

UCH-FC
Biotecnología
A 189
C.L

FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE

**CARACTERIZACIÓN DE CÉLULAS PRECURSORAS DE ADIPOCITOS HUMANOS:
PROLIFERACIÓN, ADIPOGÉNESIS Y EXPRESIÓN DEL FACTOR DE NECROSIS TUMORAL
 α DE MEMBRANA (mTNF- α)**

Memoria de Título
Entregada a la
Universidad de Chile
en cumplimiento parcial de los requisitos
para optar al Título de
Ingeniero en Biotecnología Molecular

Por
María José Acuña Díaz-Tendero

Julio, 2006
Santiago - Chile

Director de Memoria de Título: Dra. Mireya Fernández



**“Caracterización de Células Precursoras de Adipocitos Humanos:
Proliferación, Adipogénesis y Expresión del Factor de Necrosis
Tumoral α (alfa) de Membrana (m TNF- α)”**

Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular.

MARÍA JOSÉ ACUÑA DIAZ-TENDERO

Dra. Mireya Fernández Gálvez
Directora Seminario de Título

Firma manuscrita de Dra. Mireya Fernández Gálvez sobre una línea horizontal.

Comisión Revisora

Dr. Marco Tulio Nuñez González
Presidente

Firma manuscrita de Dr. Marco Tulio Nuñez González sobre una línea horizontal.

Dr. Christian González- Billault
Corrector

Firma manuscrita de Dr. Christian González- Billault sobre una línea horizontal.

Dra. Cecilia Vergara
Patrocinante

Una línea horizontal para la firma de Dra. Cecilia Vergara.

Santiago, Agosto 16 de 2006

*A mis papás y mi
hermana...*

Autobiografía



Nací en Santiago de Chile el 13 de mayo de 1981, una de las mellizas de la familia Acuña Díaz-Tendero. Crecí en una familia cuyos intereses son la literatura y las Ciencias Sociales; sin embargo, mis intereses fueron cambiando de rumbo y me enamoré de las Ciencias Naturales y en especial de la Biología. Es así como en el liceo elegí biología como especialidad. Luego llegó el tiempo de decidir o al menos tener una idea acerca de qué estudiar...así fue como conocí la carrera de Ingeniería en Biotecnología Molecular de la Universidad de Chile; una vez dentro de la carrera conocí personas muy interesantes y acogedoras por decir lo menos y además con intereses científicos como yo, que en casa soy llamada "científica loca" por que poco o nada es lo que me entienden cuando les cuento acerca de mis estudios. Mi paso por la Facultad de Ciencias me trajo un sinfín de satisfacciones en el ámbito académico y social, así como también me creó inquietudes para seguir mi camino en la investigación científica, esperando ser lo mejor posible tal como se espera de un profesional de la Universidad de Chile.

Agradecimientos

Le agradezco a mi familia porque a pesar de no entenderme me apoyaron siempre.

A mis amigos, Andrea L, Andrea F, Juanu, Seba, Pablo, Daniell, cuyo apoyo fue fundamental, cuando estaba cansada me daban ánimos para seguir.

A mi directora de Tesis la "profe" Mireya Fernández que me guió en el desarrollo de esta tesis y con la que aprendí mucho. También agradezco a mi codirectora de tesis la Dra. María Pía de la Maza por sus comentarios y ayuda. A la profesora Cecilia Rojas por preocuparse de leer mi tesis y darme una visión más objetiva.

A mis compañeros en el laboratorio de Biología Celular del INTA, gracias por su ayuda, por su compañía diaria y buena onda conmigo.

INDICE DE CONTENIDOS

Contenidos	Página
ABREVIATURAS	viii
RESUMEN	ix
ABSTRACT	xi
INTRODUCCIÓN	1
HIPÓTESIS	11
OBJETIVOS GENERALES Y ESPECÍFICOS	11
MATERIALES	12
MÉTODOS	16
RESULTADOS	24
I. PROLIFERACIÓN DE CÉLULAS PRECURSORAS DE ADIPOCITOS (CPA): COMPARACIÓN ENTRE CPA PROVENIENTES DE TEJIDO ADIPOSO PERIVISCERAL Y SUBCUTÁNEO.	24
II. DIFERENCIACIÓN DE CÉLULAS PRECURSORAS DE ADIPOCITOS: COMPARACIÓN ENTRE CPA PROVENIENTES DE TEJIDO ADIPOSO PERIVISCERAL Y TEJIDO ADIPOSO SUBCUTÁNEO	27
III. EXPRESIÓN DE TNF- α DE MEMBRANA (mTNF- α) EN CPA PROVENIENTES DE TEJIDO ADIPOSO PERIVISCERAL Y TEJIDO ADIPOSO SUBCUTÁNEO	30
a. Las CPA de ambos depósitos grasos expresan mTNF- α	30
b. Efecto de Insulina sobre la expresión de mTNF- α	32
c. Efecto de IL-6 sobre la expresión de mTNF- α	32
d. Modulación de la expresión de mTNF- α durante el proceso de diferenciación de CPA. Efecto de Iiomastat	34
DISCUSIÓN	38
CONCLUSIÓN	45
BIBLIOGRAFÍA	46

