suggest that CaSR activation in Sc mature adipocytes is associated with increased adipokine expression, decreased lipolysis and reduction of insulin response. Future research is needed to understand the possible functional consequences involved in Sc adipose tissue.

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

INFLAMMATORY SIGNAL-ASSOCIATED CALCIUM SENSING RECEPTOR ACTIVATION IN PREADIPOSE CELLS: EFFECT ON ADIPOGENESIS

Cifuentes M, Villarreal P, Villalobos E, Tobar N, Reyes M.

2nd International Conference on ImmunoMetabolism: Molecular and Cellular Immunology of Metabolism Rodas, Grecia

Presentación en panel de trabajo

The cardiometabolic consequences of obesity largely depend on the presence of a dysfunctional adipose tissue (AT). The production of inflammatory signals by AT is key to develop numerous local and systemic alterations. Our previous work established that human primary and LS14 adipose cells express the G protein-coupled extracellular calcium sensing receptor (CaSR). Inflammatory cytokine production in adipocytes and AT explants is elevated upon CaSR activation by the calcimimetic cinacalcet. Moreover, the expression of the receptor is upregulated upon exposure to obesity-associated proinflammatory cytokines. We thus have proposed an involvement of the CaSR in inflammation-induced AT dysfunction, and here we sought to evaluate the effect of CaSR activation on adipogenesis. We induced adipose differentiation of primary visceral and LS14 human preadipocytes with or without the simultaneous activation of CaSR (cinacalcet 1 μ M). Activation of the receptor (24h) decreased by 40% the early differentiation marker CEBP β content. Consistent with this, the rapid insulin-induced phosphorylation of Akt, a key event in adipogenesis upstream of CEBP β , decreased in the presence of cinacalcet. However, upon longer-term (10d) exposure to the adipogenic stimulus, cinacalcet exerted the opposite effect, causing a dose-response increase in the expression (qPCR) of the mature adipose markers aP2, adiponectin, PPAR α , FAS and G3PDH. This suggests that the CaSR effect on adipogenesis may depend on the differentiation stage at which the cells are exposed to the calcimimetic. CaSR activation may interfere with the initial stages of adipocyte differentiation; however these events do not seem to preclude adipogenesis from continuing. Given the numerous factors that control adipogenesis, the CaSR inhibitory effect on early markers may be overridden to have a net positive longer-term effect. Even though adipogenesis is associated with insulin sensitivity and adequate adipose function, its enhancement, particularly in visceral adipocytes, may have pathogenic implications, especially in the context of inflamed AT and overnutrition.

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

EFFECTO DE LA ACTIVACIÓN DEL RECEPTOR SENSOR DE CALCIO SOBRE LA ADIPOGÉNESIS EN ADIPOCITOS HUMANOS

Villarroel P, Reyes M, Fuentes C, Tobar N, Cifuentes M.

Congreso Sociedad Chilena de Endocrinología y Diabetes SOCHED 2013, Viña del Mar, Chile

Presentación Oral

Introducción: El receptor sensor de calcio (CaSR) es una proteína de membrana que responde a múltiples agonistas y mecanismos de señalización intracelular asociados. Nuestro laboratorio describió su presencia en células adiposas humanas y ha propuesto que su activación se asocia con disfuncionalidad del tejido adiposo. La activación del CaSR en células adiposas se relaciona con una elevación de señales proinflamatorias, lo que podría llevar a alteraciones en el proceso de adipogénesis. Objetivo: Evaluar el efecto de la activación del CaSR sobre la expresión de marcadores adipogénicos en adipocitos humanos. Material y métodos: Preadipocitos humanos de la línea celular LS14, diferenciados in vitro, fueron expuestos a 5 μM de cinacalcet, un activador alostérico del CaSR. Se evaluó la expresión del marcador temprano de diferenciación CEBP β y la sensibilidad a insulina a través de la fosforilación de la proteína quinasa Akt mediante Western Blot. Además, se determinó la expresión del RNAm para PPAR γ , aP2, FAS, GPD y LPL durante 10d de exposición a 1 μM de cinacalcet en preadipocitos LS14 y primarios derivados de tejido adiposo visceral. Adicionalmente, se evaluó el efecto de pulsos de cinacalcet por las primeras 6h, 24h, 48h, 6d y 10d. Resultados: La activación del CaSR a corto plazo mostró una disminución de 40% en la expresión de CEBP β ($P < 0,005$) y una disminución de 35% en la fosforilación de Akt mediado por insulina ($P < 0,005$). Sin embargo, durante la diferenciación a largo plazo (10d), cinacalcet causó un incremento dosis-respuesta en la expresión de PPAR γ , aP2, FAS y GPD ($P < 0,005$). Los adipocitos primarios diferenciados y expuestos a cinacalcet por 10d mostraron una mayor expresión de aP2, GPD y LPL ($P < 0,0001$). Adicionalmente, la exposición a cinacalcet durante las primeras 24h mostró un aumento en los marcadores de diferenciación tardíos a los 10d de diferenciación. Conclusiones: Nuestras observaciones sugieren que cinacalcet favorece adipogénesis evaluada en el largo plazo (10d), independientemente del período de exposición. La activación del CaSR podría interferir con las etapas iniciales de la diferenciación de los preadipocitos, sin embargo, estos eventos no impedirían el curso de la adipogénesis. A pesar de que la adipogénesis, está asociada con una adecuada función adiposa, las implicancias de nuestros hallazgos en los adipocitos viscerales aún no se han establecido.

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

EFFECTO DE LA ACTIVACIÓN DEL RECEPTOR SENSOR DE CALCIO SOBRE LA EXPRESIÓN DE FACTORES LIPOGÉNICOS Y DE SECRECIÓN EN ADIPOCITOS HUMANOS LS14

Arreguín A, Villarroel P, Reyes M, Fuentes C, Cifuentes M.

Congreso Sociedad Chilena de Endocrinología y Diabetes SOCHED 2012, Valdivia, Chile

Presentación Oral

Introducción: El receptor sensor de calcio extracelular (CaSR), fue descubierto hace casi 20 años en tejidos relacionados con la homeostasis del calcio. Nuestro laboratorio describió su presencia en células adiposas humanas y ha establecido que su activación se asocia con alteraciones que conllevarían a su disfuncionalidad. El aumento de la inflamación que hemos observado ante la activación del CaSR, puede llevar a alteraciones en la expresión de numerosos genes relacionados con el adecuado funcionamiento del adipocito. Objetivos: Evaluar el efecto de la activación del CaSR sobre la expresión de factores lipogénicos y de secreción en adipocitos humanos LS14. Material y métodos: Adipocitos humanos de la línea celular LS14, diferenciados in vitro, fueron expuestos por 16, 48 y 72 horas al activador alostérico del CaSR cinacalcet (5 μ M). Se evaluó la expresión (mRNA) del receptor activado por proliferadores de peroxisomas (PPAR)- γ , sintasa de ácidos grasos (FAS), lipasa de lipoproteínas (LPL), glicerol 3 fosfato deshidrogenasa (G3PDH), leptina y adiponectina mediante PCR en tiempo real. Se determinó el contenido de triglicéridos por fluorimetría. Resultados: En cuanto a los factores lipogénicos, la activación del CaSR en adipocitos mostró una disminución de 30% en la expresión de mRNA de PPAR- γ a las 72 horas ($p < 0,05$), de 49% en la expresión de LPL a las 48 horas ($p < 0,01$) y de 32% en la expresión de G3PDH a las 16 horas ($p = 0,01$). No hubo efecto del CaSR sobre la expresión de FAS. Se observó un contenido de triglicéridos 38% menor en las células diferenciadas tratadas con cinacalcet en comparación con las células expuestas al vehículo ($p < 0,05$). Con respecto a parámetros de función endocrina, se observó una disminución de 62% y 38% en la expresión de leptina a las 16 y 72 horas, respectivamente ($P < 0,05$). No se observó un efecto del CaSR sobre la expresión de adiponectina. Conclusiones: La activación del CaSR reduce el contenido de TG en adipocitos LS14 diferenciados in vitro, efecto que estaría asociado a la regulación a la baja de PPAR- γ , LPL y G3PDH. Asimismo, la estimulación del CaSR disminuiría la producción de leptina. Se sugiere la participación de la proteína CaSR desregulando lipogénesis y actividad endocrina del adipocito, lo que puede contribuir a generar un estado disfuncional en el tejido adiposo.



Calcium sensing receptor effects in adipocytes and liver cells: Implications for an adipose–hepatic crosstalk



Pia Villarroel^a, Pamela Mattar^a, Amanda D'Espessailles^a, Marco Arrese^b,
Andrea Arreguin^a, Cecilia Fuentes^a, Marcela Reyes^a, Mariana Cifuentes^{a,*}

^a Institute of Nutrition and Food Technology (INTA), Universidad de Chile, Santiago, Chile

^b Gastroenterology Department, School of Medicine, Pontificia Universidad Católica de Chile, Santiago, Chile

ARTICLE INFO

Article history:

Received 25 April 2016

Received in revised form

19 August 2016

Accepted 22 August 2016

Available online 24 August 2016

Keywords:

Calcium sensing receptor

Lipogenesis

Adipocyte

Hepatocyte

aP2

ABSTRACT

The calcium sensing receptor (CaSR) is expressed in human adipose cells, and its activation may associate with adipose tissue (AT) dysfunction. We evaluated whether CaSR stimulation influences adipocyte triglyceride (TG) and fatty acid binding protein 4 (aP2) content, and hepatocyte TGs and proinflammatory cytokine expression. The effect of the calcimimetic cinacalcet on TGs (fluorimetry), lipogenic genes (qPCR) and aP2 (immunoblot) was evaluated in LS14 adipocytes or AT. In the human HepG2 hepatic cell line, we assessed CaSR expression and cinacalcet effect on TGs and lipogenic and proinflammatory genes. CaSR activation decreased adipocyte TG content by 20% and the expression of GPD and LPL by 34% and 20%, respectively. Cinacalcet increased aP2 protein expression by 60%. CaSR expression was shown in HepG2 cells and human liver samples. Cinacalcet-treated HepG2 cells in the presence of oleic acid exhibited a 19% increased TG content. No changes were observed in the expression of lipogenic genes in HepG2 cells, however there was a 50%–300% elevation in the expression of proinflammatory cytokines. CaSR activation in adipocytes may associate with decreased TG storage ability and increased aP2. Hepatic CaSR stimulation may elevate steatosis and proinflammatory factors. We propose that CaSR may contribute to obesity-associated hepatic metabolic consequences.

© 2016 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

The main role of adipose tissue (AT) is based on its ability to safely store excess energy as triglycerides (TG). The synthesis of TGs needs the coordinated regulation of glucose availability, appropriate insulin sensitivity and fatty acids, as well as the action of transcription factors and enzymes that coordinate the final assembly of fatty acyl CoAs onto the glycerol backbone. From a whole-body perspective, the inability of adipose cells to properly handle incoming fatty acids is expected to make excess lipids available to all other tissues in the circulation, resulting in ectopic fat deposition and toxicity in metabolically relevant organs, such as the liver [1].

The CaSR is a seven transmembrane domain protein expressed in numerous tissues and organs, including human adipose cells [2]. We have previously shown that CaSR activation is associated with elevated expression of inflammatory factors in adipocytes and

preadipocytes [3,4]. We also showed that CaSR stimulation elevates visceral preadipocyte adipogenic differentiation [5], however the ability of differentiated adipose (or other) cells to handle TGs or fatty acids upon CaSR activation has not been studied.

From the observations discussed above, our laboratory has proposed a role for CaSR activation on AT dysfunction. With excess proinflammatory signaling in AT, impaired TG storage is expected [6], thus increasing the availability of circulating free fatty acids to organs that are ill-suited for their disposal [7]. As a relevant potential pathophysiological process, hepatic steatosis is a key factor associated with obesity-related metabolic impairment [8].

The fatty acid binding protein 4 (FABP4/aP2) is an intracellular protein responsible for binding and transporting free fatty acids inside the cell. Recently, its presence was described in human plasma, and the evidence suggests that circulating aP2 levels may be linked with obesity-associated comorbidities [9,10] as well as hepatic inflammation and fibrosis [11]. In addition, AT dysfunction and inflammation in obesity increase levels of aP2 in the tissue and plasma [9,12].

In the present study, we aimed to evaluate *in vitro* the effect of

* Corresponding author. INTA, Universidad de Chile, El Libano 5524, Macul, Santiago, Chile.

E-mail address: mcifuentes@inta.uchile.cl (M. Cifuentes).

CaSR activation on TG accumulation in cell models of human adipocytes and hepatocytes, namely LS14 and HepG2. We also assessed whether activation of the CaSR increases adipose aP2 content and promotes inflammation in hepatic cells, suggesting novel mechanisms by which this receptor may have local and peripheral dysfunctional effects.

2. Methods

2.1. LS14 cell line culture and differentiation

Our studies used the preadipose cell line LS14, derived from a human metastatic liposarcoma, able to differentiate into lipid-laden adipocytes that express mature adipocyte genes [13]. Preadipose LS14 cells were seeded on plastic culture dishes (Nunc, Rochester, NY) and grown in DMEM/Ham's F-12 (1:1) medium (Sigma, St Louis, MO) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and antibiotics (penicillin-streptomycin) at 37 °C in a controlled atmosphere incubator (5% CO₂). For adipogenic differentiation, cells were seeded at a density of 35,000 cells/cm², serum-starved overnight and cultured in the same medium (serum-free), supplemented with the adipogenic cocktail consisting of 0.5 mM 3-isobutyl-1-methylxanthine (Sigma), 1.7 μM insulin (Eli Lilly & Co., Indianapolis, IN) and 0.25 μM dexamethasone (Sigma). The medium was replaced every 2–3 days.

2.2. HepG2 cell line culture

The HepG2 cell line (American Type Culture Collection, Manassas, VA) derived from a human liver hepatocellular carcinoma was used for these experiments. They are considered an adequate model for human hepatocytes since they show morphological (epithelial-like) and functional differentiation in culture, secreting a variety of plasmatic proteins [14]. The cells were maintained in Minimum Essential Medium (Sigma) supplemented with 10% FBS and antibiotics (penicillin-streptomycin) at 37 °C in a controlled atmosphere incubator (5% CO₂).

2.3. Cell viability

Cell viability was assessed in subconfluent HepG2 cells by the CellTiter 96[®] Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (MTS) (Promega, WI, USA), according to the manufacturer's instructions in an ELx808 microplate reader (BioTek Instruments, Inc. VT, USA). In brief, HepG2 cells were seeded at 6000 cells/cm² in 96-well plates and exposed to the experimental conditions for 72 h with daily medium change. At the end of the incubation period, 20 μl of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium (MTS) compound solution was added to the media (100 μl per well), and absorbance was recorded after 3 h at 490 nm (and 630 nm to subtract background absorbance). Cell viability is expressed in arbitrary units as the absorbance at 490 nm minus 630 nm.

2.4. Human hepatic tissue

Complementary DNA was obtained from human liver samples taken at the time of bariatric surgery or cholecystectomy as described in a previous study [15]. Patients were separated in two groups depending of the presence or absence of obesity as defined by a body mass index greater than 30 kg/m². These samples were evaluated for the presence of CaSR transcripts by qPCR (see below).

2.5. Triglyceride content

To assess TG content, cells were treated with 0.25% trypsin solution at 37 °C for 2 min or until the cells were detached from the culture dish. The trypsin was then inactivated with culture medium containing FBS to a final concentration of 10%. Cells were sedimented by centrifugation at 800g for 20 min and then incubated at room temperature for 5–10 min in 1 μg/mL Nile Red (Sigma) solution in PBS. Fluorescence was evaluated using 485 nm excitation and 572 nm emission filters (Synergy 2 fluorimeter, BioTek Instruments). Results are normalized by the protein content measured using the bicinchoninic acid method (Pierce, Rockford IL). In order to rule out that normalization was confounding the results, we also evaluated normalization for number of cells, and the results were unchanged (data not shown).

2.6. Isolation of total RNA, reverse transcription and qPCR analysis

Cultured cells were lysed with Trizol[®] reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA) and RNA was extracted using the PureLink[™] RNA Mini Kit (Invitrogen) according to the manufacturer's indications. Reverse transcription was performed (25 °C for 10 min followed by 2 h at 37 °C and 5 min at 85 °C) using the high Capacity cDNA Reverse Transcription kit (MultiScribe[™] MuLV reverse transcriptase, 50 U/μL, Applied Biosystems, Carlsbad, CA). mRNA expression was evaluated using the Step-one Real-time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) using the SYBR[®] FAST qPCR Kit (Applied Biosystems). The thermal cycling conditions consisted of a 20 s preincubation at 95 °C followed by 40 cycles at 95 °C for 3 s and 60 °C for 30 s. The results are normalized by the reference gene GAPDH (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) and the expression was calculated using the Pfaffl model [16] determining the quantification cycle (Cq) within the log phase of the amplification curve. Every reaction includes a set of no-template controls (one for each primer pair), that show very high Cqs (above 35) or undetected amplification. The reference gene GAPDH was chosen since it consistently shows a stable expression under our experimental conditions. In preliminary studies, the alternative reference gene beta-actin showed a similar pattern, however due to a larger variability, GAPDH was selected as the sole reference gene. As an internal quality control for each experiment, cDNA is discarded or RNA re-extracted in experiments where GAPDH expression is too low or differs by more than 1 Cq across conditions. To verify the presence of CaSR transcripts in hepatic cells, PCR products were resolved by electrophoresis in a 1.5% agarose gel in 0.04 M Tris acetate and 0.001 M EDTA buffer and stained with ethidium bromide. Sequences for PCR primers are depicted on Table 1. All primers are intron-spanning, to prevent or identify amplification of genomic DNA.

2.7. Human omental adipose tissue

Human omental fat was obtained from 8 subjects (75% female) undergoing elective abdominal surgery, with a body mass index of 34.6 ± 5.5 kg/m² (mean ± SD) and aged 37.9 ± 11.8 years. Informed consent was signed by the donors, and the protocol was approved by the Institutional Review Board at INTA, University of Chile and the Health Service of Santiago. The tissue was washed with Hanks Balanced Salt Solution, cleaned and minced into small pieces (2–3 mm²) and cultured in DMEM/Ham's F-12 (1:1) medium (Sigma) supplemented with antibiotics (penicillin–streptomycin) at 37 °C in a controlled atmosphere incubator.

Table 1

Forward and reverse primer sequences for qPCR.

Target mRNA	Accession	Forward Primer (5' → 3')	Reverse primer (5' → 3')	Amplicon Length (bp)
CaSR	NM_001178065	GATGAGACAGATGCCAGTGC	AAAGAGGGTGAGTGCATCC	135
PPAR γ	NM_015869.4	AGCAAAGCGAGGGCGATCTTG	GGATGGCCACCTCTTGTCTGTC	149
LPL	NM_000237.2	TGGTGATCCATGGCTGGACGGT	AGCCCGCGGACACTGGGTAA	150
FAS	NM_004104.4	GGAAGCTGCCAGAGTCGGAGAAT	TGAGGGTCCATCGTGTGTGCT	202
GPD	NM_005276.2	GGCTGAGGCCCTTTCGCGTA	ACTGGCTGGCCCTCGTAGCA	186
SREBP1c	NM_001005291.2	ACACAGCAACCAGAACTCAAG	AGTGTCTCTCCACCTCAGTCT	153
aP2	NM_001442.2	TGCAGTTCCTTCTCACCTTGA	TCCTGGCCAGTATGAAGGAAATC	256
IL6	NM_000600	CAATCTGGATCAATGAGGAGAC	CTCTGGCTTGTCTCACTACTC	118
IL1 β	NM_000576	GGACAAGCTGAGGAAGATGC	TCGTTATCCCATGTGTGCGAA	120
TNF α	NM_000594.2	CCAGGCAGTCAGATCATCTTCTC	AGCTGGTTATCTCTCAGCTCCAC	150
GAPDH ^a	NM_002046	GAAGGTGAAGTCCGGAGTCAAC	CAGAGTTAAAAGCAGCCCTGGT	71

^a Reference control gene.

2.8. Western blot

After treatment, AT and HepG2 cells were homogenized at 4 °C in lysis buffer (50 mM HEPES, pH 7.4, 150 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, 2 mM EGTA, 1% Triton X-100, 10% glycerol) supplemented with 1 mM sodium orthovanadate (Sigma), 1.5 μ M pepstatin A (Sigma) and Complete[®] protease inhibitor cocktail (Roche, Mannheim, Germany). Protein concentration of the lysate was determined by a method based on bicinchoninic acid (Pierce). Fifty μ g of protein were heat denatured in SDS-PAGE loading buffer (240 mM Tris-HCl, pH 6.8, 8% SDS, and 40% glycerol, 20% 2-mercaptoethanol). Proteins were electrophoresed on 7.5%, 10% and 15% polyacrylamide gels (CaSR, P-Erk and aP2, respectively) and electrotransferred to polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes using a buffer that contains 24 mM Tris, 194 mM glycine and 20% methanol. The immunoreaction was achieved by incubation of the membranes, previously blocked with a 3% skim milk solution in Tris-buffered saline (TBS) with 0.05% Tween 20 (Sigma), with an CaSR (6D4) antibody (Santa Cruz Biotechnology, Inc), Hsp90 antibody (Santa Cruz Biotechnology, Inc), p-ERK (E:4) and ERK 2 (K:23) antibodies (Santa Cruz Biotechnology, Inc), anti-human aP2 antibody (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI) and anti-human β -Actin antibody (AC:15) (Santa Cruz, Inc). Detection of immune complexes was performed by incubation with peroxidase conjugated secondary antibodies,

followed by incubation with the substrates of the enzyme. The images were digitized and density of the bands was quantified using Image J (National Institutes of Health, USA).

2.9. Statistical analysis

To compare parameters between controls and treated cells, variables were evaluated using Wilcoxon signed rank test and Friedman Test with Dunn's multiple comparisons when appropriate. Data are shown in the figures as means \pm SEM, and a p-value less than 0.05 was considered significant.

3. Results

3.1. CaSR stimulation decreases adipocyte TG content

The effectiveness of adipose differentiation was verified by an increase in TG content as well as changes in cell morphology (Fig. 1A), in addition to the increase in expression of mature adipose cell markers as compared with non-differentiated control cells (not shown), as previously described [5]. The effect of 72 h exposure to cinacalcet was evaluated in LS14 adipocytes that were differentiated for 7 days (exposure: days 7–10). As shown in Fig. 1B, treatment with the calcimimetic decreased TG content by 20%.

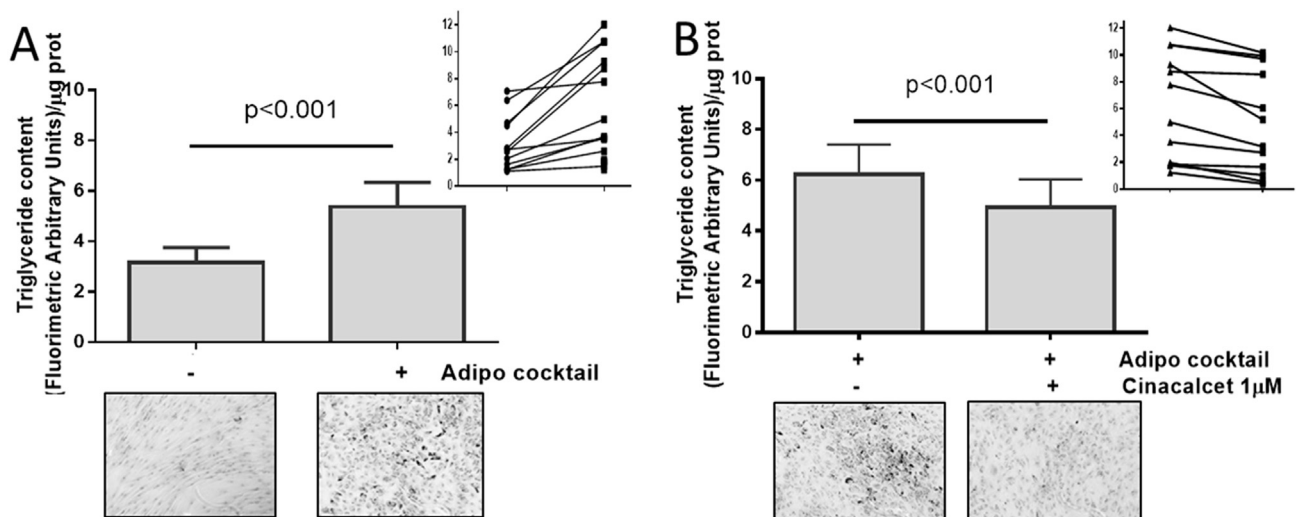


Fig. 1. Triacylglycerol content in LS14 adipocytes. **A.** Validation of LS14 differentiation evaluated by TG content and cell morphology. LS14 cells after 10 days of exposure to the adipogenic cocktail compared to vehicle-treated non-differentiated control cells. Bars represent mean \pm SEM for $n = 12$ independent experiments. **B.** Effect of 1 μ M cinacalcet for 72 h in seven-day differentiated adipocytes (days 7–10). Data are expressed as mean \pm SEM, $n = 12$ experiments. TG content was evaluated by fluorimetry using Nile Red. P values: Wilcoxon matched-pairs signed rank test. The respective insets show the plot for each individual experiment. Below each bar are shown representative photographs of oil Red O staining after 10 days of differentiation, 10 \times magnification.

3.2. Cinacalcet downregulates adipocyte expression of lipogenic genes

The expression (mRNA) of lipid handling factors was evaluated in LS14 cells treated with cinacalcet 1 μ M for 24 h. Treatment with the calcimimetic decreased the expression of the lipogenic enzymes glycerol 3 phosphate dehydrogenase (GPD) and lipoprotein lipase (LPL) by 34% and 20%, respectively, without affecting the *de novo* lipogenic enzyme fatty acid synthase (FASN) or the master regulator of adipocyte metabolism PPAR γ (Fig. 2).

3.3. Cinacalcet increases aP2 content in human adipose tissue

Based on the proposed link between CaSR activation and obesity-associated AT dysfunction, together with recent evidence involving aP2 in obesity-associated pathogenesis [17], we evaluated the effect of CaSR activation on aP2 mRNA expression and protein content in human LS14 adipocytes and AT. As shown in Fig. 3A, aP2 mRNA expression was elevated upon CaSR stimulation with cinacalcet in LS14 adipocytes. To support this finding, we initially performed a dose-response experiment in a single human omental AT explant, and observed the expected dose-dependent increase (Fig. 3B) in aP2 protein content. Subsequently, exposure of AT

explants from other seven donors to 2 μ M cinacalcet showed that CaSR stimulation elevated aP2 by 60% (Fig. 3C).

3.4. Effect of CaSR stimulation in HepG2 hepatocytes

In the context of our model of CaSR-induced AT dysfunction, we next evaluated the possible impact on hepatocytes, which are also relevant in obesity-related disorders. Given the role of liver steatosis determining metabolic and cardiovascular disorders associated with obesity [18], we chose the oleic acid-loaded HepG2 cell model [19,20] to test the effects of CaSR stimulation in the context of an elevated free-fatty acid environment. We first verified that the receptor is expressed in HepG2 cells, and Fig. 4A shows the presence of CaSR transcripts that are the same size as those amplified in the positive control from parathyroid tissue. In addition, to ascertain the potential relevance of our findings, we evaluated the expression in samples of human hepatic tissue and found that the receptor is expressed in human liver (Fig. 4A, lower panel). As shown in the figure, these preliminary observations suggest that livers from obese patients may express higher levels of CaSR. To our knowledge, this is the first report documenting the presence of the CaSR in human hepatic cells. To support these findings, the expression of CaSR protein was verified in HepG2 cells by Western blot (Fig. 4B) confirming the presence of a band of the same size as that present in lysates from Caco-2 cells, used as positive control. Receptor activation was confirmed by the elevation of ERK phosphorylation upon exposure to the agonists cinacalcet and spermine (Fig. 4C), as previously shown in LS14 preadipocytes [4].

3.5. CaSR stimulation increases TG content in oleate-exposed HepG2 cells

In order to evaluate lipid handling in HepG2 cells under an elevated free fatty acid environment, we exposed the cells to 0.6 mM oleic acid. This condition was chosen given that oleic acid is more steatogenic but less apoptotic than palmitic acid in hepatocytes [19,21]. After establishing in viability assays that this concentration does not affect cell survival (Fig. 5A), we evaluated the effect on TG accumulation. We observed that the TG content increased by 93% when 0.6 mM oleic acid was added to the culture medium (Fig. 5B). Treatment of oleic acid-exposed HepG2 cells with the calcimimetic cinacalcet elevated TG content by 19% (Fig. 6).

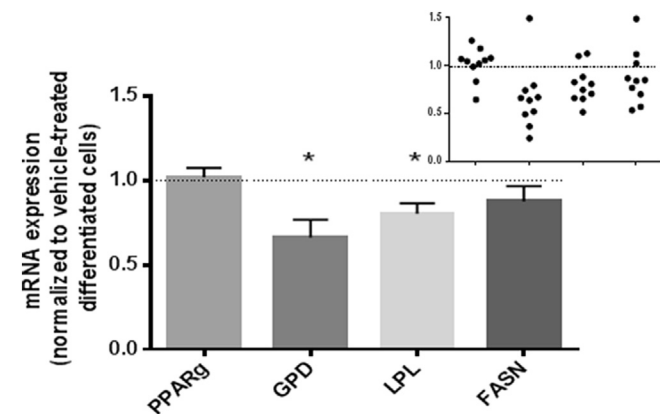


Fig. 2. mRNA expression of factors associated with lipid handling in cinacalcet-treated cells. Seven-day differentiated LS14 adipocytes were treated with cinacalcet 1 μ M for 24 h. Bars represent mean \pm SEM for each gene versus its own vehicle-treated control, normalized to 1 and represented by the dotted line. * $P < 0.05$ vs 1, Wilcoxon Signed Rank Test, $n = 10$ independent experiments. The inset shows the corresponding raw data.

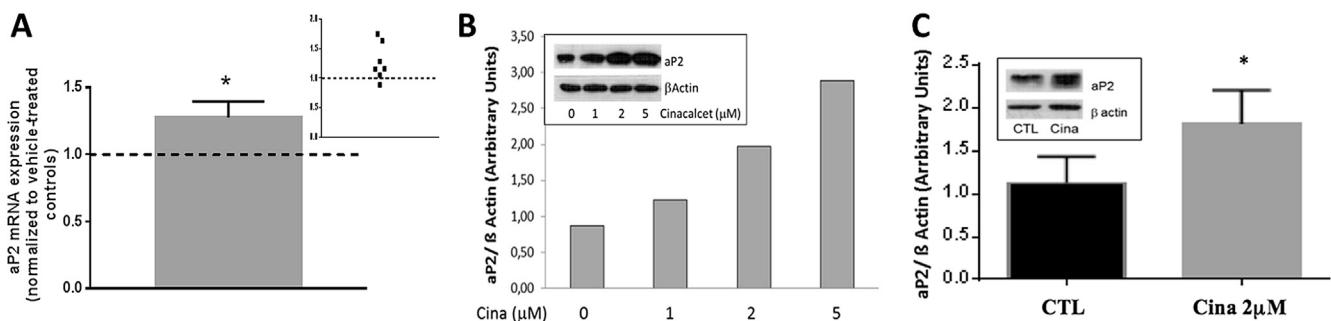


Fig. 3. CaSR activation elevates aP2 content in human adipose cells. **A)** aP2 mRNA expression in LS14 adipocytes exposed for 16 h to 2 μ M cinacalcet. The expression of aP2 was evaluated by qPCR, using each sample's GAPDH expression as the reference gene, and then reported as fold of vehicle-treated cells (value of 1, represented by the dotted line). The bar represents mean \pm SEM for $n = 7$ independent experiments and the inset depicts the individual values. $P < 0.05$ for the difference from 1, Wilcoxon Signed Rank Test. **B)** Increasing doses of cinacalcet (Cina) were evaluated for aP2 protein by Western blot in lysates from one human AT explant. **C)** Human AT explants were treated with vehicle (CTL) or 2 μ M Cina for 24 h. The aP2 content was evaluated by Western blot in AT lysates. The bars in C are mean \pm SEM (samples from $n = 7$ independent donors), where * $p < 0.05$. Wilcoxon matched-pairs signed rank test. The insets show representative blots for the respective experiments.

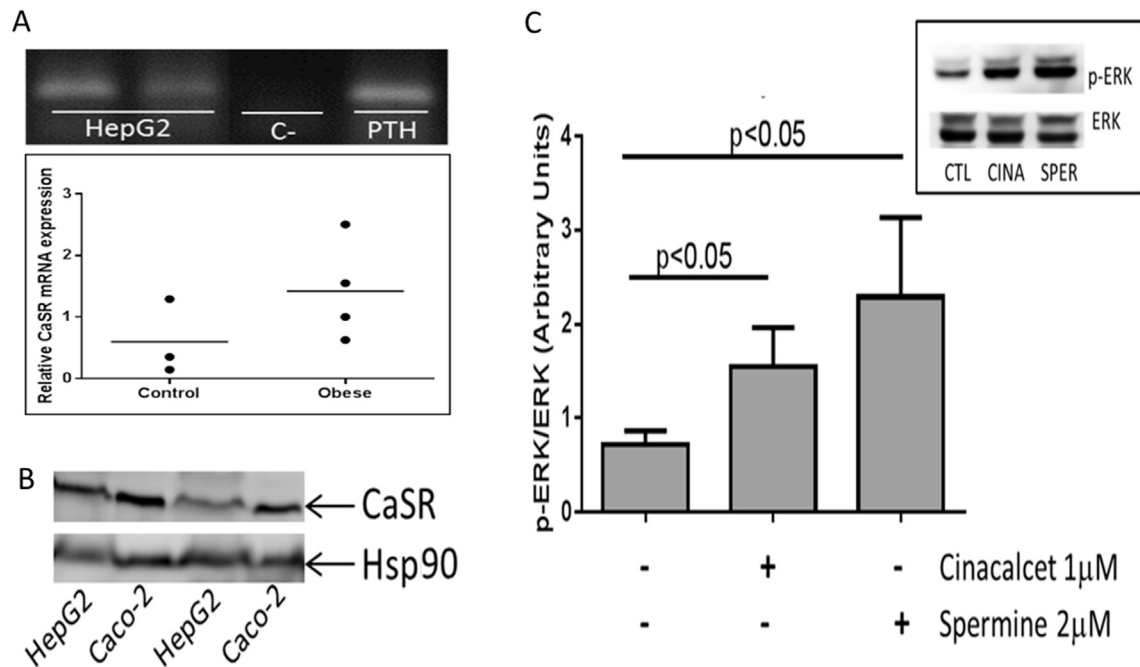


Fig. 4. CaSR expression in human hepatic cells. **A.** Photograph of the mRNA abundance (PCR products) of CaSR in HepG2 cells, negative control (no cDNA added, C-) and positive control (human parathyroid cDNA, PTH). Below are shown preliminary results of human adult hepatic samples expressed based on nutritional status (obese versus non obese). **B.** Western blot using a human CaSR antibody showing the corresponding bands in HepG2 and the positive control Caco-2 cells using Hsp90 as loading control. **C.** One-hour exposure to cinacalcet 1 μ M or spermine 2 μ M elevates phosphoERK/total ERK content in HepG2 cells. The graph shows the data of $n = 8$ experiments, with bars representing media \pm SEM. P values: Friedman test. The inset shows a representative Western blot.

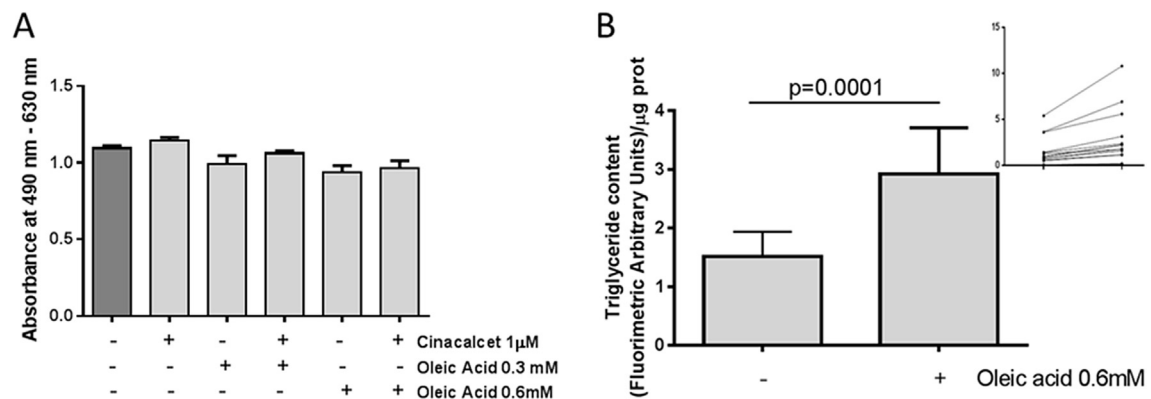


Fig. 5. Effects of oleic acid exposure in HepG2 cells. **A.** Cell viability (MTS assay) after 72 h exposure to cinacalcet (Cina) 1 μ M, oleic acid 0.3 mM and 0.6 mM, and their combinations. Bars represent means \pm SEM of the absorbance at 490 nm (minus 630 nm background subtraction) performed in triplicate ($n = 1$ experiment), and no treatment differed more than 15% versus vehicle-treated control (darker bar). **B.** Effect of 72 h exposure to 0.6 mM oleic acid added to the culture medium on TG content in HepG2 cells. Depicted p value is Wilcoxon matched-pairs signed rank test. Bars represent means \pm SEM $n = 14$ independent experiments. The inset shows the same data presented as a dot plot with lines depicting each individual experiment.

3.6. Cinacalcet has no effect on the expression of lipogenic genes in oleic acid-exposed HepG2 cells

Given that we observed that CaSR stimulation elevated TG content after 72 h in HepG2 cells exposed to 0.6 mM oleic acid, we evaluated the possible changes in the expression of relevant lipogenic genes in hepatocytes (PPAR γ , SREBP1c and FAS). Taking into consideration that gene expression would take place earlier than our observations, and to be consistent with the above experiments in adipocytes, we evaluated the effect at 24 h of cinacalcet exposure. Cinacalcet had no effect on the expression of these genes in HepG2 cells exposed to oleic acid (data not shown).