INDICE DE TABLAS

	Página
TABLA 1: Resumen de las diferencias entre depósitos grasos de tejido adiposo	7

INDICE DE FIGURAS

	Página
FIGURA 1: Señalización de Insulina en el adipocito	4
FIGURA 2: Tejido adiposo y función secretora	8
FIGURA 3: Velocidad de proliferación de células precursoras de adipocitos de tejido adiposo subcutáneo (Sc) y de tejido adiposo perivisceral (Pv).	25
FIGURA 4: Comparación de la velocidad de proliferación de CPA de pacientes no obesos y obesos.	26
FIGURA 5: Evaluación de la diferenciación de CPA por tinción con Oil Red.	28
FIGURA 6 Cuantificación por citometría de flujo de la acumulación de lípidos en CPA estimuladas a diferenciarse	29
FIGURA 7: Evaluación por inmunofluorescencia de la expresión de mTNF-α en CPA.	30
FIGURA 8: Cuantificación de la expresión de mTNF-α por western blot de lisados de CPA	31
FIGURA 9: Análisis por western blot del efecto de insulina sobre la expresión de mTNF-α.	33
FIGURA 10: Análisis por western blot del efecto de IL-6 sobre la expresión de mTNF-α.	33
FIGURA 11: Evaluación por inmunofluorescencia de la expresión de mTNF-α en CPA estimuladas a diferenciarse.	35
FIGURA 12: Análisis de la expresión de mTNF-α por western blot de lisados de CPA estimuladas a diferenciarse.	35

INDICE DE FIGURAS

FIGURA 13: Análisis por western blot del efecto de Ilomastat sobre la expresión de mTNF-α.	37
FIGURA 14: Análisis por citometría de flujo de la acción de ilomastat en la acumulación de lípidos en CPA-Pv	37
FIGURA 15: Modelo Propuesto	44

ABREVIATURAS

- AGL: Ácidos Grasos Libres
C/EBP: CAAT/Enhancer Binding Protein.
CPA: Células Precursoras de Adipocitos.
CPA-Pv: Células Precursoras de Adipocitos Periviscerales.
CPA-Sc: Células Precursoras de Adipocitos Subcutáneas.
ES: Error Standard.
GLUT: Transportador de glucosa.
HSL: Lipasa sensible a hormonas.
IL-6: Interleuquina 6.
IF: Inmunofluorescencia.
IMC: Índice de Masa Corporal.
IMF: Intensidad Media de Fluorescencia.
IR: Receptor de Insulina.
IRS: Sustrato del Receptor de Insulina.
LPL: Lipoproteína lipasa.
mRNA: ácido ribonucleico mensajero.
mTNF- α : Factor de Necrosis tumoral alfa de Membrana.
PPAR: Peroxisome Proliferator activated receptor.
Pv: Perivisceral.
Sc: Subcutáneo.
sTNF- α : Factor de Necrosis Tumoral alfa Soluble.
TA: Tejido Adiposo.
TAG: Triglicéridos.
TA-Pv: Tejido Adiposo Pervisceral.
TA-Sc: Tejido Adiposo Subcutáneo.
TACE: TNF- α Converting Enzime (ADAM 17)
TNF- α : Factor de Necrosis tumoral alfa.
TNFR: Receptor del Factor de Necrosis Tumoral alfa.
WB: Western Blot.

RESUMEN

Existen diferencias metabólicas entre los depósitos provenientes de tejido adiposo (TA) subcutáneo (Sc) y perivisceral (Pv), lo que se traduce en una expresión diferencial de proteínas y diferente velocidad de adipogénesis.

TNF- α , es sintetizado por el tejido adiposo como una proteína de transmembrana (mTNF- α), que puede ser procesado por metaloproteasas de matriz para dar la forma soluble (sTNF- α). TNF- α participa en una serie de procesos en el TA, entre los cuales cabe mencionar la homeostasis lipídica y resistencia a insulina. Sin embargo, la mayoría de los estudios se han enfocado en la forma soluble, y poco se sabe acerca de las acciones de mTNF- α en el TA.

El objetivo de esta tesis fue caracterizar las células precursoras de adipocitos (CPA) provenientes de tejido adiposo Sc y Pv obtenido de hombres sanos, en cuanto a su capacidad de proliferación y de adipogénesis y estudiar la expresión de mTNF- α en CPA diferenciadas y no diferenciadas y su regulación por señales implicadas en el metabolismo lipídico como insulina e IL-6.

Los resultados obtenidos indican que las CPA-Sc tienen mayor capacidad proliferativa y menor capacidad adipogénica que las CPA-Pv. Las CPA provenientes de ambos depósitos expresan mTNF- α , siendo mayor dicha expresión en CPA-Pv. La expresión de mTNF- α aumentó al estimular las CPA con insulina y disminuyó en CPA-Sc al estimular con IL-6. En ambos tipos de CPA la expresión de mTNF- α aumentó al inducir la diferenciación. Asimismo el tratamiento con un inhibidor de metaloproteasas de matriz incrementó la acumulación de lípidos intracelulares.