3.7. Cinacalcet elevates the expression of proinflammatory cytokines in HepG2 cells

After observing no changes in lipogenic enzyme expression despite the elevation in HepG2 TG content, and based on the possible effect of inflammation-induced elevation in CD36 fatty acid transporter activity [22], we assessed whether cinacalcet had an effect of HepG2 expression of the proinflammatory factors IL6, IL1 β and TNF α . As shown in Fig. 7, cinacalcet elevated the mRNA content for the three cytokines by approximately 300%, 50% and 245%, respectively.

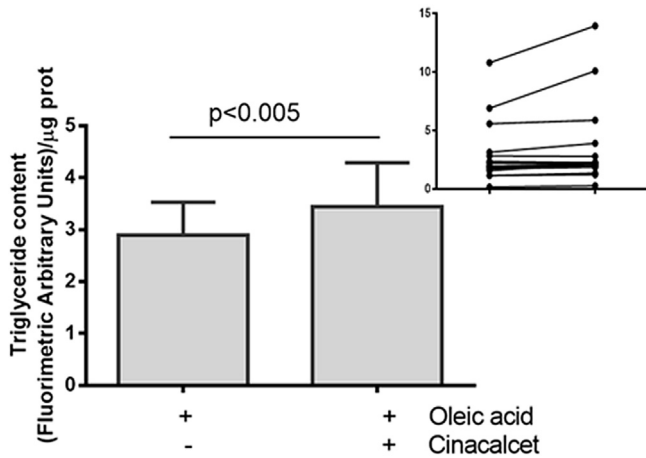


Fig. 6. Effect of CaSR activation on HepG2 cells exposed to 0.6 mM oleic acid. 1 μ M cinacalcet was added for 72 h before evaluating TG content fluorimetrically (Nile Red). Bars represent mean \pm SEM $n = 17$ independent experiments. Depicted p value corresponds to Wilcoxon matched-pairs signed rank test. The inset shows the same data presented as a dot plot to illustrate differences in each individual experiment.

4. Discussion

With the aim of exploring the occurrence of a CaSR-induced AT dysfunction, and considering a possible impact of this phenomenon on metabolically relevant tissues that are particularly affected in obesity, we studied whether CaSR affects TG accumulation in adipocytes and hepatocytes. Our data show that activation of CaSR decreases TG content in differentiated LS14 adipocytes, and in the context of an elevated oleic acid environment, increases TGs in HepG2 cells. This scenario, together with CaSR-induced elevated aP2 in AT, suggest that CaSR stimulation may not only generate AT dysfunction, as we have previously proposed [4,23], but may also directly and indirectly affect peripheral organs such as the liver. This would occur via altered TG handling in AT, possibly elevating free fatty acid availability, and higher circulating levels of aP2. The latter has been shown to increase gluconeogenesis in liver and proposed to contribute to obesity-related conditions such as insulin resistance, diabetes mellitus, atherosclerosis, hypertension, and cardiac dysfunction [6,9,17].

Gene expression analysis showed that cinacalcet treatment in differentiated adipocytes decreases the lipogenic enzymes GPD and LPL. LPL hydrolyzes circulating chylomicrons and very low density lipoproteins to make fatty acids available to enter the adipocyte [24]. GPD on the other hand, provides the glycerol backbone necessary for fatty acid esterification into the TG. The decrease in the expression of these factors would thus be consistent with a concerted decrease in overall entry and storage of fatty acids in the adipocyte. Supporting a suppression of lipogenic pathways in conditions of dysfunctional fat, one study in omental AT explants from adult females, showed lower expression of GPD and LPL in women with obesity and impaired insulin sensitivity as compared with those with normal weight [25]. Another study showed lower expression of lipogenic enzymes in AT in obese versus lean humans, and this was concomitant with greater hepatic lipogenesis [8], also consistent with our observations. In our study, FASN and PPAR γ remained unchanged, indicating that the effect of cinacalcet is specific to certain transcripts, and not an overall shutdown of lipid metabolism gene expression. It is well known that PPAR γ acts as a transcription factor of a number of genes expressed in mature adipocytes and is considered the master regulator of adipose differentiation and metabolism [26]. However, our results showed lower LPL and GPD gene expression after cinacalcet exposure with no

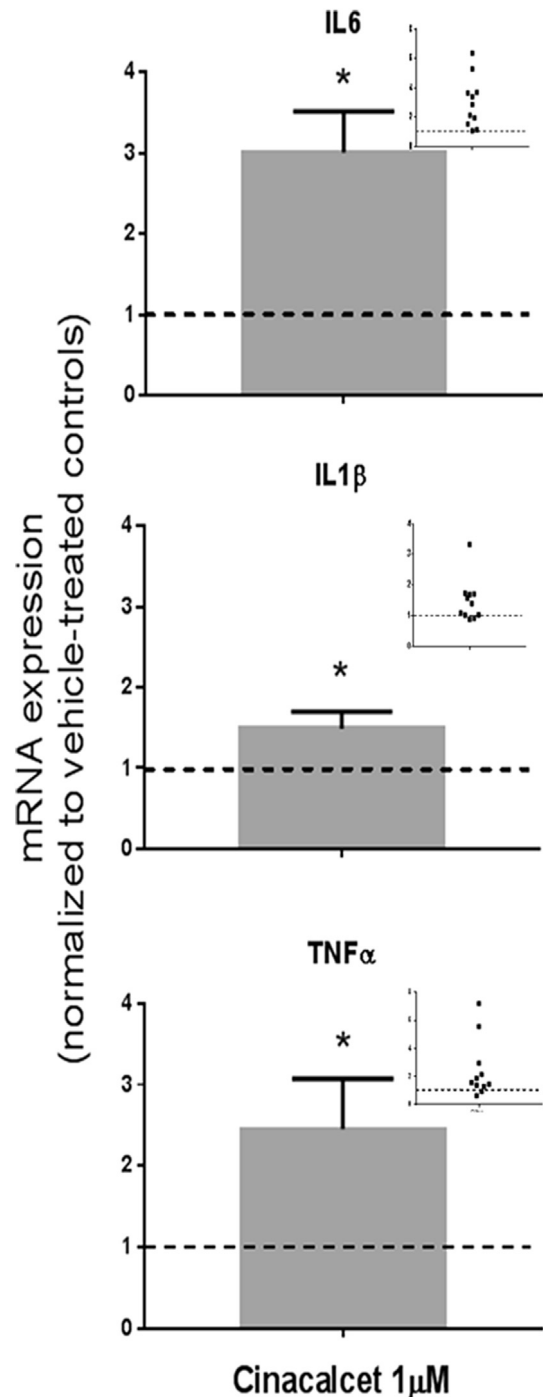


Fig. 7. CaSR activation elevates the expression of proinflammatory cytokines in HepG2 cells. Twenty-four hour exposure to cinacalcet elevated mRNA expression of IL6, IL1 β and TNF α in HepG2 cells, evaluated by qPCR, using each sample's GAPDH expression as the reference gene. The bars represent the fold of vehicle-treated cells (mean \pm SEM) and each inset shows the same data presented as a dot plot to illustrate differences in each individual experiment. * $p < 0.05$, Wilcoxon signed rank test evaluating the difference from vehicle-treated cells (normalized to 1 and represented by the dotted line); $n = 11$ independent experiments.

concomitant change in the expression of PPAR γ . It is important to consider that PPAR γ activity is regulated by post-translational modifications such as phosphorylation [26], so the absence of changes in mRNA expression does not rule out a role of the transcription factor in these events.

The expression of CaSR has been described in a large number of cells and tissues. However, to the best of our knowledge, no reports have been published in human hepatic cells and only one in rats, where the CaSR agonist $GdCl_3$ generates an increase in cytosolic calcium and bile flux [27]. In addition, CaSR expression was reported in the BRL cell line derived from buffalo rat liver cells, where its activation elevated intracellular calcium through the Gq-PLC-IP3 pathway [28]. The present study shows the presence of the CaSR in the human HepG2 cell line, its response (ERK phosphorylation) to two different well-known CaSR activators (the CaSR-specific calcimimetic cinacalcet and the CaSR agonist spermine), and an effect elevating TG content in conditions of high oleic acid and the expression of proinflammatory cytokines. As an important initial contribution, we have also documented the presence of the CaSR in human hepatic tissue in a small number of samples, with an interesting preliminary suggestion that there may be an influence of the nutritional status on its expression (i.e. obese subjects may express more CaSR), which will require further analysis.

In addition to the effect on lipid handling, the present study established that CaSR stimulation elevates aP2 content in adipose cells. Considering the recently recognized role of aP2 as novel adipocyte endocrine signal [10], these findings may have important potential implications at the hepatic level. Circulating aP2 levels are increased in patients with obesity, metabolic syndrome, T2D and hyperlipidemia, and deficiency of aP2 in both genetic and diet-induced animal models results in reduced insulin levels and increased insulin sensitivity [9,10]. At the hepatic level, recombinant aP2 stimulates glucose production and gluconeogenic activity in primary hepatocytes *in vitro* and in lean mice *in vivo*, and neutralization of secreted aP2 reduces the altered phenotype [17]. In addition, treatment with an aP2 inhibitor reduced liver TG content, SCD-1 and FASN gene expression [29]. These data suggest a relevant role of AT-secreted aP2 in the development of metabolic alterations.

To emulate an environment of excess free-fatty acid availability, HepG2 cells were treated with oleic acid. Hepatic steatosis in humans involves oleic and palmitic acid accumulation [30], however, it has been observed that oleic acid induces greater TG accumulation with less apoptotic effects than palmitic acid in hepatocyte cell culture [19]. In addition, it has been reported that oleic acid induces morphological changes similar to those described in steatotic hepatocytes [20]. Under our oleic acid-treated conditions, TG content was elevated, which is consistent with other studies [19], and CaSR activation increased this response. This observation prompted us to evaluate the expression of liver lipogenesis-related genes; however, cinacalcet had no effect on the expression of lipogenic enzymes, indicating that other pathways must play a role in the observed increase of TG content. CaSR activation is associated with an inflammatory state in several cell types; including AT [3,31,32]. We previously observed that cinacalcet treatment in human AT explants elevate IL1 β secretion [3] and it has been reported that this cytokine elevates hepatic steatosis in response to high-fat diet in mice [6]. The present observations suggest that CaSR-induced inflammation also occurs locally at the hepatic level, since cinacalcet elevated IL6, IL1 β and TNF α expression in HepG2 cells. Interestingly, a number of studies have observed that hepatic inflammatory stress contributes to TG accumulation and non-alcoholic fatty liver disease progression, and may also mediate our results [33]. In HepG2 cells, treatment with TNF α and IL6 increases the hepatic fatty acid translocase CD36, which plays an important role in hepatic fatty acid transport facilitating the uptake of long-chain fatty acids through mTOR phosphorylation [22,34]. The cinacalcet-induced elevation in TG content under elevated oleic acid conditions observed in our study may be due to an elevation in CD36 activity level, stimulated by the

(also CaSR-induced) inflammatory response.

Our observations may have important implications if replicated at the whole body level. A reduced adipocyte capacity to safely store fat as TGs may result in excess available circulating fatty acids that will reach other organs, causing the well-described phenomenon of lipotoxicity. The aP2 role as an adipokine in this context would be an additional novel and relevant mediator in the effects of CaSR activation contributing to the metabolic comorbidities associated with obesity. Furthermore, besides the signals resulting from the direct effects of CaSR on AT, the present work opens a new aspect of CaSR-induced pathophysiology and inter-organ cross-talk. We have described the presence of CaSR and a direct effect of CaSR stimulation in human hepatic cells, a model of great relevance in whole body metabolism and obesity-related alterations. Thus, CaSR-induced alterations in aP2, adipose and hepatic TG handling as well as proinflammatory factor elevation, may represent important new and potential targets in the fight against the metabolic and cardiovascular consequences of obesity.

Disclosure statement

The authors have nothing to disclose.

Acknowledgements

The authors thank Dr. Leonardo Rodriguez and Ms. Patricia Rodriguez at INDISA Hospital for the invaluable help in obtaining fat tissue. We would also like to acknowledge Dr. Nicolas Tobar for the critical review of this manuscript. This work was supported by Fondo Nacional de Desarrollo Científico y Tecnológico (FONDECYT) [grant numbers 1110157 and 1150651 to M.C.; and 1150327 to M.A.]; Comisión Nacional de Investigación Científica y Tecnológica (CONICYT) [grant number 21120167 to PV; and PIA/Basal PFB12, Basal Centre for Excellence in Science and Technology to M.A.]; and the Chilean Society of Endocrinology and Diabetes (SOCHED) [grant number 2013-04 to PV].

References

- [1] L. Liu, M. Mei, S. Yang, Q. Li, Roles of chronic low-grade inflammation in the development of ectopic fat deposition, *Mediat. Inflamm.* 2014 (2014) 418185.
- [2] M. Cifuentes, C. Albala, C. Rojas, Calcium-sensing receptor expression in human adipocytes, *Endocrinology* 146 (5) (2005) 2176–2179.
- [3] M. Cifuentes, C. Fuentes, N. Tobar, I. Acevedo, E. Villalobos, E. Hugo, N. Ben-Jonathan, M. Reyes, Calcium sensing receptor activation elevates proinflammatory factor expression in human adipose cells and adipose tissue, *Mol. Cell. Endocrinol.* 361 (1–2) (2012) 24–30.
- [4] G. Rocha, E. Villalobos, C. Fuentes, P. Villarroel, M. Reyes, X. Diaz, P. Mattar, M. Cifuentes, Preadipocyte proliferation is elevated by calcium sensing receptor activation, *Mol. Cell. Endocrinol.* 412 (2015) 251–256.
- [5] P. Villarroel, M. Reyes, C. Fuentes, M.P. Segovia, N. Tobar, E. Villalobos, J. Martinez, E. Hugo, N. Ben-Jonathan, M. Cifuentes, Adipogenic effect of calcium sensing receptor activation, *Mol. Cell. Biochem.* 384 (1–2) (2013) 139–145.
- [6] O. Nov, H. Shapiro, H. Ovardia, T. Tarnovskii, I. Dvir, E. Shemesh, J. Kovsan, I. Shelef, Y. Carmi, E. Voronov, R.N. Apte, E. Lewis, Y. Haim, D. Konrad, N. Bshah, A. Rudich, Interleukin-1 β regulates fat-liver crosstalk in obesity by auto-paracrine modulation of adipose tissue inflammation and expandability, *PLoS One* 8 (1) (2013) e53626.
- [7] S. Yang, W. Zhang, Q. Zhen, R. Gao, T. Du, X. Xiao, Z. Wang, Q. Ge, J. Hu, P. Ye, Q. Zhu, Q. Li, Impaired adipogenesis in adipose tissue associated with hepatic lipid deposition induced by chronic inflammation in mice with chow diet, *Life Sci.* 137 (2015) 7–13.
- [8] F. Diraison, E. Dusserre, H. Vidal, M. Sothier, M. Beylot, Increased hepatic lipogenesis but decreased expression of lipogenic gene in adipose tissue in human obesity, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 282 (1) (2002) E46–E51.
- [9] M. Furuhashi, S. Saitoh, K. Shimamoto, T. Miura, Fatty acid-binding protein 4 (FABP4): pathophysiological insights and potent clinical biomarker of metabolic and cardiovascular diseases, *Clin. Med. Insights. Cardiol.* 8 (Suppl. 3) (2014) 23–33.
- [10] G.S. Hotamisligil, D.A. Bernlohr, Metabolic functions of FABPs—mechanisms and therapeutic implications, *Nat. Rev. Endocrinol.* 11 (10) (2015) 592–605.
- [11] K.L. Milner, D. van der Poorten, A. Xu, E. Bugianesi, J.G. Kench, K.S. Lam,

- D.J. Chisholm, J. George, Adipocyte fatty acid binding protein levels relate to inflammation and fibrosis in nonalcoholic fatty liver disease, *Hepatology* 49 (6) (2009) 1926–1934.
- [12] X.L. Huang, Association of serum levels of adipocyte fatty acid-binding protein and high-sensitivity C reactive protein with severity of acute ischemic stroke, *Cell Biochem. Biophys.* 72 (2) (2015 Jun) 359–361.
- [13] E.R. Hugo, T.D. Brandebourg, C.E. Comstock, K.S. Gersin, J.J. Sussman, N. Ben-Jonathan, LS14: a novel human adipocyte cell line that produces prolactin, *Endocrinology* 147 (1) (2006) 306–313.
- [14] M.M. Zegers, D. Hoekstra, Mechanisms and functional features of polarized membrane traffic in epithelial and hepatic cells, *Biochem. J.* 336 (Pt 2) (1998) 257–269.
- [15] L. Nazal, A. Riquelme, N. Solis, M. Pizarro, A. Escalona, M. Burotto, J.I. Mendez, C. Saint-Jean, M.J. Concha, S. Giovanni, D. Awruch, A. Morales, R. Baudrand, G. Carrasco, M.A. Dominguez, O. Padilla, M. Espinoza, J.F. Miquel, F. Nervi, M. Arrese, Hypoadiponectinemia and its association with liver fibrosis in morbidly obese patients, *Obes. Surg.* 20 (10) (2010) 1400–1407.
- [16] M.W. Pfaffl, A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR, *Nucleic Acids Res.* 29 (9) (2001) e45.
- [17] H. Cao, M. Sekiya, M.E. Ertunc, M.F. Burak, J.R. Mayers, A. White, K. Inouye, L.M. Rickey, B.C. Ercal, M. Furuhashi, G. Tuncman, G.S. Hotamisligil, Adipocyte lipid chaperone AP2 is a secreted adipokine regulating hepatic glucose production, *Cell Metab.* 17 (5) (2013) 768–778.
- [18] D. Lucero, V. Zago, G.I. Lopez, M. Graffigna, H. Fainboim, V. Miksztoewicz, T. Merono, S. Belli, O. Levalle, R. Wikinski, F. Brites, G. Berg, L. Schreier, Pro-inflammatory and atherogenic circulating factors in non-alcoholic fatty liver disease associated to metabolic syndrome, *Clin. Chimica Acta Int. J. Clin. Chem.* 412 (1–2) (2011) 143–147.
- [19] M. Ricchi, M.R. Odoardi, L. Carulli, C. Anzivino, S. Ballestri, A. Pinetti, L.I. Fantoni, F. Marra, M. Bertolotti, S. Banni, A. Lonardo, N. Carulli, P. Loria, Differential effect of oleic and palmitic acid on lipid accumulation and apoptosis in cultured hepatocytes, *J. Gastroenterol. Hepatol.* 24 (5) (2009) 830–840.
- [20] D.D. Zhang, J.G. Zhang, X. Wu, Y. Liu, S.Y. Gu, G.H. Zhu, Y.Z. Wang, G.L. Liu, X.Y. Li, Nuciferine downregulates Per-Arnt-Sim kinase expression during its alleviation of lipogenesis and inflammation on oleic acid-induced hepatic steatosis in HepG2 cells, *Front. Pharmacol.* 6 (2015) 238.
- [21] H.Y. Kwan, W.F. Fong, Z. Yang, Z.L. Yu, W.L. Hsiao, Inhibition of DNA-dependent protein kinase reduced palmitate and oleate-induced lipid accumulation in HepG2 cells, *Eur. J. Nutr.* 52 (6) (2013) 1621–1630.
- [22] C. Wang, L. Hu, L. Zhao, P. Yang, J.F. Moorhead, Z. Varghese, Y. Chen, X.Z. Ruan, Inflammatory stress increases hepatic CD36 translational efficiency via activation of the mTOR signalling pathway, *PLoS One* 9 (7) (2014) e103071.
- [23] P. Villarroel, E. Villalobos, M. Reyes, M. Cifuentes, Calcium, obesity, and the role of the calcium-sensing receptor, *Nutr. Rev.* 72 (10) (2014) 627–637.
- [24] H. Wang, R.H. Eckel, Lipoprotein lipase: from gene to obesity, *American journal of physiology, Endocrinol. Metab.* 297 (2) (2009) E271–E288.
- [25] O. Poulain-Godefroy, C. Lecoeur, F. Pattou, G. Fruhbeck, P. Froguel, Inflammation is associated with a decrease of lipogenic factors in omental fat in women, *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 295 (1) (2008) R1–R7.
- [26] S.S. Choi, J. Park, J.H. Choi, Revisiting PPARgamma as a target for the treatment of metabolic disorders, *BMB Rep.* 47 (11) (2014) 599–608.
- [27] L. Canaff, J.L. Petit, M. Kisiel, P.H. Watson, M. Gascon-Barre, G.N. Hendy, Extracellular calcium-sensing receptor is expressed in rat hepatocytes, coupling to intracellular calcium mobilization and stimulation of bile flow, *J. Biol. Chem.* 276 (6) (2001) 4070–4079.
- [28] W. Xing, G. Li, Y. Xi, J. Guo, H. Li, H. Li, W. Zhang, L. Zhang, L. Wu, R. Wang, C. Xu, The functional expression of calcium-sensing receptors in BRL cells and related signal transduction pathway responsible for intracellular calcium elevation, *Mol. Cell. Biochem.* 343 (1–2) (2010) 13–19.
- [29] M. Furuhashi, G. Tuncman, C.Z. Gorgun, L. Makowski, G. Atsumi, E. Vaillancourt, K. Kono, V.R. Babaev, S. Fazio, M.F. Linton, R. Sulsky, J.A. Robl, R.A. Parker, G.S. Hotamisligil, Treatment of diabetes and atherosclerosis by inhibiting fatty-acid-binding protein aP2, *Nature* 447 (7147) (2007) 959–965.
- [30] P. Puri, R.A. Baillie, M.M. Wiest, F. Mirshahi, J. Choudhury, O. Cheung, C. Sargeant, M.J. Contos, A.J. Sanyal, A lipidomic analysis of nonalcoholic fatty liver disease, *Hepatology* 46 (4) (2007) 1081–1090.
- [31] H.I. Abdullah, P.L. Pedraza, S. Hao, K.D. Rodland, J.C. McGiff, N.R. Ferreri, NFAT regulates calcium-sensing receptor-mediated TNF production, *American journal of physiology, Ren. Physiol.* 290 (5) (2006) F1110–F1117.
- [32] C.L. Wu, Q.Y. Wu, J.J. Du, J.Y. Zeng, T.T. Li, C.Q. Xu, Y.H. Sun, Calcium-sensing receptor in the T lymphocyte enhanced the apoptosis and cytokine secretion in sepsis, *Mol. Immunol.* 63 (2) (2015) 337–342.
- [33] C. Brenner, L. Galluzzi, O. Kepp, G. Kroemer, Decoding cell death signals in liver inflammation, *J. Hepatol.* 59 (3) (2013) 583–594.
- [34] S.J. Hoosdally, E.J. Andress, C. Wooding, C.A. Martin, K.J. Linton, The Human Scavenger Receptor CD36: glycosylation status and its role in trafficking and function, *J. Biol. Chem.* 284 (24) (2009) 16277–16288.

Calcium, obesity, and the role of the calcium-sensing receptor

Pia Villarroel, Elisa Villalobos, Marcela Reyes, and Mariana Cifuentes

The elevated prevalence of obesity worldwide is a challenging public health problem. Dietary calcium intake is frequently below recommendations, and evidence gathered for more than a decade suggests that inadequate calcium intake may be related to increased body weight and/or body fat, although a consensus has yet to be reached. Whole-body energy balance and the cellular mechanisms involved have been proposed to explain this relationship, and increasing evidence from epidemiological, clinical, and basic research lends support to the hypothesis that calcium is linked to the regulation of body weight. This review provides a critical appraisal of evidence from studies that examined several different aspects of this issue. Different mechanisms are highlighted and, based on recent work, new perspectives are offered, which incorporate the concept of obesity-associated inflammation and the possible role of the extracellular calcium-sensing receptor.

© 2014 International Life Sciences Institute

INTRODUCTION

The hypothesis of an inverse relationship between calcium intake and obesity (more specifically, body weight, weight gain, and/or percent fat) has been widely discussed. Numerous publications have questioned whether adequate calcium nutrition may prevent or reduce obesity, and disparate results have led to a lack of consensus. Many reviews and meta-analyses have tried to address the apparently contradicting information. The disagreement, however, may have more to do with the expectations and interpretation of the data than the data itself, as well as the specific groups in which the hypothesis may be valid, as will be discussed in this review.

Obesity is a multifactorial disease characterized by a positive energy balance that results from excess energy intake and/or insufficient energy expenditure; it is manifested by an excess of adipose tissue.¹ It has become a serious problem that increases health costs and reduces healthy life years.² The World Health Organization estimates that, by 2015, 2.3 billion adults will be overweight and more than 700 million obese.³ In addition, the strong association between obesity and the development of comorbid conditions, including insulin resistance and/or

type 2 diabetes mellitus, hypertension, dyslipidemia, and metabolic syndrome, underscores the importance of studying the pathophysiology of this disorder.⁴

Current calcium intake is lower than international guidelines in many countries.^{5–10} The most recent recommendations were released in 2010 by the Institute of Medicine (United States), where intake was set at 1,000 mg/day for adults between 19 and 50 years of age and 1,200 mg/day for older groups.¹¹ In the United States, only 1 of 4 women older than 50 years meets these recommendations.¹² Low calcium intake is considered a risk factor for certain disorders, including osteoporosis,¹³ hypertension,¹⁴ cancer,¹⁵ insulin resistance,¹⁶ and the metabolic syndrome.¹⁷ Obesity is an additional possible consequence that will be discussed in this review.

Evidence linking poor calcium nutrition and excess body weight has been observed in different species. In rodent models, low dietary calcium has been implicated in weight gain,¹⁸ and calcium supplementation has been shown to prevent it.¹⁹ In humans, there is vast and complex information available. Research has focused on different aspects of the calcium/obesity hypothesis, including overall energy balance and changes in weight or body composition, as well as the possible mechanisms

Affiliations: P Villarroel, E Villalobos, M Reyes, and M Cifuentes are with the Institute of Nutrition and Food Technology, Universidad de Chile, Santiago, Chile.

Correspondence: M Cifuentes, Institute of Nutrition and Food Technology, Universidad de Chile, El Libano 5524, Macul, Santiago 7830490, Chile. E-mail: mcifuentes@inta.uchile.cl. Phone: +56-2-2978-1428. Fax: +56-2-2-2214030.

Key words: adipocyte, body fat, body weight, calcium-sensing receptor, CaSR, dietary calcium, obesity

doi:10.1111/nure.12135

Nutrition Reviews® Vol. 72(10):627–637

involved, and many reviews agree that calcium intake may have a favorable effect.^{20–27} Others have found insufficient or inconsistent evidence to fully support the hypothesis,^{28–32} which has generated several interesting letters to the editor, along with subsequent replies.^{33–36} One important problem has been that the retrospectively analyzed data were not collected from studies designed specifically to determine whether inadequate calcium intake affects body weight. Furthermore, as will be discussed in detail, important differences in study design have been ignored in many cases when data for systematic reviews were pooled, probably leading to bias toward null effects.³⁷ There is consensus, even including those studies that do not support the hypothesis, in recognizing this limitation and the need for new studies that address these methodological issues.^{23,28,38}

The aim of the present review is to examine the available evidence relating calcium intake to the regulation of body weight/fat mass, with careful attention given to study design, variations that have contributed to the current lack of consensus. In addition, concepts that have been largely ignored, i.e., adipose tissue dysfunction and inflammation, which are key in the development of obesity-related diseases, will be incorporated to add to the discussion of this topic. In particular, the possible mechanistic role of the extracellular calcium-sensing receptor (CaSR) is discussed.

CALCIUM INTAKE, BODY WEIGHT, AND BODY FAT

A vast number of factors are known (and probably also still unknown) to play a role in the development of obesity and its complications. The study of these is fundamental for understanding and addressing the consequences of this disorder. Since obesity is a multifactorial disease, however, no factor in isolation can account for a large proportion of the incidence or prevalence.^{39,40} Calcium intake may be one variable that contributes, in part, to the development of obesity and its comorbid conditions.

The potential relationship between body mass and calcium intake was first reported in 1984 by McCarron et al.,⁴¹ who analyzed cross-sectional data from over 20,000 US adults. Even though the main focus of this study was the association between nutrients and blood pressure, the authors showed lower daily calcium intake among normotensive participants in the upper percentiles of body mass index (BMI, kg/m²) and a negative association between BMI and calcium intake. The current focus on the potential role of dietary calcium in the regulation of adiposity emerged many years later, in the early 2000s, from studies by the group of Zemel et al. After using different approaches, these researchers proposed that high dietary calcium induces decreased adipocyte triglyceride accumulation and weight loss. In cultured

murine adipocytes, as well as in mouse models, they showed elevated lipolysis in response to calcium as well as weight and fat loss in response to high-calcium diets.¹⁹ In support of these data, Shi et al.⁴² observed in mice with diet-induced obesity that energy restriction together with a high calcium intake decreased cytosolic calcium in adipocytes, with markedly greater decreases in weight and fat loss (as opposed to those seen with the energy-restricted low-calcium diet). These observations transcended the scientific community, attracting media attention that led to speculation and exaggerated claims about the possible effects of calcium. There has been an important clinical interest since then, and several studies emerged, both observational and interventional.

A cross-sectional study in 537 adults reported that low dietary calcium intake was among the risk factors significantly associated with overweight and obesity, even after adjustment for several other relevant variables.³⁹ The same study showed in a sample of subjects followed for 6 years (n = 283) that low calcium intake was among the factors associated with higher weight gain (30% more likely to experience a 5-kg increase) and risk of developing obesity. Consistent with this, a 10-year follow-up observational study that evaluated dairy consumption in 3,157 adults between 18 and 30 years of age showed an inverse association between dairy intake and the cumulative incidence of obesity when basal BMI and caloric intake, among other factors, were considered.⁴³ Another cross-sectional observational study in white and African American premenopausal women showed, in bivariate analysis, an inverse association between calcium intake (measured by 4-day food records) and adiposity (BMI and fat mass) among white participants.⁴⁴ Analyses performed in 1,001 adolescents (15–18 y) showed an inverse association between milk intake and both BMI and percent body fat only in girls (who represented ≈58% of the sample),⁴⁵ findings that were supported by other studies in adolescents.^{46,47} In a population of preschoolers (24–60 months of age), a 6-month longitudinal observational study pointed to an inverse association between calcium intake (supplements or dairy) and fat mass after adjustment for confounding variables such as macronutrient intake.⁴⁸

Zemel et al.¹⁹ reported that, in an intervention whose original aim was to evaluate the antihypertensive effect of calcium in African American adult males, an elevation in calcium intake (given as 2 portions of yogurt per day) for 12 months induced an average decrease of 4.9 kg of body fat. A reevaluation of clinical studies of calcium intake (designed with a primary skeletal endpoint) by Davies et al.²⁰ found that postmenopausal weight gain was inversely related to dietary calcium intake, with an intake of 20 mg of calcium per gram of protein (i.e., ≈900 mg calcium/day, according to protein recommendations)

being associated with no weight gain. Notably, this intake is only about one-half to 1 serving (100–300 mg) below current recommendations for adults and older age groups.¹¹ Davies et al.²⁰ also concluded that calcium intake in their studies explains approximately 3% of the variability in body weight, which, given the highly multifactorial nature of obesity, is a large proportion for a single nutrient.⁴⁰ In addition, reanalysis of a randomized controlled trial of calcium supplementation revealed that both the calcium-supplemented and the placebo-controlled groups lost weight, although the kilograms lost per year were greater in the calcium group.²⁰

Not all studies have consistently reported a clear effect of calcium intake on body weight or composition. A short (3-wk) intervention study with calcium supplements of 500 mg/day versus placebo in 67 overweight and obese women showed no between-group differences in energy-restriction-induced weight changes.⁴⁹ Similar findings were observed in a 12-week energy-restriction study comparing 700 mg versus 1,400 mg of calcium daily, given as dairy,⁵⁰ whereas a 2-year randomized calcium supplementation study (1,500 mg of elemental calcium, as calcium carbonate, daily) in 335 overweight and obese adults showed no effect of calcium on weight or fat gain.⁵¹ A study using data available from a large prospective cohort in men ($\approx 20,000$ subjects) evaluated the influence of baseline calcium and change in calcium intake (dairy and supplements) on weight changes over 12 years, finding no association.⁵² An observational 6-year follow-up study evaluating the influence of dairy calcium intake on weight and waist circumference in more than 2,000 adults found that the outcomes depended on sex, baseline weight status, and even the type of dairy products consumed, highlighting the complexity of these associations.⁵³ A 2006 review that included 13 randomized controlled trials concluded there is no association between calcium supplementation and body weight reduction.⁵⁴ As discussed below, these authors warn that results should be interpreted with caution, since they found flaws in randomization methods as well as important baseline imbalances in body weight and other factors that may have affected the outcomes. For example, a study of approximately 13,000 North American adolescents reported a direct association between dairy consumption and BMI.⁵⁵ This conclusion was later challenged on the basis that milk intake did not have the reported effect when data were adjusted for energy consumption.⁵⁶

More consistent findings for a favorable effect of calcium on body weight control seem to emerge from intervention studies performed during energy restriction and/or in the setting of low baseline calcium intakes. A 6-month trial to increase dairy product consumption in 121 overweight adults in weight-stable conditions showed a reduction in waist circumference only in sub-

jects with low baseline calcium intake (<700 mg/day).⁵⁷ Similar results were found in a 4-month weight-loss study of calcium and vitamin D supplementation, in which effects on body weight and fat loss were observed only when low calcium consumers at baseline (<600 mg/day) were included in the analysis.⁵⁸ A 16-week energy-restriction study (-800 kcal/day) in 35 obese subjects showed that a group receiving a high-calcium diet (1,200 mg/day from dairy) significantly reduced their waist circumference as compared with the low-calcium group (<500 mg/day).⁵⁹ This is consistent with previous observations in obese energy-restricted subjects with a low calcium intake at baseline (<500 mg/day) who were supplemented for 6 months with either dairy or calcium supplements: subjects on a dairy-rich diet and those with calcium supplementation showed greater fat loss from the trunk region than those with a low calcium intake.⁶⁰ A similar, albeit shorter (3-month), energy-restriction study by the same group also found that yogurt supplementation (1,100 mg vs 500 mg of calcium per day in consumers with low calcium intake at baseline) produced more fat loss, less lean tissue loss, and greater reduction in waist circumference.⁶¹ Interestingly, a dairy intervention study (0–1 vs 3 servings per day, amounting to a total of ≈ 450 mg vs $\approx 1,100$ mg of calcium per day, respectively) that included both an approximately 6-month weight-stable protocol and an energy-restriction protocol in subjects consuming low-calcium diets (<600 mg/day) at baseline showed beneficial effects in body composition (greater decreases in fat mass and increase or maintenance of lean mass) with increased dairy intakes in both studies.⁶² On the other hand, a 12-month energy-restriction study comparing groups with high calcium intake (>900 mg/day) at baseline and greater calcium consumption during the study (800 mg vs 1,400 mg per day) did not show any differences in weight or fat loss due to calcium intake,⁶³ indicating that initial calcium intake may be a key element in this effect.

Other data available from randomized trials of dairy products or calcium supplements also support the higher-calcium/obesity hypothesis, but only in limited situations. After their meta-analysis of 29 randomized controlled trials, Chen et al.³² suggested that dairy consumption does not significantly reduce body weight or fat in studies lasting for a year or more or in those without an energy restriction component, although they acknowledge there may be an effect in short-term studies or in those utilizing energy restriction. Shapses et al.⁶⁴ evaluated data from 100 pre- and postmenopausal women who participated in 3 weight-loss trials performed previously in their laboratory. There was no evidence of greater weight or fat loss in the calcium-supplemented group (1,000 mg of elemental calcium in the form of calcium citrate malate or calcium citrate) versus placebo. The

study was carried out using an energy reduction of about 500 kcal/day for 6 months.⁶⁴ Baseline calcium intake in these trials (between 600 mg and 1,000 mg per day) was not as low as in other studies,¹⁹ which may account, in part, for the differing results. The authors, however, recognize that the nonsignificant differences tend, nevertheless, toward greater weight and fat loss in the calcium-supplemented groups, agreeing with the concept that there may be a small effect that did not reach statistical significance. Interestingly, they report that the effect seemed larger for fat mass changes than for weight changes, pointing to an effect in body composition and fat metabolism. They propose that the original focus on weight change rather than fat mass change in these studies may incorporate additional variability in the analyses.⁶⁴

The increased interest and the numerous studies that have evaluated the calcium/obesity hypothesis have prompted a large number of systematic analyses. A recent review of randomized clinical studies of increased dietary calcium, including subjects with normal and energy-restricted diets, concluded that calcium supplementation has a small (albeit statistically significant) effect that promotes weight loss in overweight and obese individuals,²⁷ although the authors question the clinical relevance of such an effect. Notably, this issue has been discussed in depth by Heaney and Rafferty,⁴⁰ and by Heaney alone,⁶⁵ who argue, as mentioned above, that, in the study of a multifactorial disease such as obesity, no single factor can be expected to account for a large proportion of the phenomenon. Moreover, Heaney⁶⁵ highlights the contrast between individual responses and population-level impact, noting that, while the effects observed in these studies can indeed be considered irrelevant for an individual who intends to lose 70 kg, they can make a considerable difference for a population undergoing consistent weight gain over the years.

Calcium and obesity: issues in the systematic evaluation of intervention studies in nutrition

The work discussed above shows that the approach of looking at several studies together often precludes the analysis of important confounding factors such as baseline calcium levels, source of calcium supplementation, baseline weight, age, gender, etc., all of which may play an important role in defining the calcium/obesity issue. Moreover, many of the studies included in the different analyses have considered work designed for a different primary endpoint, which decreases the power and validity of the conclusions.⁴⁰

A relevant article by Heaney³⁷ published in a recent issue of this journal highlighted important problems often encountered when reviewing clinical studies in

nutrition and established guidelines to help interpret studies of specific nutrient effects. These include attention to the following: 1) nutrient status at baseline, 2) determining whether a nutrient exposure is large enough to change the nutrient status at baseline, 3) an assessment of changes in nutrient status, 4) determining whether the study hypothesis focuses on the change in nutrient status rather than just change in diet, 5) determining whether the study design addresses and optimizes the status of other related nutrients, and 6) determining whether the duration of the exposure was sufficient.³⁷ Failure to consider these guidelines when designing or evaluating nutrition science research may lead to many contradicting outcomes. In the topic discussed in this review, careful consideration of these points may actually be the key to solving the apparent controversy.