Constatamos que la capacidad proliferativa y adipogénica de las CPA depende del depósito graso del que provienen y proponemos que mTNF- α podría ejercer un efecto lipogénico en el tejido adiposo humano, contrario al clásico efecto lipolítico de TNF- α soluble.

ABSTRACT

There are metabolic differences between subcutaneous (Sc) and perivisceral (Pv) adipose tissue (AT) depots, which translates in differential production of proteins and different adipogenic rates

TNF- α , is synthesized by adipose tissue as a transmembrane protein (mTNF- α) and might be processed by matrix metalloproteases, producing its soluble form (sTNF- α). TNF- α participates in a series of processes in AT, being some of them lipid homeostasis and insulin resistance. Nevertheless, most of the studies have focused in the soluble form, so little is known about the actions of mTNF- α in AT.

The objective of this thesis was to characterize adipocyte precursor cells (APC) from Sc and Pv human adipose tissue of healthy men, in terms of its proliferative and adipogenic capacity and to study the expression of mTNF- α in APC differentiated and not differentiated and their regulation by signals implied in lipid metabolism like insulin and IL-6.

We observed that Sc-APC have greater proliferative capacity and less adipogenic capacity than Pv-APC. APC from both depots produce mTNF- α , with greater expression in Pv-APC. mTNF- α expression increased when APC were stimulated with insulin, and decreased in Sc-APC with IL-6 stimuli. In both types of APC mTNF- α expression increased when differentiation was induced. When treated with a matrix metalloproteases inhibitor intracellular lipid accumulation increased.

We state that proliferative and adipogenic capacity of the APC depends on their origin (Sc or Pv) and we propose that mTNF- α could exert a lipogenic effect in human adipose tissue, contrary to the classic lipolytic effect of soluble TNF- α .

INTRODUCCIÓN

Tejido Adiposo

El tejido adiposo (TA) se ha considerado tradicionalmente como un sistema de almacenamiento de energía; sin embargo, en las últimas décadas ha quedado bien establecido que también es un órgano secretor con funciones tanto a nivel sistémico como local. Dado que está involucrado en diversos aspectos del balance energético se especula que alteraciones en su rol secretor, como es el caso de la obesidad, induciría problemas mayores como resistencia a insulina, diabetes tipo 2 y problemas vasculares.

Los principales componentes celulares del tejido adiposo son los adipocitos maduros, células esféricas que contienen gran cantidad de triglicéridos, las células precursoras de adipocitos (CPA), células mesenquimáticas con capacidad de diferenciarse a adipocitos maduros y células endoteliales. También se han identificado otros componentes celulares como monocitos/macrófagos, linfocitos y fibras nerviosas. (Haunner, 2004)

Homeostasis lipídica y Balance Energético.

El tejido adiposo cumple un rol fundamental en la homeostasis de lípidos y en el balance energético. Existen dos mecanismos principales involucrados en esta función: la lipólisis y la lipogénesis.

Lipólisis: Este proceso se activa en los períodos de aumento de la demanda energética. Los ácidos grasos asociados a los triacilglicéridos (TAG) de los depósitos adiposos se liberan a la circulación y se transportan a otros tejidos. El proceso lipolítico lo inicia la triglicérido lipasa del tejido adiposo (ATGL), que hidroliza los TAG produciendo diacilglicerol (DAG) y ácidos grasos libres (AGL). Los TAG, DAG y monoacilgliceroles (MAG), son convertidos en AGL y glicerol por medio de la acción de la lipasa sensible a hormonas (HSL) y de la monoacilglicerol lipasa. El paso limitante de la lipólisis está controlado por la HSL (Moreno y Martínez, 2002). La lipólisis es inhibida por la insulina a través de la inhibición de la HSL y es estimulada por catecolaminas vía receptores β -adrenérgicos.

Lipogénesis: Es el proceso de síntesis de triacilglicéridos (TAG) en los adipocitos. Para la síntesis se utilizan los ácidos grasos provenientes de los TAG del plasma, éstos provienen principalmente de la dieta, en forma de quilomicrones y desde el hígado en forma de VLDL (very low density lipoprotein). Los ácidos grasos son liberados desde las lipoproteínas por la enzima lipoproteína lipasa (LPL), posteriormente los AGL entran al adipocito a través de transportadores de ácidos grasos específicos; una vez dentro de éste los AGL son convertidos en TAG por una reacción enzimática regulada de múltiples pasos, siendo algunas de las enzimas involucradas la acil-CoA-sintetasa, la proteína estimuladora de acilación (ASP) y la diacilglicerol-aciltransferasa (DGAT), que esterifica el último ácido graso, para producir el TAG. Además, los triacilglicéridos pueden ser producidos a partir de glucosa. La glucosa ingresa al adipocito por medio de los transportadores de glucosa (GLUT) 1 y 4 y luego es transformada a (TAG) por medio de una serie de reacciones enzimáticas catalizadas entre otras, por las enzimas acetil-CoA carboxilasa y la ácido graso

sintetasa (Warne, 2003). La lipogénesis es regulada por insulina, glucocorticoides y hormonas sexuales.