For the intervention studies analyzed in the present work, the extent to which they met Heaney's guidelines was evaluated. Not surprisingly, no single study met all of the stated guidelines. This was expected, in part because not enough is presently known about calcium nutrition research, and also because too few tools are available. For instance, there is no agreement on how to determine calcium nutritional status, a relevant issue that goes beyond the scope of this review. Furthermore, since understanding of the dose-response behavior of calcium intake and of changes in body weight or fat parameters is still incomplete, it is very difficult to determine which study meets the criterion of a "large enough" exposure. Thus, the focus is usually placed on the dietary intervention rather than on an actual physiological response. In the evaluation of the 11 intervention studies in humans,^{61,63} 2 did not report the total calcium intake prior to entering the study,^{49,63} and only 3 considered it explicitly as part of the inclusion/exclusion criteria.⁵⁷⁻⁵⁹ Two of the studies reported either high variability in baseline calcium levels or baseline differences between treatment groups,^{51,57} and 6 indicated baseline values that may have been too high for the subjects to benefit from supplementation.^{50,51,57,58,63,64} The duration of the studies varied between 3 weeks⁴⁹ and 2 years,⁵¹ making the results difficult to compare.

It seems appropriate to address three additional considerations when evaluating the relationship between calcium intake and obesity. Even though these three aspects have already been mentioned for some of the individual studies, it is interesting to analyze them for all 11 of the intervention studies included in this review. The source of supplemental calcium (dairy products [any kind] vs tablets [any composition]), even though this may be an oversimplification) is important to consider. Of the 4 studies that provided calcium as supplements,^{49,51,58,64} 1 showed calcium to have an effect of decreasing body weight and fat mass. Of the 6 studies that used dairy

products, 4 showed an effect of reducing fat or waist circumference^{57,59,61,62} and 2 did not.^{50,63} One study evaluated both calcium tablets and dairy products,⁶⁰ observing dairy to have a greater effect of reducing weight and fat loss, although both treatments were effective when compared with no calcium. The second additional consideration is whether a parallel energy-restriction protocol was included in the study design. Of the 11 intervention studies evaluated in this review, 8 included energy restriction,^{49,50,58–61,63,64} all to a similar extent (500–800 kcal deficit/day). The 2 that were performed with no concomitant decreases in energy intake yielded contradicting results. The first was a 6-month intervention with dairy that showed a reduction in waist circumference only in subjects with <700 mg/day calcium intake at baseline.⁵⁷ The other, which lasted 24 months and examined the effect of calcium carbonate supplementation, showed no effect on weight or fat gain, even when only those subjects with calcium intakes of <600 mg/day were analyzed.⁵¹ Another study investigated the calcium (as dairy) intervention under both weight-stable and energy-restricted conditions and found that dairy intake favored fat loss in both studies.⁶² The third additional consideration is the initial weight of the study subjects. This is the parameter for which the most uniformity was found, with all studies including overweight and/or obese subjects.

Even though this is not a comprehensive review of the available literature, the above analysis clearly shows the complexity of trying to reach a conclusion from such a wide variety of available studies. Comparing outcomes based on one isolated criterion (e.g., calcium intake at baseline, energy restriction, source of calcium, etc.) is inadequate if the other relevant criteria are not standardized. The reality is that most available studies are not comparable, and if the analysis cannot meet the very elemental rule of “pool like with like,” as Heaney³⁷ mentions, conclusions drawn from these studies must be considered with great caution.

CALCIUM INTAKE AND REGULATION OF ENERGY BALANCE: PROPOSED MECHANISMS

To date, studies of the influence of calcium intake on body weight and/or body fat have proposed different mechanisms to explain the observed effects. While some studies approach energy balance from a whole-body perspective (i.e., appetite control and fecal fat excretion), others focus on the cellular processes that may be involved (i.e., fat mobilization and oxidation). Clearly, whole-body and individual cell mechanisms of energy balance coexist, but it is important to recognize that cellular mechanisms alone cannot explain the regulation of whole-body energy balance. Described below are the main pathways (summarized in Figure 1) that – without

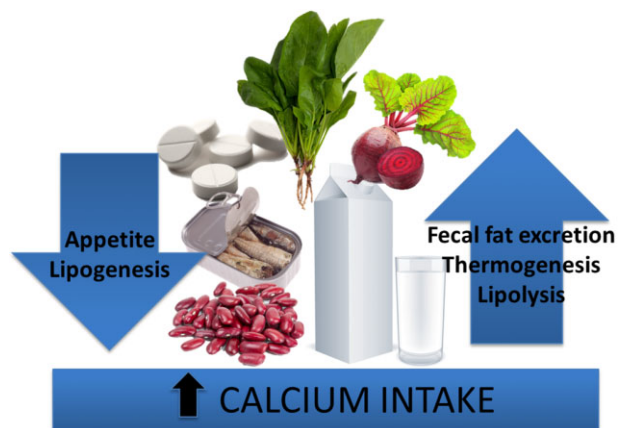


Figure 1 Proposed mechanisms for the effect of greater calcium intake to decrease body weight and/or fat (see text for details).

being exclusive – could be involved. A brief discussion of the data supporting these pathways is provided as well.

Mechanisms of whole-body energy balance: fecal fat excretion and appetite control

Fecal fat excretion. One of the mechanisms by which calcium may contribute to a negative energy balance is through its ability to decrease intestinal fat absorption and elevate the amount of fatty acids eliminated in the feces.²⁶ The concept of greater fecal fat excretion with higher calcium intake has been known for more than 40 years. A particularly interesting effect of calcium is that fecal fat excretion is preferentially of saturated fat, which has a beneficial effect on circulating lipids.^{66,67} Studies comparing different levels of calcium intake consistently show some degree of elevated fecal fat excretion.^{68–70} A meta-analysis reported that a calcium intake of approximately 1,200 mg/day results in a more than 5-g increase in daily fecal fat excretion,⁷¹ which would amount to 45 kcal. This is highly clinically relevant, particularly considering calculations that an approximately 50 kcal/day imbalance (excess) could explain the pattern of weight gain observed in population-wide studies.⁷²

Increased fecal fat excretion induced by dietary calcium is attributable to the formation of insoluble calcium/fatty-acid soaps, which pass unabsorbed through the intestinal tract and are excreted in the feces. Animal studies have suggested another mechanism in which the formation of calcium phosphate precipitates is followed by the binding of biliary acids. Once bound, the biliary acids are less available for fat digestion and are mostly excreted in the feces.⁷³ Human studies, however, do not support these observations.^{66,70}

Appetite control. Another proposed mechanism for the modulation of body weight and/or fat by dietary calcium is related to appetite control. Evidence supporting an effect of calcium on appetite control comes mainly from interventions involving dairy calcium supplementation. A 6-month study in women losing weight with or without dairy calcium supplementation (1,000 mg/day) showed that milk was able to decrease hunger induced by weight loss.⁷⁴ In a short-term (3-wk) weight-loss study, also in women, an addition of 500 mg/day calcium (as carbonate or “dairy-origin” [a mixture of phosphate, lactate, and citrate]) resulted in a lower hunger score.⁴⁹ Ping-Delfos and Soares⁷⁵ observed that calcium and vitamin D intake at breakfast was able to reduce energy intake through a lower carbohydrate consumption during the following 24 hours. In addition, a previous study in 2009 had already shown that calcium (as carbonate) and vitamin D intake decreased fat intake after 15 weeks of a weight-loss program in overweight and obese women with a low (600 mg) baseline daily calcium intake.⁵⁸ Recent observations in overweight and obese adults consuming an energy-deficient diet (−500 kcal/d) and either low (700 mg/d) or high (1,400 mg/d) calcium (a combination of dairy plus 350 mg of calcium carbonate supplement) for 12 weeks showed greater satiety and lower fat intake in subjects on the high-calcium regimen.⁵⁰ Not all studies have been able to confirm the satiating effect of calcium and/or dairy supplementation, particularly in acute cross-sectional studies without weight loss.⁷⁶

In terms of the possible mechanisms involved, some authors have attributed these findings to an elevation in circulating levels of peptide tyrosine tyrosine, which is related to fat-seeking behavior.⁵⁰ Based on studies in rats,⁷⁷ it has also been proposed that a low-calcium diet induces a mechanism of appetite regulation that specifically targets calcium. Such a mechanism would drive deficient subjects to seek calcium-rich foods and, as a consequence, would increase their total energy consumption. Conversely, an adequate calcium intake would prevent this tendency and facilitate the success of a weight-reducing program. It is important to stress that it is not clear whether the observed satiating effect is due to calcium or to an effect of the food matrix present in dairy foods. Even though some of the studies described showed an effect of nondairy calcium supplementation, some of the evidence available may be due to the effect, for example, of the protein present in dairy products, which may itself modulate appetite-regulating hormones.⁷⁸

Cellular mechanisms: mobilization and oxidation of fat

The link between low calcium intake and increased body weight/fat has been related to the paradox whereby lower

dietary calcium availability triggers mechanisms that elevate cytosolic calcium. Numerous studies in different cell types have suggested that free ionic calcium in the cytosol plays a key role in metabolic disorders associated with insulin resistance and obesity. The effect of adipocyte intracellular free calcium as a modulator of body fat and obesity was first proposed by Zemel et al. These researchers stated that low dietary calcium activates a response, via the regulation of parathyroid hormone and 1,25 dihydroxyvitamin D, that induces an elevation in adipocyte cytosolic calcium. This elevation, in turn, triggers an upregulation of lipid storage via the concerted modulation of the lipogenic and lipolytic processes.^{14,19} The authors have shown that elevated cytosolic calcium is associated with greater expression and activity of the *de novo* lipogenic enzyme fatty acid synthase.¹⁴ Elevated cytosolic calcium has also been associated with an antilipolytic effect via direct activation of the enzyme phosphodiesterase 3B, resulting in lower levels of intracellular cyclic AMP, which decreases the phosphorylation necessary for the initiation of lipolysis.⁷⁹

Increased lipolysis and decreased lipogenesis do help explain a fat-loss model within the adipocyte. However, once triglycerides have been hydrolyzed during the lipolytic process, mobilized fatty acids need to be oxidized, otherwise they would constitute a risk of lipotoxicity if targeted to – or deposited in – other organs. Therefore, a net increase in fat oxidation is necessary to explain net fat (and consequently, body weight) loss. Evidence of a direct association between acute calcium intake and a higher rate of fat oxidation was obtained in nonobese healthy adults,⁸⁰ but other reports have suggested this may happen only in the context of an energy-restricted diet.⁸¹ A study in 11 subjects (ranging from lean to obese) reported that higher calcium and vitamin D intake at breakfast elevated postprandial fat oxidation and diet-induced thermogenesis.⁷⁵ Shi et al.⁴² were the first to suggest the participation of calcium and/or dairy in the process of thermogenesis via increased expression of uncoupling proteins, which was accompanied by an increase in core temperature. A recent meta-analysis concluded that high chronic calcium consumption is associated with an elevation in the fat oxidation rate; a similar effect has been observed with acute calcium consumption, but more evidence is needed.⁸²

BEYOND BODY WEIGHT AND COMPOSITION: CALCIUM INTAKE AND OBESITY-RELATED ADIPOSE TISSUE INFLAMMATION

Obesity, inflammation, and adipose tissue dysfunction

Research in recent years has shown obesity to be even more complex than was previously understood. In brief, it

is not the amount of fat present in an individual but rather the functionality of the fat that determines the development of the metabolic and cardiovascular consequences of obesity.

In addition to its well-recognized role as a regulator of energy fluxes within the body,⁸³ adipose tissue is an endocrine organ that secretes numerous factors, defined as adipokines.⁸⁴ The expansion of adipose tissue mass in obesity (particularly with a preponderance of visceral fat accumulation) is commonly associated with deleterious changes in adipokine secretion, resulting in a proinflammatory profile.⁸⁵ Locally, this secretory profile has been linked to functional impairment, i.e., lower insulin sensitivity, decreased adipogenesis, deficient vascular network, excessive extracellular matrix, and inflammatory macrophage infiltration.⁸⁵ As a consequence, the tissue becomes inefficient for storing fatty acids (causing a “lipid overflow” onto peripheral tissues, with subsequent lipotoxicity), hypoxic, rigid (impairing the remodeling needed for a “healthy” increase in its mass when needed), and inflamed. These obesity-triggered changes prevent adipose tissue from properly performing its homeostatic and endocrine functions. The current paradigm states that dysfunction in adipose tissue is the pathophysiological link between obesity and its comorbid conditions. Indeed, obese individuals without adipose tissue alterations such as macrophage infiltration show an “uncoupling” between obesity and metabolic impairment.⁸⁶

Calcium and inflammation

The association between calcium and inflammation was established after observations that marked elevations in the circulating proinflammatory cytokines interleukin (IL)-1 β and tumor necrosis factor- α (TNF- α) in patients with severe burns or sepsis were accompanied by a decrease in calcemia.⁸⁷ The frequency of dairy consumption has been inversely associated with the serum inflammatory markers C-reactive protein, IL-6, and TNF- α in healthy individuals.⁸⁸ However, not all reports agree, and it was recently observed that a high-calcium diet had no effect on TNF- α or C-reactive protein levels.⁵⁹ This study, however, was done in obese subjects, who are expected to have basally altered inflammatory states. Even though the study design favored the reduction in body weight that was observed, subjects were, on average, still obese at the end of the intervention. In a rodent model of diet-induced obesity (aP2 agouti transgenic mice), a higher calcium intake inhibited TNF- α and IL-6 expression while elevating the anti-inflammatory factors IL-5 and adiponectin in visceral fat.⁸⁹ This study also found that 1,25 dihydroxyvitamin D increased TNF- α , IL-6, and IL-8 expression in adipose cells in vitro. The effect was

inhibited by the calcium channel antagonist nifedipine, strongly suggesting that vitamin-D-induced calcium influx was a key mediator of the effect. A later study by the same group showed that a dairy-based high-calcium diet decreased (when compared with soy) oxidative stress and inflammatory biomarkers in overweight and obese subjects.⁹⁰

Calcium-sensing receptor and calcium modulation in obesity

The above-described cellular mechanisms that support the hypothesis of a relationship between an inadequate calcium intake and the regulation of fat accumulation and/or triglyceride metabolism may be complemented by the involvement of the CaSR in adipose tissue. This receptor was first cloned in 1993 and belongs to the G protein-coupled receptor superfamily.⁹¹ As the name reveals, its main physiological agonist is extracellular calcium. The CaSR regulates circulating levels of calcium mainly by inhibiting the secretion of parathyroid hormone in response to elevations in plasma calcium. Nonetheless, the receptor responds to a number of other agonists or allosteric activators, such as several divalent and trivalent metals (Mg⁺², Gd⁺³, Ba⁺³, and La⁺³, among others), amino acids (particularly aromatic), polyamines, some antibiotics, and calcimimetics, which are synthetic CaSR modulators. In addition to its role in calcium homeostasis, the CaSR is involved in a wide variety of physiological processes, such as chemotaxis, cell proliferation, differentiation, apoptosis, and membrane excitability, among others.⁹²

The CaSR has been identified in human adipose tissue, and its possible role in the modulation of adipose functionality has been proposed.⁹³ Nuclear factor-kappaB (NF- κ B) is the master regulator of inflammation. Given the presence of NF- κ B response elements in the *CASR* gene, the involvement of the CaSR in inflammation-related pathological conditions has also been proposed.^{94,95} Cifuentes et al.⁹⁶ observed that IL-1 β , TNF- α , and IL-6 increased CaSR protein expression in in vitro differentiated human primary adipocytes and the human adipose cell line LS14. Other studies also showed that adipose tissue and cultured adipose cells exposed to the calcimimetic cinacalcet increases the expression of proinflammatory factors IL-6, IL-1 β , TNF- α , and CCL2, mediated in part by NF- κ B.⁹⁷

Interestingly, in CaSR expression studies, a medium conditioned by adipose tissue explants from obese subjects with a range of BMIs elevated CaSR protein levels in LS14 adipocytes, and the effect was greater when the adipose tissue donor had a higher BMI (i.e., was more obese).⁹⁶ Consistent with these observations, Hultin et al.⁹⁸ reported that, compared with normal-weight

controls, obese subjects presented high sensitivity for calcium, with a left shift in the curve that represented the relationship between plasma calcium and parathyroid hormone, which could be speculated to result from greater activity of the CaSR. He et al.⁹⁹ recently observed greater serum parathyroid hormone levels but similar levels of circulating calcium in obese versus nonobese controls. They suggested this could be attributable to allosteric regulation, given that they did not observe greater CaSR expression in the obese (even though this was measured in adipose tissue and not in the parathyroid gland). The literature on pharmacological CaSR activation and its effect on body weight is scarce, probably because the current therapeutic agents that target this receptor are used mainly to treat hyperparathyroid conditions secondary to dialysis or cancer.¹⁰⁰ One study on growth plate function in uremic rats anecdotally reported that treatment with the calcimimetic cinacalcet resulted in greater total body weight gain (even when normalized per initial body weight and per food intake), with no impact on longitudinal growth.¹⁰¹ Even though the possible explanations given by the authors include the mechanisms induced by both central and muscle CaSR preventing uremia-induced catabolism, these intriguing results require further exploration, and adipose-related mechanisms cannot be ruled out.

The above-mentioned information supports the possible involvement of the CaSR as a link between obesity and inflammation, adding a potential mechanistic element to the calcium/obesity hypothesis. A number of researchers have suggested that CaSR activation may modulate cytosolic calcium concentrations and the expression of metabolic markers in adipose cells.^{18,102–104} A study in isolated human omental adipocytes showed that 1 μ M of the calcimimetic cinacalcet decreases glycerol release by 20%, suggesting that CaSR activation inhibits basal lipolysis.¹⁰² This antilipolytic effect was later confirmed in a study using SW872 adipose cells: CaSR activation by the agonist GdCl₃ inhibited lipolysis concomitantly with elevations in intracellular calcium and other relevant changes in lipolysis-regulating enzymes.¹⁰³

The relationship between expression and/or function of CaSR and calcium intake has not been sufficiently explored, and given the extensive tissue- and context-dependent responses of the CaSR, it probably varies depending on the location and experimental conditions. The expression of the CaSR was examined in parathyroid glands of rats fed different amounts of calcium (0.02–2%) in combination with vitamin-D-deficient or -adequate diets for 6 weeks.¹⁰⁵ Dietary calcium did not affect CaSR mRNA, whereas expression decreased by 40% with the vitamin-D-deficient diet. Moreover, treatment with 1,25 dihydroxyvitamin D (either via diet or intraperitoneal injections) resulted in elevated CaSR mRNA in the para-

thyroid gland and kidney, which is consistent with the presence of vitamin D response elements in the *CASR* gene promoter.¹⁰⁶ Interestingly, He et al.¹⁸ showed that rats fed low-calcium diets (0.30% and 0.15% vs normal 0.5%) have elevated CaSR protein content in adipose tissue after 10 and 15 weeks of treatment, but not at week 5, which coincides with the results of the previous study at week 6. In addition, He et al.¹⁸ reported that 1,25 dihydroxyvitamin D treatment elevates CaSR protein in adipose cells, which is consistent with previous findings in other human and rat cell types.¹⁰⁶

A close functional relationship between 1,25 dihydroxyvitamin D and the CaSR has been also documented. He et al.¹⁸ showed that vitamin D decreased lipolytic enzymes and lipolysis markers in SW872 adipocytes, and the effect was reverted by treatment with a CaSR antagonist or by silencing the *CASR* gene.¹⁸ Furthermore, the CaSR antagonist or the silencing approach also inhibited the elevations of intracellular calcium elicited by 1,25 dihydroxyvitamin D.¹⁸ This evidence strongly supports the involvement of the CaSR in the model proposed by Zemel et al.,^{14,19} in which 1,25 dihydroxyvitamin D is key (Figure 2).

Taken together, emerging evidence suggests that the CaSR may be involved in mechanisms related to dietary calcium and elevated body weight as well as obesity-related adipose tissue inflammation and, hence, comorbid conditions. Until now, the potential role of the CaSR in these mechanisms had not been considered.

CONCLUSION

It may seem as if there is no consensus about the effects of dietary calcium on body weight, fat mass control, or the development of obesity-associated disorders. A careful analysis of the evidence, however, reveals that the existing controversy is based, in part, on the wide variability of study designs, the number of studies with null effects, and the abundant clinical studies with results showing a low impact. One important observation is that, with the exception of 1 study⁵⁵ with a conclusion that was later questioned,⁵⁶ there are no studies with “negative” effects (i.e., studies that showed weight gain with calcium intake). If the hypothesis were truly null, the number of results in the opposite direction would be expected to be at least as many as the ones supporting it, as part of the expected randomness. Instead, even though not all studies showed a significant effect, many of the outcomes were in accordance with the hypothesis, which further reinforces the conclusion that higher calcium intake is related to lower body weight and/or fat. The questions that remain pertain to the conditions under which this effect is evident.

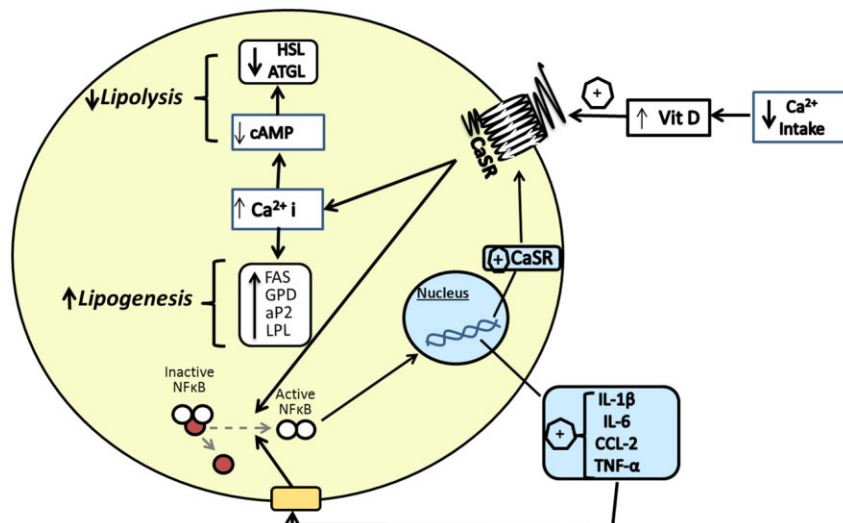


Figure 2 Proposed model for the involvement of the calcium-sensing receptor in adipocyte intracellular mechanisms related to low calcium intake and modulation of lipid metabolism. Low calcium intake elicits an elevation in circulating vitamin D, which can signal via activation of the CaSR, among other pathways. There is evidence that this activation can ultimately lead to greater expression of lipogenic markers, lower expression of lipolytic enzymes, and elevation of proinflammatory markers in visceral fat, all of which could contribute to the complications of obesity. See text for further details.

Abbreviations: aP2, adipocyte protein 2; ATGL, adipose triglyceride lipase; Ca^{2+} , calcium; $Ca^{2+}i$, cytosolic free calcium; cAMP, cyclic adenosine monophosphate; CaSR, calcium-sensing receptor; CCL2, chemokine (C-C motif) ligand 2 (also known as monocyte chemoattractant protein-1 [MCP-1]); FAS, fatty acid synthase; GPD, glycerol phosphate dehydrogenase; HSL, hormone-sensitive lipase; IL-1 β , interleukin 1beta; IL-6, interleukin 6; LPL, lipoprotein lipase; NF κ B, nuclear factor kappa B; TNF- α , tumor necrosis factor alpha; vit D, vitamin D.

Those familiar with the problem of obesity know that the regulation of body weight and fat mass depends on a vast number of factors. Research has established calcium intake as one of the factors that affect the regulation of adiposity. Understanding this factor, as well as the other ones involved, is key to elucidating the complex pathophysiological processes present in obesity, and thus one cannot (and should not) expect the calcium intake model to explain a large proportion of the obesity problem. As stated by Heaney et al.,²¹ a small effect among numerous other factors does not mean that the effect is invalid.^{40,65} Future research should emphasize adequate and consistent methodological designs to establish more definitively the conditions and circumstances under which the effect is valid and to target the population that will benefit the most.⁴⁰

Within the mechanisms described as involved in the effect of dietary calcium on body weight and/or composition, a new component is proposed to play a role at the adipocyte level. The extracellular CaSR is emerging as a molecule involved in many physiological processes in adipose tissue. Evidence demonstrating its involvement in adipose inflammatory cytokine production and the mediation of 1,25 dihydroxyvitamin D action, along with

its upregulation by low-calcium diets, provides strong support for its role in the mechanisms underpinning this hypothesis.

Finally, given that 1) calcium intake is generally well below the recommended values, 2) an increase in calcium intake is safe and can be achieved at a low cost, and 3) the obesity problem worldwide is far from improving, increasing calcium intake, not only for the well-known skeletal benefits but also as a means to improve body weight and/or composition, is proposed. Even though the favorable role of calcium on body weight or body fat regulation may be most compelling under certain circumstances and conditions, increasing calcium intake in general is a sound recommendation for many reasons, particularly since adequate calcium may contribute to a decrease in the prevalence of obesity and/or its associated diseases.

Acknowledgments

The authors thank Estela Blanco, MPH, for her valuable comments on the manuscript. Funded by FONDECYT grant 1110157 (MC).

Declaration of interest. The authors have no relevant interests to declare.

REFERENCES

- del Pozo CH, Calvo RM, Vesperinas-García G, et al. Expression profile in omental and subcutaneous adipose tissue from lean and obese subjects. Repression of lipolytic and lipogenic genes. *Obes Surg.* 2011;21:633–643.
- Aronne LJ. Epidemiology, morbidity, and treatment of overweight and obesity. *J Clin Psychiatry.* 2001;62(Suppl 23):13–22.
- McArdle MA, Finucane OM, Connaughton RM, et al. Mechanisms of obesity-induced inflammation and insulin resistance: insights into the emerging role of nutritional strategies. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2013;4:52. doi: 10.3389/fendo.2013.00052.
- Wilson PW, D'Agostino RB, Parise H, et al. Metabolic syndrome as a precursor of cardiovascular disease and type 2 diabetes mellitus. *Circulation.* 2005;112:3066–3072.
- Nicklas TA, O'Neil CE, Fulgoni VL III. The role of dairy in meeting the recommendations for shortfall nutrients in the American diet. *J Am Coll Nutr.* 2009;28(Suppl 1):73S–81S.
- Kranz S, Lin PJ, Wagstaff DA. Children's dairy intake in the United States: too little, too fat? *J Pediatr.* 2007;151:642–646.
- Gilis-Januszewska A, Topor-Madry R, Pajak A. Education and the quality of diet in women and men at age 45–64, in Cracow [in Polish]. *Przegl Lek.* 2003;60:675–681.
- Rodríguez-Rodríguez E, Navia Lombán B, López-Sobaler AM, et al. Review and future perspectives on recommended calcium intake. *Nutr Hosp.* 2010;25:366–374.
- Pereira DD, Lima RP, de Lima RT, et al. Association between obesity and calcium:phosphorus ratio in the habitual diets of adults in a city of Northeastern Brazil: an epidemiological study. *Nutr J.* 2013;12:90. doi: 10.1186/1475-2891-12-90.
- Peterlik M, Kallay E, Cross HS. Calcium nutrition and extracellular calcium sensing: relevance for the pathogenesis of osteoporosis, cancer and cardiovascular diseases. *Nutrients.* 2013;5:302–327.
- Ross AC, Manson JE, Abrams SA, et al. The 2011 report on dietary reference intakes for calcium and vitamin D from the Institute of Medicine: what clinicians need to know. *J Clin Endocrinol Metab.* 2011;96:53–58.
- Wang L, Manson JE, Sesso HD. Calcium intake and risk of cardiovascular disease: a review of prospective studies and randomized clinical trials. *Am J Cardiovasc Drugs.* 2012;12:105–116.
- Burckhardt P. Calcium in the prevention and treatment of osteoporosis [in German]. *Ther Umsch.* 1991;48:107–112.
- Zemel MB. Calcium modulation of hypertension and obesity: mechanisms and implications. *J Am Coll Nutr.* 2001;20(5 Suppl):428S–435S; discussion 440S–442S.
- Wu K, Willett WC, Fuchs CS, et al. Calcium intake and risk of colon cancer in women and men. *J Natl Cancer Inst.* 2002;94:437–446.
- Zemel MB. Nutritional and endocrine modulation of intracellular calcium: implications in obesity, insulin resistance and hypertension. *Mol Cell Biochem.* 1998;188:129–136.
- Beydoun MA, Gary TL, Caballero BH, et al. Ethnic differences in dairy and related nutrient consumption among US adults and their association with obesity, central obesity, and the metabolic syndrome. *Am J Clin Nutr.* 2008;87:1914–1925.
- He YH, Song Y, Liao XL, et al. The calcium-sensing receptor affects fat accumulation via effects on antilipolytic pathways in adipose tissue of rats fed low-calorie diets. *J Nutr.* 2011;141:1938–1946.
- Zemel MB, Shi H, Greer B, et al. Regulation of adiposity by dietary calcium. *FASEB J.* 2000;14:1132–1138.
- Davies KM, Heaney RP, Recker RR, et al. Calcium intake and body weight. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000;85:4635–4638.
- Heaney RP, Davies KM, Barger-Lux MJ. Calcium and weight: clinical studies. *J Am Coll Nutr.* 2002;21:152S–155S.
- Teegarden D. Calcium intake and reduction in weight or fat mass. *J Nutr.* 2003;133:249S–251S.
- Parikh SJ, Yanovski JA. Calcium intake and adiposity. *Am J Clin Nutr.* 2003;77:281–287.
- de Oliveira Freitas DM, Stampini Duarte Martino H, Machado Rocha Ribeiro S, et al. Calcium ingestion and obesity control. *Nutr Hosp.* 2012;27:1758–1771.
- Astrup A, Chaput JP, Gilbert JA, et al. Dairy beverages and energy balance. *Physiol Behav.* 2010;100:67–75.
- Soares MJ, She-Ping-Delfos WL. Postprandial energy metabolism in the regulation of body weight: is there a mechanistic role for dietary calcium? *Nutrients.* 2010;2:586–598.
- Onakpoya IJ, Perry R, Zhang J, et al. Efficacy of calcium supplementation for management of overweight and obesity: systematic review of randomized clinical trials. *Nutr Rev.* 2011;69:335–343.
- Barr SI. Increased dairy product or calcium intake: is body weight or composition affected in humans? *J Nutr.* 2003;133:245S–248S.
- Barba G, Russo P. Dairy foods, dietary calcium and obesity: a short review of the evidence. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2006;16:445–451.
- Winzenberg T, Shaw K, Fryer J, et al. Calcium supplements in healthy children do not affect weight gain, height, or body composition. *Obesity (Silver Spring).* 2007;15:1789–1798.
- Lanou AJ, Barnard ND. Dairy and weight loss hypothesis: an evaluation of the clinical trials. *Nutr Rev.* 2008;66:272–279.
- Chen M, Pan A, Malik VS, et al. Effects of dairy intake on body weight and fat: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Am J Clin Nutr.* 2012;96:735–747.
- Tremblay A. Dairy and weight loss hypothesis. *Nutr Rev.* 2008;66:544–545. author reply 546–547.
- Zemel MB. Dairy and weight loss hypothesis. *Nutr Rev.* 2008;66:542–543. author reply 546–547.
- Tremblay A. Dairy food and body fat: when the epidemiologist meets the physiologist. *Am J Clin Nutr.* 2013;97:447–448.
- Chen M, Malik VS, Hu FB. Reply to A Tremblay. *Am J Clin Nutr.* 2013;97:448. doi: 10.3945/ajcn.112.053678.
- Heaney RP. Guidelines for optimizing design and analysis of clinical studies of nutrient effects. *Nutr Rev.* 2014;72:48–54.
- Soares MJ, Chan She Ping-Delfos W, Ghanbari MH. Calcium and vitamin D for obesity: a review of randomized controlled trials. *Eur J Clin Nutr.* 2011;65:994–1004.
- Chaput JP, Leblanc C, Perusse L, et al. Risk factors for adult overweight and obesity in the Quebec Family Study: have we been barking up the wrong tree? *Obesity (Silver Spring).* 2009;17:1964–1970.
- Heaney RP, Rafferty K. Preponderance of the evidence: an example from the issue of calcium intake and body composition. *Nutr Rev.* 2009;67:32–39.
- McCarron DA, Morris CD, Henry HJ, et al. Blood pressure and nutrient intake in the United States. *Science.* 1984;224:1392–1398.
- Shi H, Dirienzo D, Zemel MB. Effects of dietary calcium on adipocyte lipid metabolism and body weight regulation in energy-restricted ap2-agouti transgenic mice. *FASEB J.* 2001;15:291–293.
- Pereira MA, Jacobs DR, Jr, Van Horn L, et al. Dairy consumption, obesity, and the insulin resistance syndrome in young adults: the CARDIA Study. *JAMA.* 2002;287:2081–2089.
- Lovejoy JC, Champagne CM, Smith SR, et al. Ethnic differences in dietary intakes, physical activity, and energy expenditure in middle-aged, premenopausal women: the Healthy Transitions Study. *Am J Clin Nutr.* 2001;74:90–95.
- Abreu S, Santos R, Moreira C, et al. Milk intake is inversely related to body mass index and body fat in girls. *Eur J Pediatr.* 2012;171:1467–1474.
- dos Santos LC, Martini LA, Cintra Ide P, et al. Relationship between calcium intake and body mass index in adolescents. *Arch Latinoam Nutr.* 2005;55:345–349.
- Palacios C, Benedetti P, Fonseca S. Impact of calcium intake on body mass index in Venezuelan adolescents. *P R Health Sci J.* 2007;26:199–204.
- Carruth BR, Skinner JD. The role of dietary calcium and other nutrients in moderating body fat in preschool children. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 2001;25:559–566.
- Kabrnova-Hlavata K, Hainer V, Gojova M, et al. Calcium intake and the outcome of short-term weight management. *Physiol Res.* 2008;57:237–245.
- Jones KW, Eller LK, Parnell JA, et al. Effect of a dairy- and calcium-rich diet on weight loss and appetite during energy restriction in overweight and obese adults: a randomized trial. *Eur J Clin Nutr.* 2013;67:371–376.
- Yanovski JA, Parikh SJ, Yanoff LB, et al. Effects of calcium supplementation on body weight and adiposity in overweight and obese adults: a randomized trial. *Ann Intern Med.* 2009;150:821–829.
- Rajpathak SN, Rimm EB, Rosner B, et al. Calcium and dairy intakes in relation to long-term weight gain in US men. *Am J Clin Nutr.* 2006;83:559–566.
- Vergnaud AC, Peneau S, Chat-Yung S, et al. Dairy consumption and 6-y changes in body weight and waist circumference in middle-aged French adults. *Am J Clin Nutr.* 2008;88:1248–1255.
- Trowman R, Dumville JC, Hahn S, et al. A systematic review of the effects of calcium supplementation on body weight. *Br J Nutr.* 2006;95:1033–1038.
- Berkey CS, Rockett HR, Willett WC, et al. Milk, dairy fat, dietary calcium, and weight gain: a longitudinal study of adolescents. *Arch Pediatr Adolesc Med.* 2005;159:543–550.
- Lappe JM. Why blame milk? *Arch Pediatr Adolesc Med.* 2005;159:1187–1188; author reply 1188.
- Wennergren MH, Smedman A, Turpeinen AM, et al. Dairy products and metabolic effects in overweight men and women: results from a 6-mo intervention study. *Am J Clin Nutr.* 2009;90:960–968.
- Major GC, Alarie FP, Dore J, et al. Calcium plus vitamin D supplementation and fat mass loss in female very low-calcium consumers: potential link with a calcium-specific appetite control. *Br J Nutr.* 2009;101:659–663.