Insulina y Balance energético: Los adipocitos maduros funcionales tienen la propiedad de ser sensibles a insulina, la cual modula tanto la lipólisis como la lipogénesis, en el tejido adiposo. La insulina ejerce un efecto antilipolítico y estimula el transporte de glucosa y la síntesis de triglicéridos. (Arner, 2003)

La vía de señalización de la insulina (figura 1) se inicia por la unión de ésta a su receptor (IR, insulin receptor) lo que produce la autofosforilación de IR y la fosforilación de residuos de tirosina de IRS-1 (insulin receptor substrate1). Luego, tiene lugar una serie de eventos entre los cuales se puede mencionar la activación de la expresión de GLUT4. IRS-1, además de las tirosinas, contiene múltiples sitios potenciales de fosforilación en serina/treonina, y la fosforilación de dichos sitios interfiere la activación de IRS-1 mediada por IR y por consiguiente con la señalización mediada por insulina. (Qi y Pekala, 2000).

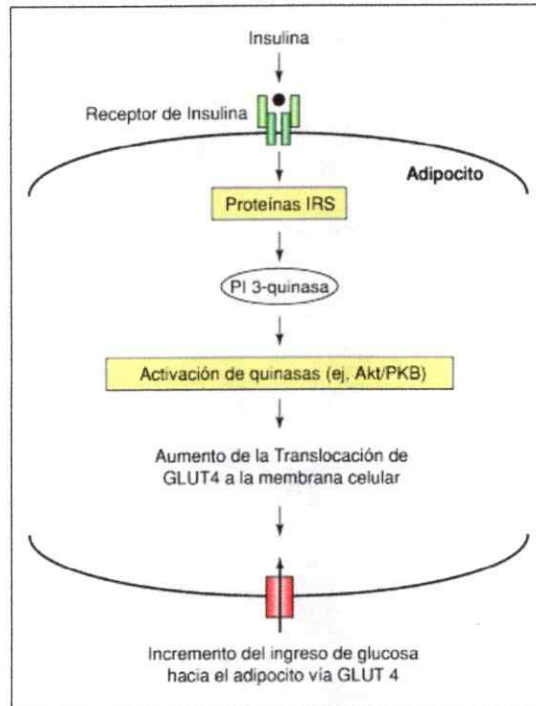


Figura 1: Señalización de insulina en el adipocito. La señal de insulina comienza con la unión a su receptor y la activación de la actividad tirosin-quinasa del mismo, lo que inicia una cascada de fosforilaciones y que finalmente se traduce en un aumento del transporte de glucosa y en una disminución de la lipólisis (Arner, 2003).

Adipogénesis

La adipogénesis es el mecanismo mediante el cual los preadipocitos se diferencian para formar adipocitos maduros. La adipogénesis se produce por la acción coordinada de una serie de factores de transcripción, que modulan la expresión de genes específicos de adipocitos. Las primeras señales de diferenciación comienzan con la activación de CAAT/enhancer-binding protein β (C/EBP β) y C/EBP δ ; éstos a su vez activan a C/EBP α y PPAR γ (Peroxisome proliferator-activated receptor γ),

moléculas claves en el proceso de diferenciación. Luego C/EBP α y PPAR γ son capaces de inducir su propia expresión por un mecanismo de feed-back, así como también la activación de genes específicos de adipocitos, como aP2 (proteína de unión de ácidos grasos), adiposina y GLUT4, entre otros (Gregoire y col., 1998; Cowherd y col., 1999; MacDougald y Mandrup 2002).

Diferencias entre los depósitos de grasa subcutánea y perivisceral

El tejido adiposo se distribuye principalmente en dos compartimentos: subcutáneo (Sc) que representa un 80% de la grasa corporal total y perivisceral (Pv), que corresponde aproximadamente a un 10% de la grasa corporal total. La distribución regional del tejido adiposo varía considerablemente entre individuos, incluso en aquellos con grasa total similar (Arner, 2003)

Los depósitos grasos provenientes de distintos sitios presentan diferencias tanto morfológicas como metabólicas (Tabla 1). Se ha observado, a nivel morfológico, que el tejido adiposo Pv contiene más vasos sanguíneos que el Sc. Además en el tejido Pv hay una mayor cantidad de monocitos/macrofagos, linfocitos y células endoteliales que en el tejido Sc. En humanos los adipocitos provenientes del tejido Pv son más pequeños que los obtenidos de tejido Sc. (Bornstein y col., 2000)

Con respecto a la actividad metabólica, se ha observado que la lipólisis es mayor en los adipocitos de tejido Pv que en aquellos de tejido Sc, y que los efectos antilipolíticos mediados por insulina son más marcados en el tejido Sc que en el tejido Pv (Arner, 2003). Se ha descrito, además, que la velocidad del transporte de glucosa mediado por insulina es mayor en adipocitos de tejido Pv que en adipocitos de tejido

Sc y que los glucocorticoides afectan dicho transporte en células de tejido Pv pero no así en células de tejido Sc. También se ha determinado que el tejido Pv presenta una mayor expresión de GLUT4 que el tejido Sc. (Giorgino y col., 2005)