59. Torres MR, Sanjuliani AF. Effects of weight loss from a high-calcium energy-reduced diet on biomarkers of inflammatory stress, fibrinolysis, and endothelial function in obese subjects. *Nutrition*. 2013;29:143–151.
60. Zemel MB, Thompson W, Milstead A, et al. Calcium and dairy acceleration of weight and fat loss during energy restriction in obese adults. *Obes Res*. 2004;12:582–590.
61. Zemel MB, Richards J, Mathis S, et al. Dairy augmentation of total and central fat loss in obese subjects. *Int J Obes (Lond)*. 2005;29:391–397.
62. Zemel MB, Richards J, Milstead A, et al. Effects of calcium and dairy on body composition and weight loss in African-American adults. *Obes Res*. 2005;13:1218–1225.
63. Thompson WG, Rostad Holdman N, Janzow DJ, et al. Effect of energy-reduced diets high in dairy products and fiber on weight loss in obese adults. *Obes Res*. 2005;13:1344–1353.
64. Shapses SA, Heshka S, Heymsfield SB. Effect of calcium supplementation on weight and fat loss in women. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004;89:632–637.
65. Heaney RP. Calcium and obesity: effect size and clinical relevance. *Nutr Rev*. 2011;69:333–334.
66. Bhattacharyya AK, Thera C, Anderson JT, et al. Dietary calcium and fat. Effect on serum lipids and fecal excretion of cholesterol and its degradation products in man. *Am J Clin Nutr*. 1969;22:1161–1174.
67. Denke MA, Fox MM, Schulte MC. Short-term dietary calcium fortification increases fecal saturated fat content and reduces serum lipids in men. *J Nutr*. 1993;123:1047–1053.
68. Boon N, Hul GB, Stegen JH, et al. An intervention study of the effects of calcium intake on faecal fat excretion, energy metabolism and adipose tissue mRNA expression of lipid-metabolism related proteins. *Int J Obes (Lond)*. 2007;31:1704–1712.
69. Jacobsen R, Lorenzen JK, Toubro S, et al. Effect of short-term high dietary calcium intake on 24-h energy expenditure, fat oxidation, and fecal fat excretion. *Int J Obes (Lond)*. 2005;29:292–301.
70. Bendsen NT, Hother AL, Jensen SK, et al. Effect of dairy calcium on fecal fat excretion: a randomized crossover trial. *Int J Obes (Lond)*. 2008;32:1816–1824.
71. Christensen R, Lorenzen JK, Svith CR, et al. Effect of calcium from dairy and dietary supplements on faecal fat excretion: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Obes Rev*. 2009;10:475–486.
72. Hill JO, Wyatt HR, Reed GW, et al. Obesity and the environment: where do we go from here? *Science*. 2003;299:853–855.
73. Yuangklang C, Wensing T, Lankhorst A, et al. Cholate and deoxycholate counteract the calcium-induced lowering of fat digestion in rats. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)*. 2005;89:337–341.
74. Gilbert JA, Joannise DR, Chaput JP, et al. Milk supplementation facilitates appetite control in obese women during weight loss: a randomised, single-blind, placebo-controlled trial. *Br J Nutr*. 2011;105:133–143.
75. Ping-Delfos WC, Soares M. Diet induced thermogenesis, fat oxidation and food intake following sequential meals: influence of calcium and vitamin D. *Clin Nutr*. 2011;30:376–383.
76. Lorenzen JK, Nielsen S, Holst JJ, et al. Effect of dairy calcium or supplementary calcium intake on postprandial fat metabolism, appetite, and subsequent energy intake. *Am J Clin Nutr*. 2007;85:678–687.
77. Tordoff MG. Calcium: taste, intake, and appetite. *Physiol Rev*. 2001;81:1567–1597.
78. Hall WL, Millward DJ, Long SJ, et al. Casein and whey exert different effects on plasma amino acid profiles, gastrointestinal hormone secretion and appetite. *Br J Nutr*. 2003;89:239–248.
79. Xue B, Greenberg AG, Kraemer FB, et al. Mechanism of intracellular calcium ([Ca²⁺]_i) inhibition of lipolysis in human adipocytes. *FASEB J*. 2001;15:2527–2529.
80. Melanson EL, Sharp TA, Schneider J, et al. Relation between calcium intake and fat oxidation in adult humans. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 2003;27:196–203.
81. Melanson EL, Donahoo WT, Dong F, et al. Effect of low- and high-calcium dairy-based diets on macronutrient oxidation in humans. *Obes Res*. 2005;13:2102–2112.
82. Gonzalez JT, Rumbold PL, Stevenson EJ. Effect of calcium intake on fat oxidation in adults: a meta-analysis of randomized, controlled trials. *Obes Rev*. 2012;13:848–857.
83. Fruhbeck G, Gomez-Ambrosi J, Muruzabal FJ, et al. The adipocyte: a model for integration of endocrine and metabolic signaling in energy metabolism regulation. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2001;280:E827–E847.
84. Schaffler A, Scholmerich J. Innate immunity and adipose tissue biology. *Trends Immunol*. 2010;31:228–235.
85. Ouchi N, Parker JL, Lugus JJ, et al. Adipokines in inflammation and metabolic disease. *Nat Rev Immunol*. 2011;11:85–97.
86. Kloting N, Fasshauer M, Dietrich A, et al. Insulin-sensitive obesity. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2010;299:E506–E515.
87. Lind L, Carlstedt F, Rastad J, et al. Hypocalcemia and parathyroid hormone secretion in critically ill patients. *Crit Care Med*. 2000;28:93–99.
88. Panagiotakos DB, Pitsavos CH, Zampelas AD, et al. Dairy products consumption is associated with decreased levels of inflammatory markers related to cardiovascular disease in apparently healthy adults: the ATTICA study. *J Am Coll Nutr*. 2011;29:357–364.
89. Sun X, Zemel MB. Calcium and 1,25-dihydroxyvitamin D₃ regulation of adipokine expression. *Obesity (Silver Spring)*. 2007;15:340–348.
90. Zemel MB, Sun X, Sobhani T, et al. Effects of dairy compared with soy on oxidative and inflammatory stress in overweight and obese subjects. *Am J Clin Nutr*. 2010;91:16–22.
91. Brown EM, Gamba G, Riccardi D, et al. Cloning and characterization of an extracellular Ca²⁺-sensing receptor from bovine parathyroid. *Nature*. 1993;366:575–580.
92. Armato U. The calcium-sensing receptor: pathophysiology and pharmacological modulation. *Curr Pharm Biotechnol*. 2009;10:268–269.
93. Cifuentes M, Albala C, Rojas C. Calcium-sensing receptor expression in human adipocytes. *Endocrinology*. 2005;146:2176–2179.
94. Breitwieser GE. Minireview: the intimate link between calcium sensing receptor trafficking and signaling: implications for disorders of calcium homeostasis. *Mol Endocrinol*. 2012;26:1482–1495.
95. Canaff L, Hendy GN. Calcium-sensing receptor gene transcription is up-regulated by the proinflammatory cytokine, interleukin-1 β . Role of the NF- κ B pathway and κ B elements. *J Biol Chem*. 2005;280:14177–14188.
96. Cifuentes M, Fuentes C, Mattar P, et al. Obesity-associated proinflammatory cytokines increase calcium sensing receptor (CaSR) protein expression in primary human adipocytes and LS14 human adipose cell line. *Arch Biochem Biophys*. 2010;500:151–156.
97. Cifuentes M, Fuentes C, Tobar N, et al. Calcium sensing receptor activation elevates proinflammatory factor expression in human adipose cells and adipose tissue. *Mol Cell Endocrinol*. 2012;361:24–30.
98. Hultin H, Edfeldt K, Sundbom M, et al. Left-shifted relation between calcium and parathyroid hormone in obesity. *J Clin Endocrinol Metab*. 2010;95:3973–3981.
99. He Y, Perry B, Bi M, et al. Allosteric regulation of the calcium-sensing receptor in obese individuals. *Int J Mol Med*. 2013;32:511–518.
100. Nemeth EF, Shoback D. Calcimimetic and calcilytic drugs for treating bone and mineral-related disorders. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2013;27:373–384.
101. Nakagawa K, Perez EC, Oh J, et al. Cinacalcet does not affect longitudinal growth but increases body weight gain in experimental uraemia. *Nephrol Dial Transplant*. 2008;23:2761–2767.
102. Cifuentes M, Albala C, Rojas CV. Differences in lipogenesis and lipolysis in obese and non-obese adult human adipocytes. *Biol Res*. 2008;41:197–204.
103. He Y, Zhang H, Teng J, et al. Involvement of calcium-sensing receptor in inhibition of lipolysis through intracellular cAMP and calcium pathways in human adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011;404:393–399.
104. He YH, He Y, Liao XL, et al. The calcium-sensing receptor promotes adipocyte differentiation and adipogenesis through PPAR γ pathway. *Mol Cell Biochem*. 2012;361:321–328.
105. Brown AJ, Zhong M, Finch J, et al. Rat calcium-sensing receptor is regulated by vitamin D but not by calcium. *Am J Physiol*. 1996;270(3 Pt 2):F454–F460.
106. Canaff L, Hendy GN. Human calcium-sensing receptor gene. Vitamin D response elements in promoters P1 and P2 confer transcriptional responsiveness to 1,25-dihydroxyvitamin D. *J Biol Chem*. 2002;277:30337–30350.

Adipogenic effect of calcium sensing receptor activation

Pia Villarroel · Marcela Reyes · Cecilia Fuentes · María Pia Segovia ·
Nicolás Tobar · Elisa Villalobos · Jorge Martínez · Eric Hugo ·
Nira Ben-Jonathan · Mariana Cifuentes

Received: 26 June 2013 / Accepted: 23 August 2013 / Published online: 5 September 2013
© Springer Science+Business Media New York 2013

Abstract We established that human adipose cells and the human adipose cell line LS14 express the calcium-sensing receptor (CaSR) and that its activation induces inflammatory cytokine production. Also, its expression is enhanced upon exposure to obesity-associated proinflammatory cytokines. We have thus proposed that CaSR activation may be associated with adipose dysfunction. Here, we evaluated a possible effect on adipogenesis. We induced adipose differentiation of primary and LS14 human preadipocytes with or without the simultaneous activation of CaSR, by the exposure to the calcimimetic cinacalcet. Activation of the receptor for 24 h decreased by 40 % the early differentiation marker CCAAT/enhancer-binding protein β . However, upon longer-term (10 day) exposure to the adipogenic cocktail, cinacalcet exerted the opposite effect, causing a dose–response increase in the expression of the mature adipose markers adipocyte protein 2, adiponectin, peroxisome proliferator-activated receptor γ , fatty acid synthase, and glycerol-3-phosphate dehydrogenase. To assess whether there was a time-sensitive effect of CaSR activation on adipogenesis, we evaluated the 10 day effect of cinacalcet exposure for the first 6, 24, 48 h, 6, and 10 days. Our observations suggest that regardless of the period of exposure, 10 day adipogenesis is elevated by cinacalcet. CaSR activation may interfere

with the initial stages of adipocyte differentiation; however, these events do not seem to preclude adipogenesis from continuing. Even though adipogenesis (particularly in subcutaneous depots) is associated with insulin sensitivity and adequate adipose function, the implications of our findings in visceral adipocytes, especially in the context of inflamed AT and overnutrition, remain to be established.

Keywords Calcium sensing receptor · Adipogenesis · Adipose differentiation · Adipocyte

Abbreviations

aP2	Adipocyte protein 2
CaSR	Calcium sensing receptor
CEBP β	CCAAT/enhancer-binding protein β
FASN	Fatty acid synthase
GPD	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase
LPL	Lipoprotein lipase
PPAR γ	Peroxisome proliferator-activated receptor γ
TBS	Tris-buffered saline

Introduction

Research in recent years has underscored the relevance of adipose tissue expandability to maintain a functionally healthy adipose tissue [1]. Preadipocyte differentiation into mature adipocytes is key for this process. Dysfunctional adipogenesis may be one of the consequences of a proinflammatory environment in adipose tissue, which has been extensively associated with obesity and its cardiometabolic consequences [2, 3].

Adipocyte differentiation is a complex sequential process influenced by a vast number of factors [4, 5]. The

P. Villarroel · M. Reyes · C. Fuentes · M. P. Segovia · N. Tobar ·
E. Villalobos · J. Martínez · M. Cifuentes (✉)
Institute of Nutrition and Food Technology (INTA), Universidad de
Chile, El Líbano 5524, Macul, 138-11 Casilla, Santiago, Chile
e-mail: mcifuentes@inta.uchile.cl

E. Hugo · N. Ben-Jonathan
Department of Cancer and Cell Biology, College of Medicine,
University of Cincinnati, 3125 Eden Avenue, Cincinnati,
OH 45267-0521, USA

current model describes a transcriptional cascade that involves the activation of the transcription factors peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ) and CCAAT/enhancer-binding protein alpha (CEBP α) by CEBP β . In turn, these factors signal the transcription of RNA encoding for adipose-specific proteins, such as adipocyte protein (aP2), lipoprotein lipase (LPL), and fatty acid synthase (FASN). Adipocytes then use glucose and fatty acids to accumulate triglycerides, being the enzyme glycerol 3 phosphate dehydrogenase (GPD) crucial for this process, and produce a large number of adipokines, such as adiponectin.

Our previous work has established that the G protein-coupled calcium-sensing receptor (CaSR) in adipose tissue is associated with an elevation in inflammatory factors [6, 7]. Given the association of inflammation and adipogenesis, and the relevance of the latter to overall adipose functionality, we sought to evaluate the effect of CaSR stimulation on adipose differentiations in the human adipose cell line LS14 and in preadipocytes derived from human visceral adipose tissue. To evaluate this effect, we assessed the content of the early adipogenic transcription factor CEBP β and the markers of longer-term adipogenesis (up to 10 days) aP2, adiponectin, PPAR γ , LPL, FASN, and GPD.

Materials and methods

LS14 cell line culture and differentiation

Our studies used the preadipose cell line LS14, derived from a human metastatic liposarcoma, which can differentiate into lipid-laden adipocytes that express mature adipocyte genes [8, 9]. Preadipose LS14 cells were seeded on plastic culture dishes (Nunc, Rochester, NY) and grown in DMEM/Ham's F-12 (1:1) medium (Sigma) supplemented with 10 % fetal bovine serum and antibiotics (penicillin–streptomycin) at 37 °C in a controlled atmosphere incubator. For adipogenic differentiation, cells were seeded at a density of 35,000 cells/cm², serum-starved

overnight and cultured in the same medium (serum-free), supplemented with the adipogenic cocktail consisting of 0.5 mM 3-isobutyl-1-methylxanthine (Sigma, St Louis, MO), 1.7 μ M insulin (Eli Lilly & Co., SA de CV, Mexico) and 0.25 μ M dexamethasone (Sigma). For the experiments, cells were exposed to cinacalcet (or vehicle) 30 min before initiating adipose differentiation and throughout the differentiation process. The medium was replaced every 2–3 days.

Isolation, culture, and differentiation of human preadipocytes

Human omental fat was obtained from ten subjects (80 % female) undergoing elective abdominal surgery, with a mean \pm SD body mass index of 33.8 \pm 8.2 kg/m² and aged 45 \pm 10 years. Informed consent was signed by the donors, and the protocol was approved by the Institutional Review Board at INTA, University of Chile and the Health Service of Santiago. The tissue was washed with Hanks Balanced Salt Solution, cleaned and minced into small pieces (2–3 mm²). Adipose cells were isolated using a method based on Rodbell [10], by incubation of the tissue with 1 g/l collagenase type I (Worthington Biochemical Corp. Lakewood, NJ, USA) at 37 °C for 60 min with continuous mixing. The resulting cell suspension was filtered through sterile gauze, and floating adipocytes were removed. The remaining digest was centrifuged at 800 \times g for 10 min, and the cell pellet was resuspended and seeded in the same medium as for LS14 cells. At passages 3–4, cells were seeded and exposed to the differentiation cocktail.

Isolation of total RNA, Reverse Transcription, and qPCR analysis

Cultured adipocytes were lysed with Trizol[®] reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA) for total RNA isolation. RNA was extracted using the PureLink[™] RNA Mini Kit (Invitrogen) according to the manufacturer's indications, and DNA contamination was eliminated using the RNase-

Table 1 Forward and reverse primer sequences for real time PCR

Target mRNA	Accession	Forward Primer (5' \rightarrow 3')	Reverse primer (5' \rightarrow 3')
aP2	NM_001442	TGCAGCTTCCTTCTCACCTTGA	TCCTGGCCCAGTATGAAGGAAATC
Adiponectin	NM_004797	AGGGTGAGAAAGGAGATCCAG	GGGCATGTTGGGGATAGTAA
LPL	NM_000237	GCAGAAAGGAAAGGCACCTGCG	GTTGGAGGATGTGCTATTTGGC
PPAR γ	NM_015869	AGCAAAGGCGAGGGCGATCTTG	GGATGGCCACCTCTTTGCTCTGC
FASN	NM_004104	GGAAGCTGCCAGAGTCGGAGAACT	TGAGGGTCCATCGTGTGTGCTC
GPD	NM_005276	GGCTGAGGCCTTTGCGCGTA	ACTGGCTGGCCCTCGTAGCA
GAPDH ^a	NM_002046	GAAGGTGAAGGTCGGAGTCAAC	CAGAGTTAAAAGCAGCCCTGGT

^a housekeeping control

Free DNase set (Qiagen, Germany). Reverse transcription was performed using the high-Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems, Carlsbad, CA). The mRNA expression was evaluated using a Step-one Real-time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) using the SYBR[®] FAST qPCR Kit (Applied Biosystems). The thermal-cycling conditions consisted of a 20-s preincubation at 95 °C followed by 40 cycles at 95 °C for 3 s and 60 °C for 30 s. The results are normalized by the housekeeping gene GAPDH, and the expression was calculated using the Pfaffl model [11]. Sequences for PCR primers are depicted on Table 1.

Western blot analysis

Cells were homogenized at 4 °C in lysis buffer (50 mM HEPES, pH 7.4, 150 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, 2 mM EGTA, 1 % Triton X-100, 10 % glycerol) supplemented with 1 mM sodium orthovanadate (Sigma), 1.5 μM pepstatin (Sigma) and Complete[®] protease inhibitors (Roche, Mannheim) using a rubber policeman directly on the culture dish. Protein concentration of the lysate was determined by a method based on bicinchoninic acid (Pierce, Rockford IL). 15–100 μg of protein was heat denatured in SDS-PAGE loading buffer (240 mM Tris-HCl, pH 6.8, 8 % SDS, and 40 % glycerol, 20 % 2-mercaptoethanol). Proteins were electrophoresed on 10 % polyacrylamide gels and electrotransferred to polyvinylidene difluoride membranes using a buffer that contains 24 mM Tris, 194 mM glycine, and 10 % methanol. The immunoreaction was achieved by incubation of the membranes, previously blocked with a solution containing 5 % BSA in Tris-buffered saline (TBS) with 0.05 % Tween 20 (Sigma, St Louis, MO), with a rabbit antihuman CEBPβ polyclonal

antibody (Cell Signaling Technology, Danvers, MA) diluted 1:1000 in 3 % BSA in TBS supplemented with 0.05 % Tween 20. Detection of the immune complexes was performed with a horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) followed by an incubation with the enzyme substrates (ECL, Amersham Biosciences, Piscataway NJ) and exposure to chemiluminescent sensitive films.

Statistical analysis

To compare parameters between controls and treated cells, variables were evaluated using Wilcoxon signed rank test and Friedman Test with Dunn's multiple comparisons when appropriate. Data are shown in the figures as mean ± SEM, and a *p* value less than 0.05 was considered significant.