En cuanto a la función secretora del tejido adiposo, también se ha encontrado diferencias entre los depósitos grasos. Así, tanto explantes de tejido adiposo como adipocitos aislados provenientes de tejido Pv liberan mayor cantidad de interleuquina-6 (IL-6) que aquellos de tejido Sc. Sin embargo la cantidad de IL-6, secretada por los adipocitos aislados, da cuenta de sólo el 10% del total de IL-6 producida por el TA por lo que se ha propuesto que la mayor parte de IL-6 sería producida por las células estromales (Fried y col., 1998). Otros estudios revelan mayores niveles de leptina, tanto a nivel del mRNA (Bornstein y col., 2000) como de la proteína secretada, producidos por el tejido adiposo Sc en comparación con el tejido adiposo Pv. Con respecto a TNF- α , Arner (2001) describe que hay controversia en cuanto a su producción; en su revisión señala que en tres estudios no se encontraron diferencias en la expresión del mRNA de TNF- α entre los depósitos Sc y Pv, y que en otro se encontró niveles de mRNA mayores en tejido Sc. Sin embargo, los niveles de de TNF- α secretado no son diferentes al comparar tejido Sc con tejido Pv (Arner, 2001). En individuos obesos se encontró que la secreción de TNF- α es mayor en explantes de tejido Sc que de tejido Pv, lo que no ocurría en individuos de menor índice de masa corporal (IMC); esto llevó a los autores a proponer que el IMC afectaría la secreción de adipoquinas y contribuiría a las diferencias regionales descritas. (Fain y col., 2004a). Otro hallazgo que apunta a las capacidades secretoras diferenciales de los depósitos grasos, se refiere a que el tejido adiposo Pv secreta una mayor cantidad de inhibidor 1 del activador de plasminógeno (PAI-1) (Alessi y col., 1997) y de factor de crecimiento

endotelial vascular (VEGF) (Fain y col., 2004a) en comparación con el tejido adiposo Sc.

Tabla 1: Resumen de las diferencias entre depósitos grasos de tejido adiposo.

Morfología	Pv	Sc
Vasos sanguíneos	++*	+
Monocitos/Macrófagos	++	+
Tamaño de adipocito	+	++
Función Secretora		
IL-6	++	+
Leptina	+	++
TNF- α	Datos controversiales	
VEGF	++	+
PAI-1	++	+
Metabolismo		
Metabolismo de glucosa	++	+
Metabolismo de glucosa inducido por insulina	++	+
Expresión de GLUT4 (mRNA y Proteína)	++	+
Inhibición de lipólisis por insulina	+	++

*++ > +

Función Secretora del Tejido Adiposo.

El tejido adiposo participa activamente en la regulación del balance energético a través de señales endocrinas, paracrinas y autocrinas, lo que le permite influir en el metabolismo de otros tejidos como el músculo esquelético, hígado y cerebro (Frayn y col., 2003) (figura 2). Dentro de este contexto, el tejido adiposo secreta moléculas del sistema renina-angiotensina relacionadas con la función vascular (Mohamed-Ali y col., 1998; Hauner, 2004), receptores solubles de TNF- α (TNFR1 y TNFR2) y adipocitoquinas, tales como leptina, IL-6, IL-1 β , IL-8 y TNF- α . (Coppack, 2001; Fain y col., 2004 a y b)

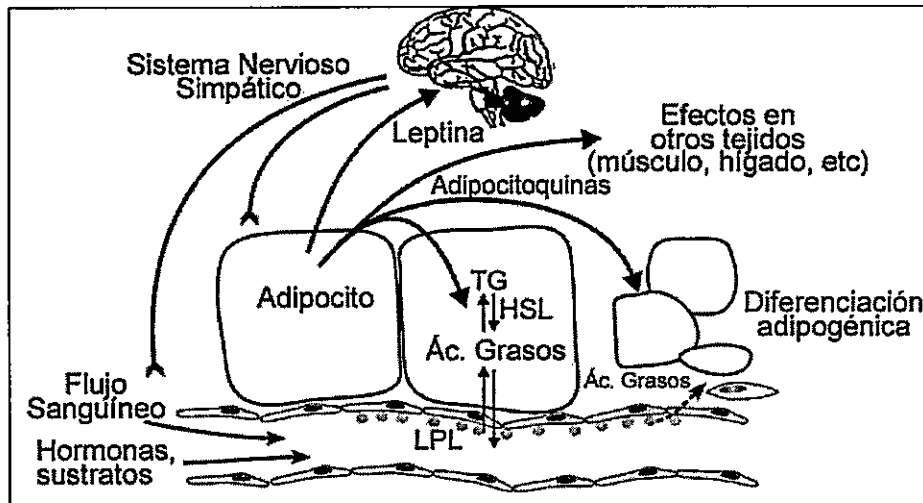


Figura 2: Tejido adiposo y función secretora: El tejido adiposo es un órgano secretor que envía señales a diversos tejidos del organismo. (Frayn y col., 2003)

TNF- α y Tejido Adiposo

El factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) es una citoquina proinflamatoria producida y secretada por varios tipos celulares, tales como monocitos y macrófagos, formando parte de la respuesta inmune. También es producida por el tejido adiposo, en el que cumple una serie de funciones relacionadas con la mantención del balance energético (Warne, 2003; Sethi y Hotamisligil, 1999).