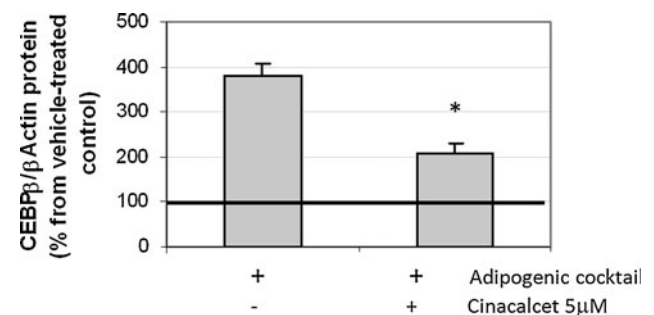


Fig. 2 CaSR activation inhibits the expression of the early adipogenic marker CEBPβ. LS14 preadipocytes exposed to the adipogenic cocktail for 24 h were pretreated with 5 μM cinacalcet or vehicle. Values are normalized for the control preadipocytes (100 %) not subjected to the differentiation conditions. * *p* < 0.005 versus vehicle-treated cells; Wilcoxon signed rank test, *n* = 9 experiments

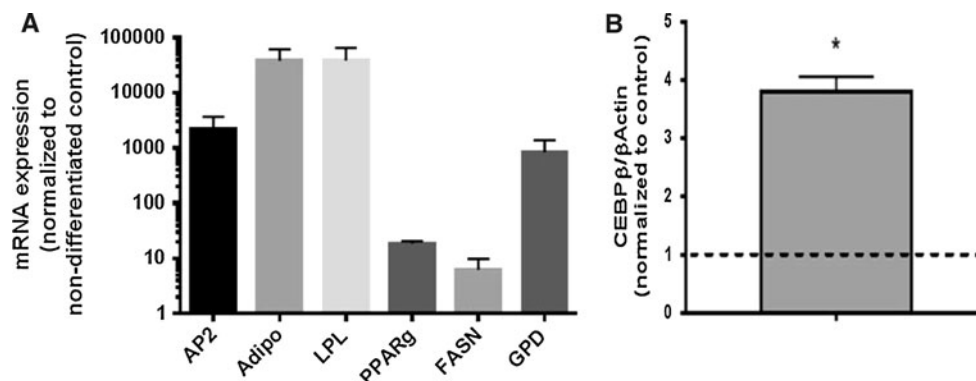


Fig. 1 Differentiation in LS14 cells. **a** Mature adipocyte marker gene expression after 10 days of exposure to adipogenic stimulus. Bars depict qPCR results from six independent experiments showing the gene expression of mature adipocyte markers. GAPDH was utilized as the internal control; *p* < 0.0001 for all genes as compared with the non differentiated control. Given the differences in the magnitude of

response between the different genes, the data are expressed in logarithmic scale. **b** CEBPβ protein expression after 24 h of exposure to the differentiation cocktail, data obtained from the analysis of immunoblots from nine independent experiments. * *p* < 0.005, Wilcoxon signed rank test. All bars represent mean ± SEM

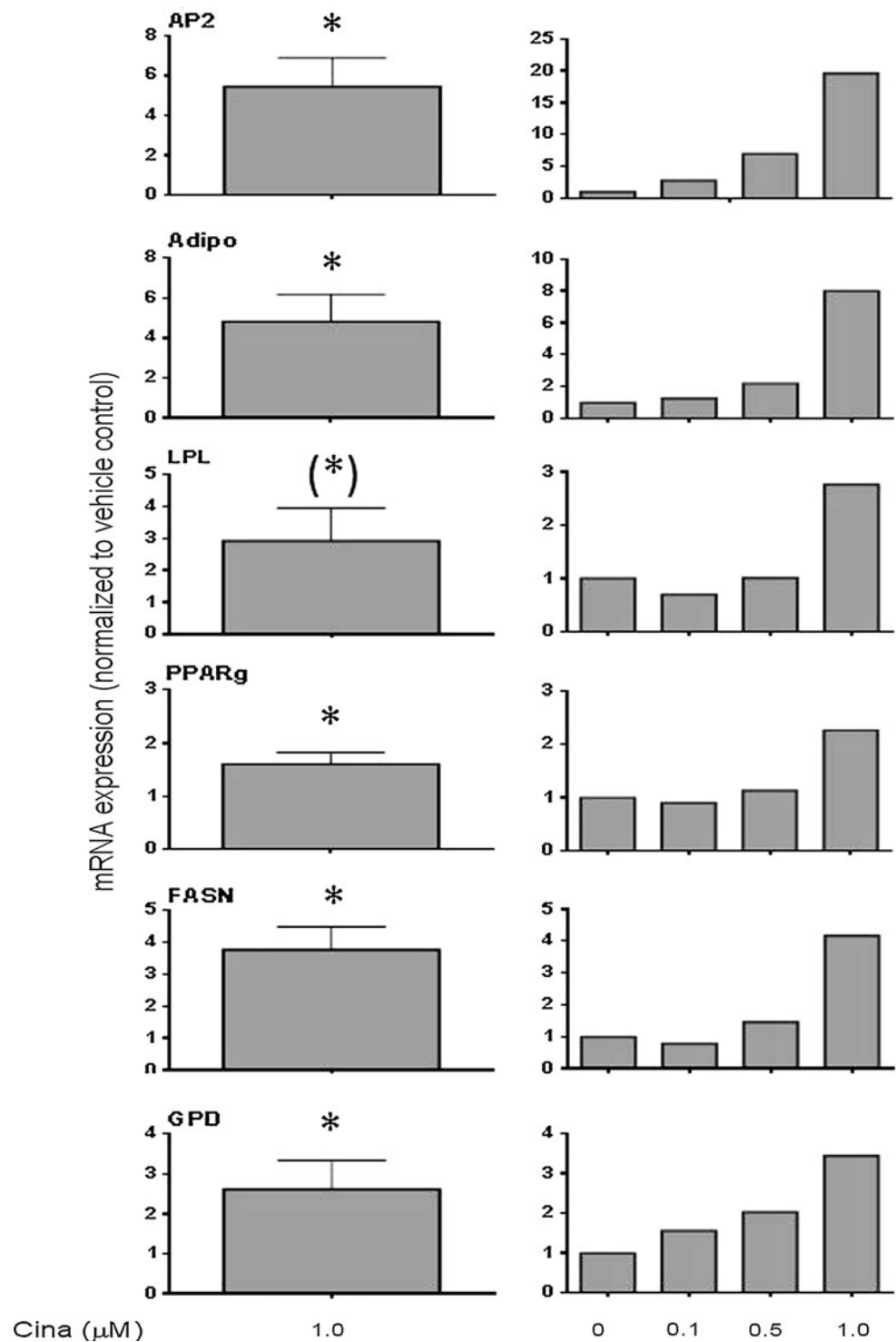
Results and discussion

Assessment of adipogenesis

Adipose differentiation could be visually assessed by observing under the microscope the change in shape (from fibroblast-like to round-shaped) as well as the presence of

cytoplasmic lipid droplets. As shown in Fig. 1a, the increased triglyceride content coincided with the expression of the mRNA encoding for aP2, adiponectin, LPL, PPAR γ , FASN, and GPD. Since cells that had not been exposed to the differentiation stimulus show little or no presence of the transcripts, these were considered good indicators for the adipocyte differentiation process. In

Fig. 3 Expression of adipogenic gene markers in LS14 cells after 10 days of differentiation exposed to 1 μ M cinacalcet, normalized to 1, representing the vehicle-exposed control. Bars represent mean \pm SEM, * $p < 0.05$, (*) $p = 0.09$, Wilcoxon signed rank test, $n = 6$ –7 independent experiments performed in duplicate. The panel on the right shows the respective dose-response curve to cinacalcet for each gene



addition to these differentiation markers representing mature adipocyte proteins, we also evaluated the effect of the activation of the receptor on the adipogenic process using the early adipogenic transcription factor CEBP β , which shows increased protein levels at 24 h of exposure to the adipogenic cocktail (Fig 1b).

Activation of CaSR decreases the early adipogenic marker CEBP β in LS14 cells

We evaluated the effect of exposure of preadipose cells to the CaSR agonist cinacalcet on an early event in adipogenesis. Figure 2 shows the effect of cinacalcet on the levels of the early differentiation marker CEBP β . After 24 h of induction of differentiation, CEBP β protein levels were decreased by 46 % when CaSR was activated simultaneously with the exposure to the differentiation cocktail.

Cinacalcet effects in longer-term adipogenesis

We evaluated the effect of cinacalcet after 10 days of exposure to the differentiation cocktail in LS14 cells. As observed in Fig. 3, 10-day-exposure to cinacalcet under differentiating conditions elevates the expression of the adipogenic markers aP2, adiponectin, PPAR γ , FASN, y GPD. A trend toward the same effect ($p = 0.09$) was observed for LPL. The 1 μ M dose of cinacalcet was chosen after dose–response experiments (Fig. 3, right panel), where the greatest effect was obtained with this concentration, whereas greater doses (2.5 and 5 μ M) caused cell detachment after 10 days of culture. Exposure to the 1 μ M dose in control cells (without the adipogenic cocktail) showed no effect on the parameters evaluated (data not shown). The dose–response curve strongly supports that cinacalcet is responsible for the effect elevating adipogenic markers. The adipogenic effect of cinacalcet was then verified in human primary preadipocytes (Fig. 4).

Acute versus chronic exposure to cinacalcet

Given the apparently contradicting effects of cinacalcet in early and late adipogenesis, we evaluated the effect of cinacalcet pulses (first 6 h and first 24 h of differentiation) and continuous exposure (during the first 6 day or the entire 10 days of differentiation) on the expression of late differentiation markers after the 10 days of the differentiation process. The results suggest that the short-term inhibition we observed for CEBP β production has no long-term effect on adipogenesis compared with vehicle-treated differentiated cells, as evaluated by mRNA expression of mature adipocyte markers. Figure 5 shows that GPD, aP2, PPAR γ , and LPL expressions after 10 days of

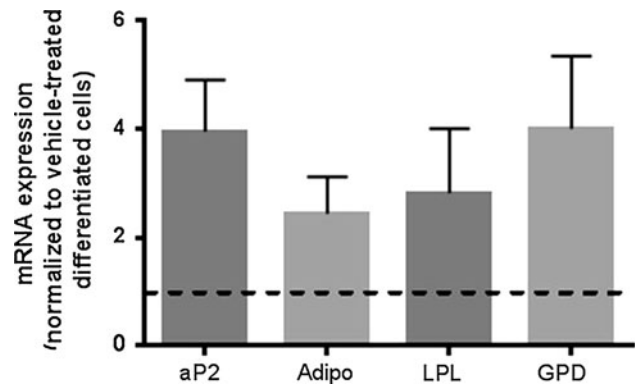


Fig. 4 Expression of adipogenic gene markers in human adipose tissue-derived preadipocytes after 10 days of differentiation and exposed to 1 μ M cinacalcet, normalized for the vehicle-exposed differentiated control (1, dotted line). Bars represent mean \pm SEM, $p < 0.0001$ for each gene versus its control, Wilcoxon signed rank test, $n = 10$ subjects, experiments performed in duplicate

differentiation increased with 24 h of cinacalcet exposure. In these experiments, the 10-days expression decreased with continuous (10 days) cinacalcet treatment (as compared to 6 days); therefore, the results are shown up to 6 days cinacalcet. It is possible that these time-course experiments evidenced cell detachment in long-term exposure due to excess lipid accumulation, and therefore at day 10, we are left with less fully differentiated adipocytes, thus showing a decrease in total marker expression.

Our results are consistent with those of He et al. [12] who observed an adipogenic effect of CaSR stimulation (with GdCl $_3$) in the SW872 cell line, using a different adipogenic protocol (oleic acid) and evaluating the results at 72 h. We could confirm these findings at up to 10 days in LS14 cells and human omental primary adipocytes and using the calcimimetic cinacalcet to activate the CaSR. Our observations of the content of the early differentiation CEBP β suggest that CaSR activation may interfere with the initial stages of adipocyte differentiation; however, these events do not seem to preclude adipogenesis from continuing. Noteworthy, the role of CEBP β has been well described in murine adipose cell models, particularly mediating mitotic clonal expansion as a prerequisite for adipogenesis [5]. However, studies comparing murine and human adipose progenitor cells have established that the mechanisms involved in adipogenesis differ between species, and human mesenchymal stem cells do not undergo mitotic clonal expansion [13]. The exact role of CEBP β and other factors in human adipogenesis remain to be established, it being possible that the relevance of CEBP β during human adipocyte differentiation relates to its post-translational modification (e.g. phosphorylation) as and not its expression levels [5, 13]. Lastly, given the numerous factors that control adipogenesis, the CaSR-inhibitory

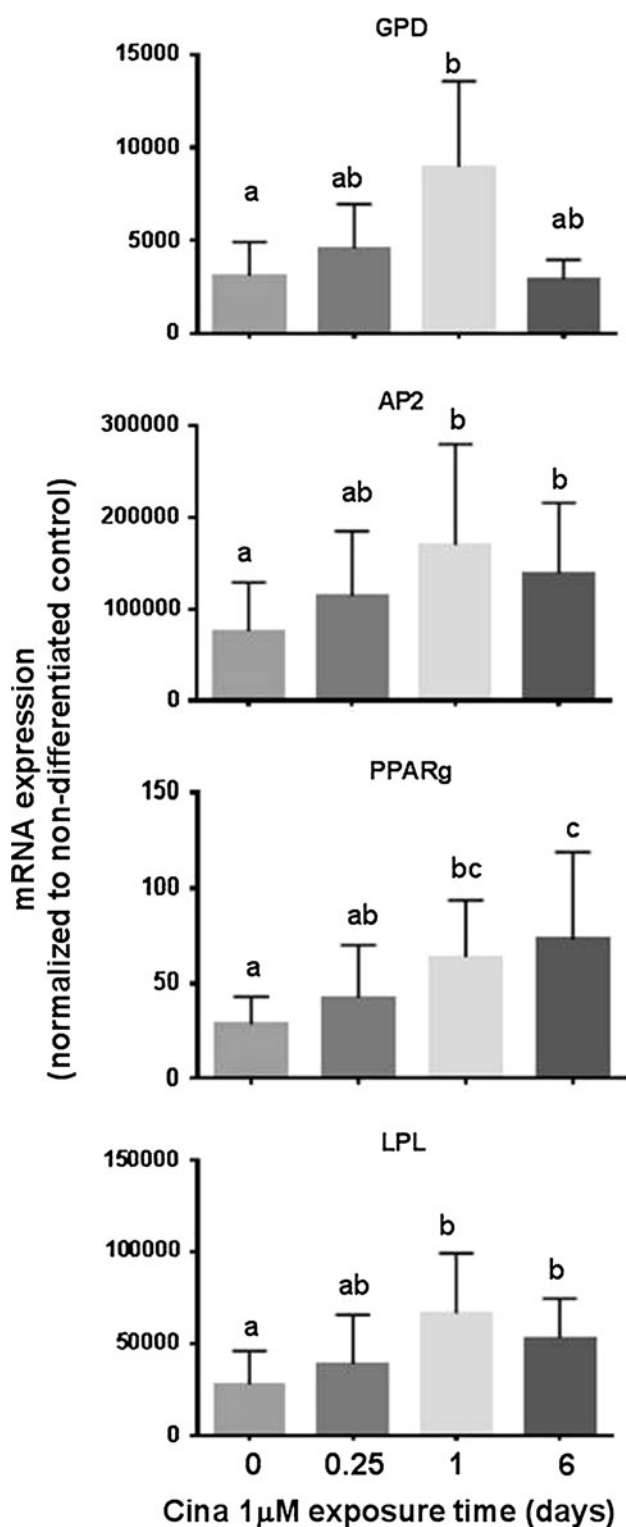


Fig. 5 Expression of adipogenic markers in LS14 cells at 10 days of differentiation after 1 μ M cinacalcet exposure for the time indicated, and normalized for non differentiated controls (1). Bars represent mean \pm SEM, and different letters depict significant differences ($p < 0.05$), Friedman Test and Dunn's multiple comparison; $n = 7$ independent experiments

effect on this early marker may be overridden by a number of other events to have a net positive longer-term effect.

The process of adipogenesis is of great relevance to maintain a functional adipose tissue, capable of properly handling eventual excess fat inputs that otherwise would overflow onto non adipocytes, damaging other organs and leading to the metabolic and cardiovascular consequences of obesity [14]. However, these favorable effects of proper fat expansion have focused mainly on the benefits of subcutaneous and not visceral fat expansibility. Our current and previous studies of CaSR stimulation suggest that this protein may be a relevant factor contributing to perpetuating an inflammatory environment within visceral adipose tissue [6, 7], which together with an adipogenic stimulus may favor the deleterious cardiovascular and metabolic effects of central fat accumulation.

Conclusion

We evaluated the effect of exposure to the calcimimetic cinacalcet on adipogenesis in the human adipocyte cell line LS14, and our observations were confirmed in primary human omental adipose cells. Our findings show that CaSR activation is associated with an elevation in the expression of mature adipocyte markers after 10 days of adipogenic stimulus. Even though adipogenesis is associated with insulin sensitivity and adequate adipose function, its enhancement, particularly in visceral adipocytes, may have pathogenic implications, especially in the context of inflamed AT and overnutrition.

Acknowledgments The authors thank Dr. Leonardo Rodríguez and Ms. Patricia Rodríguez at INDISA Hospital for the invaluable help in obtaining fat tissue. This research was funded by Fondo Nacional de Desarrollo Científico y Tecnológico (FONDECYT) grants to M.C.; 1080232 and 1110157.

References

- Virtue S, Vidal-Puig A (2010) Adipose tissue expandability, lipotoxicity and the metabolic syndrome—an allostatic perspective. *Biochim Biophys Acta* 1801(3):338–349. doi:10.1016/j.bbali.2009.12.006 S1388-1981(09)00286-8 [pii]
- Ye J, Gimble JM (2011) Regulation of stem cell differentiation in adipose tissue by chronic inflammation. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 38(12):872–878. doi:10.1111/j.1440-1681.2011.05596.x
- Gustafson B, Gogg S, Hedjazifar S, Jenndahl L, Hammarstedt A, Smith U (2009) Inflammation and impaired adipogenesis in hypertrophic obesity in man. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 297(5):E999–E1003. doi:10.1152/ajpendo.00377.2009
- Cristancho AG, Lazar MA (2011) Forming functional fat: a growing understanding of adipocyte differentiation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 12(11):722–734. doi:10.1038/nrm3198

5. Tang QQ, Lane MD (2012) Adipogenesis: from stem cell to adipocyte. *Annu Rev Biochem* 81:715–736. doi:[10.1146/annurev-biochem-052110-115718](https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-052110-115718)
6. Cifuentes M, Fuentes C, Mattar P, Tobar N, Hugo E, Ben-Jonathan N, Rojas C, Martinez J (2010) Obesity-associated proinflammatory cytokines increase calcium sensing receptor (CaSR) protein expression in primary human adipocytes and LS14 human adipose cell line. *Arch Biochem Biophys* 500(2):151–156. doi:[10.1016/j.abb.2010.05.033](https://doi.org/10.1016/j.abb.2010.05.033) S0003-9861(10)00219-5 [pii]
7. Cifuentes M, Fuentes C, Tobar N, Acevedo I, Villalobos E, Hugo E, Ben-Jonathan N, Reyes M (2012) Calcium sensing receptor activation elevates proinflammatory factor expression in human adipose cells and adipose tissue. *Mol Cell Endocrinol* 361(1–2):24–30. doi:[10.1016/j.mce.2012.03.006](https://doi.org/10.1016/j.mce.2012.03.006) S0303-7207(12)00169-4 [pii]
8. LaPensee CR, Hugo ER, Ben-Jonathan N (2008) Insulin stimulates interleukin-6 expression and release in LS14 human adipocytes through multiple signaling pathways. *Endocrinology* 149(11):5415–5422. doi:[10.1210/en.2008-0549](https://doi.org/10.1210/en.2008-0549) en.2008-0549 [pii]
9. Hugo ER, Brandebourg TD, Comstock CE, Gersin KS, Sussman JJ, Ben-Jonathan N (2006) LS14: a novel human adipocyte cell line that produces prolactin. *Endocrinology* 147(1):306–313. doi:[10.1210/en.2005-0989](https://doi.org/10.1210/en.2005-0989) en.2005-0989 [pii]
10. Rodbell M (1964) Metabolism of isolated fat cells. I. Effects of hormones on glucose metabolism and lipolysis. *J Biol Chem* 239:375–380
11. Pfaffl MW (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29(9):e45
12. He YH, He Y, Liao XL, Niu YC, Wang G, Zhao C, Wang L, Tian MJ, Li Y, Sun CH (2012) The calcium-sensing receptor promotes adipocyte differentiation and adipogenesis through PPARgamma pathway. *Mol Cell Biochem* 361(1–2):321–328. doi:[10.1007/s11010-011-1118-5](https://doi.org/10.1007/s11010-011-1118-5)
13. Qian SW, Li X, Zhang YY, Huang HY, Liu Y, Sun X, Tang QQ (2010) Characterization of adipocyte differentiation from human mesenchymal stem cells in bone marrow. *BMC Dev Biol* 10:47. doi:[10.1186/1471-213X-10-47](https://doi.org/10.1186/1471-213X-10-47) 1471-213X-10-47 [pii]
14. Smith U, Hammarstedt A (2010) Antagonistic effects of thiazolidinediones and cytokines in lipotoxicity. *Biochim Biophys Acta* 1801(3):377–380. doi:[10.1016/j.bbalip.2009.11.006](https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2009.11.006) S1388-1981(09)00278-9 [pii]