TNF- α es sintetizada como una proteína de transmembrana de 26 kDa (mTNF- α), que puede ser procesada por una metaloproteasa de matriz (TNF- α converting enzyme, TACE) para dar la forma soluble de 17 kDa (sTNF- α) (Sethi y Hotamisligil, 1999; Xu y col., 2002). Se ha demostrado que ambas formas son activas y que pueden interactuar con sus receptores, TNFR1 de 80 kDa y TNFR2 de 60 kDa; ambos

receptores se expresan en el tejido adiposo (Coppack, 2001). Estos receptores pueden estar unidos a membrana o pueden ser procesados enzimáticamente, originándose la forma soluble de ellos (sTNFRs), que antagonizan la función de sTNF- α . Esto último podría constituir un mecanismo para frenar la acción de TNF- α o para asegurar que su acción sea localizada. (Mohamed-Ali y col., 1998, 1999; Eissner y col., 2004).

En el tejido adiposo sTNF- α estimula la lipólisis, induciendo la expresión de la lipasa sensible a hormona (HSL) e inhibe la lipogénesis, reprimiendo la expresión de enzimas claves en este proceso como la lipoprotein lipasa (LPL), la acetil-CoA carboxilasa y la acil-CoA sintasa. (Sewter y col., 1999). Por otra parte, sTNF- α inhibe el transporte de glucosa mediado por insulina disminuyendo la expresión de GLUT4 (Frühbeck y col., 2001), lo que impide la formación de triglicéridos *de novo*.

Se ha demostrado además que sTNF- α interfiere la señalización mediada por insulina, incrementando la fosforilación de serina 307 de IRS-1 a través de la activación de JNK, y que es capaz de inhibir la expresión de IR, IRS-1 y GLUT4, reduciendo el transporte de glucosa inducido por insulina y provocando un estado de resistencia a insulina. (Sewter y col., 1999; Rotter y col., 2003).

sTNF- α también ejerce su acción, inhibiendo la diferenciación de preadipocitos en adipocitos, al reprimir la expresión de factores de transcripción tales como "CCAAT/enhancer binding protein alfa" (C/EBP α), y "peroxisome proliferator-activated receptor gamma" (PPAR γ), indispensables para el proceso de adipogénesis (Gregoire y col., 1998; Warne, 2003).

En el tejido adiposo de individuos obesos se ha observado un aumento del mRNA para TNF- α , sin embargo los niveles plasmáticos de esta citoquina no se correlacionan con adiposidad (Hotamisligil y col., 1995; Kern y col., 1995). Esto podría

explicarse por un aumento en la cantidad de receptores solubles para TNF- α en sujetos obesos, los que contrarrestarían la acción de esta citoquina y/o mantendrían una acción localizada de ésta. Se ha sugerido que TNF- α , actuaría a nivel local o de manera autocrina en el tejido adiposo (Mohamed-Ali y col., 1999). Otros estudios han mostrado que adipocitos de pacientes obesos, cultivados *in vitro*, secretan niveles aumentados de TNF- α , respecto de sujetos no obesos. (Kern y col., 2001; Fain y col., 2004a)

En estudios con líneas celulares de adipocitos murinos, que expresan la forma no procesable de TNF- α , se vió que mTNF- α es biológicamente activo y que inhibe el proceso de diferenciación. (Xu y col., 1999, 2001). Con este antecedente los autores evaluaron la presencia de mTNF- α en explantes de tejido adiposo de ratones y de humanos obesos y encontraron una mayor cantidad de esta forma en los individuos obesos respecto de los controles. Se observó también que mTNF- α predominaba sobre la forma soluble en individuos normales (Xu y col., 2002 a). Estas evidencias sugieren que en el tejido adiposo, TNF- α estaría principalmente asociado a membrana. Por otra parte se observó que ratones transgénicos, que expresan una forma mutada de mTNF- α no procesable y que por lo tanto carecen de TNF- α circulante, presentaron mayor peso y menor cantidad de adipocitos, pero de mayor tamaño, comparado con los animales control del mismo background genético (Voros y col., 2004). Estos resultados sugieren que mTNF- α podría tener un rol lipogénico.

HIPÓTESIS

La capacidad de proliferación y diferenciación de las células precursoras de adipocitos de tejido adiposo humano así como la expresión de mTNF- α depende del depósito graso del que provienen.

OBJETIVOS GENERALES Y ESPECÍFICOS

- **Objetivo General**

Caracterizar CPA provenientes de tejido adiposo humano subcutáneo y perivisceral y estudiar la expresión de mTNF- α y su regulación por señales implicadas en el metabolismo lipídico.

- **Objetivos Específicos**

1. Comparar la capacidad proliferativa de CPA provenientes de depósitos grasos subcutáneo y perivisceral.
2. Evaluar la capacidad de diferenciación de CPA provenientes de depósitos grasos subcutáneo y perivisceral.
3. Determinar la expresión de mTNF- α a nivel de la proteína en CPA, provenientes de tejido adiposo humano subcutáneo y perivisceral.
4. Analizar el efecto de IL-6 e insulina sobre la expresión de mTNF- α
5. Correlacionar la expresión de mTNF- α con el estado de diferenciación de las células precursoras

MATERIALES

Instrumentos y equipos.

- Campana de bioseguridad forma Scientific modelo 1129.
- Incubador Lab-Line CO₂ automático.
- Cámaras de electroforesis y transferencia Bio-Rad.
- Centrifuga Biofuge prime R Heraeus.
- Microscopio de Fluorescencia Nikon labophot-2.
- Microscopio Invertido de Contraste de fase Nikon modelo TMS-F.
- Lector de Elisa modelo Elx-806.
- Cámara Kodak Digital Science DC120.
- Cámara Digital Nikon CoolPix 4500.

REACTIVOS

Anticuerpos.

- Anticuerpo Monoclonal anti human TNF- α , IgG 0.51 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Purificado por Dr. J. C. Aguillón. Laboratorio de Inmunología, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.
- Anticuerpo Monoclonal Anti-IgG de ratón, conjugado a peroxidasa, Rockland.
- Anticuerpo Monoclonal Anti-IgG de ratón, conjugado a FITC, SIGMA.

Factores.

- IL-6, human recombinant, Upstate, Cat.01-156.
- insulina, Actrapid® HM, AND recombinante, 100 ui/ml. Lab. Novo Nordisk.

Inhibidores.

- GM6001 ilomastat 2.5mM, Chemicon Cat. N° CC1010.

Reactivos para cultivo celular.

- Medio DMEM, GIBCO BRL 12800-017.
- Medio F12, GIBCO BRL 21700-075.
- Gentamicina 80mg/2ml, Laboratorio Andrómaco.
- Suero Fetal Bovino, GIBCO BRL 16000-036.
- Agua bidestilada Sanderson; Laboratorio Sanderson S.A.
- Penicilina-Estreptomicina, GIBCO BRL 15140-122.

Proteínas.

- Aprotinina, USBiological, Cat. A2300.
- Albúmina Sérica de Bovino (BSA) fracción V, SIGMA A-2153.
- Leupeptina, USBiological, Cat.L2050.
- Pepstatina A, USBiological, Cat.P3280.
- Colagenasa tipo 1, Worthington, Cat. 4196.
- Tripsina, SIGMA, Cat No. T-4799.

Reactivos Químicos.

- Ácido clorhídrico fumante 37% p.a., Merck 317.
- Acrilamida, SIGMA, No. A-9099.
- Azul de bromofenol, USB, US12370.
- Azul Tripan, tinción 0,4%, GIBCO BRL 15250-061.
- β -Mercaptoetanol, Merck 15433.
- Bis-acrilamida, SIGMA, No. M-7279.
- Cloruro de Calcio dihidratado, p.a., SIGMA, N°. C-3881.
- Cloruro de magnesio hexahidrato, Merck 5833.
- Cloruro de potasio, p.a., Merck 4936.1000.
- Cloruro de sodio, p.a., Vetec analytical reagents 1.0106-09.

- Deoxicolato de Sodio (DOC), SIGMA, No.D-6750.
- Dexametasona, SIGMA, No. D-4902.
- Dimetilsulfóxido (DMSO), SIGMA, No. D-5879.
- D-glucosa, Merk 8337.
- Dodecil sulfato de sodio (SDS), Calbiochem, Cat. 428023.
- Etiléndiamino tetraacético disódico dihidratado (EDTA), SIGMA, No. E-4884.
- Fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF), SIGMA, No. P-7626.
- Formaldehído 37%, Merck 4003.
- Fosfato dihidrogeno de potasio p.a., Merck 4871.1000.
- Fosfato dibásico de sodio heptahidrato, p.a., Winkler. BM-1670.
- Fosfato monobásico de sodio, p.a., Merck 6343.
- Glicerol, Winkler Cat. BM-0800.
- Glicina, SIGMA, No. G-7126.
- Hematoxilina, Merck 1.09252.0100.
- Hidróxido de sodio, p.a., Merck 6498.
- Indometacina, SIGMA, No. 17378-5G.
- Isobutilmetilxantina (IBMX), Calbiochem, Cat. 410957.
- Isopropanol, Merck 1.09634.2500.
- Marcador de peso molecular, Prestained Protein Marker, BioLabs P7708S.
- Metanol, TCL.
- N-etilmaleimida (NEM), SIGMA, No. E-1271.
- Nile Red, SIGMA, No. N-3013.
- Nonidet (NP-40), SIGMA, No. N-6507.
- OIL RED O, SIGMA, No. O-0625.
- Ortovanadato de Sodio, SIGMA, No. S-6508.

- Sodio Bicarbonato, TCL Cat. SO-1410.
- Sulfato de Magnesio Heptahidratado, Winkler Cat. BM-1670.
- TEMED, SIGMA, No. T-9281.
- Tris, p.a., Merck 8382.
- Tween 20, Winkler Cat. BM-2031.

Otros

- Biomax Film MR, Kodak, Cat.8701302.
- Bio-Rad D_c Protein assay, Reactivos A, B y S. Cat. 500-0113/14/15.
- ECL, Amersham Life Science biotech, RPN 2108.
- Inmuno-Blot Membrane, BioRad, Cat. 162-0115.
- Solución de montaje DAKO Fluorescent S3023.
- Programa Kodak Digital Science, 1D Image Análisis Software versión 3.0.
- Programa STATISTCA for windows versión 4.0.

MÉTODOS

CARACTERÍSTICAS DE LOS PACIENTES.

Se obtuvieron muestras de tejido adiposo subcutáneo y perivisceral de pacientes hombres que ingresaron a centros hospitalarios para herniorrafia electiva. (Proyecto Fondecyt 1030597/2003-2005).

Los pacientes eran jóvenes de edad promedio de 40 ± 5 años (rango 31-46), no fumadores, no obesos, con IMC promedio $27,39 \pm 1,45$ (a excepción de 3 pacientes con IMC promedio $37,97 \pm 7,9$, cuyo TA fue utilizado para ensayos de proliferación) y sanos.

CULTIVOS CELULARES

Obtención de células precursoras de adipocitos

La muestra de tejido adiposo se lavó con HBSS ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1,2M; KCl 5,4mM; KH_2PO_4 44mM; $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 40mM; NaCl 0,1M; NaHCO_3 4,2mM; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 22mM; D-glucosa 5,5mM; pH 7,2), se limpió de capilares y luego se cortó en pequeños trozos, de alrededor de 1mm, en condiciones estériles en campana de flujo laminar y se incubó con 1mg/mL de colagenasa tipo 1 por 1 hora a 37°C en agitador de balancín. Luego se filtró con gasa estéril y el filtrado obtenido se centrifugó 7 minutos a 1600 rpm; en el sedimento se encuentran las células precursoras de adipocitos. Estas células se resuspendieron en medio de cultivo DMEM-F12 (1:1) 10% suero fetal bovino

(SFB) y se incubaron en placas de cultivo a 37°C y en una atmósfera controlada con 5% de CO₂. Las células se dejaron proliferar, hasta que formaron una monocapa en confluencia; luego de esto fueron utilizadas para los diferentes ensayos.

Ensayos de proliferación

Se evaluó la proliferación de CPA por recuento celular utilizando un hemocitómetro o cámara de Neubauer. Se sembraron 5×10^4 células precursoras en triplicado en placas de cultivo de 35 mm². Luego de cultivarlas por 1, 3, 6, 10, 13 y 17 días, las células fueron desprendidas de la placa con tripsina/EDTA (0.05 y 0.02% p/v) y la concentración celular se determinó diluyendo 20 µl de la muestra con 20 µl de solución de Azul Tripán al 0,4%; se contaron 4 cuadrantes de la cámara de Neubauer. El cálculo de la concentración se realizó tomando en cuenta el volumen de la cámara y el factor de dilución de la muestra. Los datos de proliferación se analizaron con respecto a la cantidad de células que había a las 24 horas desde que fueron sembradas.

Ensayos de diferenciación de células precursoras

Las células precursoras se sembraron y se llevaron a confluencia en medio DMEM-F12/10% SFB. Una vez confluentes fueron inducidas a diferenciarse con un medio de cultivo DMEM-F12/10% SFB, dexametasona 1 µM, isobutilmetilxantina 0,1 mg/mL, indometacina 0,1mM e insulina 10,5 µg/mL. El medio de cultivo se renovó cada

dos días. Las células se dejaron en medio de diferenciación por 4, 7 y 11 días y luego se utilizaron para los ensayos deseados.

Determinación de diferenciación por tinción con Oil Red

Se sembraron 2×10^4 células, depositando gotas de la suspensión celular sobre cubreobjetos de vidrio de 12 mm de diámetro previamente esterilizados, colocados en placas de 4 pozos. Luego de 24 hrs, las células se lavaron con HBSS y se dejaron con medio de cultivo DMEM-F12/10% SFB. Al día siguiente las células fueron inducidas a diferenciarse, por 4, 7 y 11 días. En los días indicados las células fueron lavadas 2 veces con HBSS y luego teñidas con una solución saturada de Oil Red en isopropanol al 60% durante 30 minutos a temperatura ambiente. Luego, se lavaron 3 veces con PBS (0,1M NaCl; 3mM KCl; 10mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 2mM KH_2PO_4 ; pH 7.2) y se agregó una solución de hematoxilina al 20% por 5 minutos a temperatura ambiente, como contratinción. Finalmente, se lavaron con agua destilada para eliminar el exceso de hematoxilina. Los cubreobjetos con las células, fueron montados en porta objetos con solución de montaje DAKO y se dejaron secar. Finalmente, las células fueron fotografiadas con cámara digital Nikon montada sobre un microscopio invertido.

Estimulación de CPA con Insulina o IL-6

Se sembraron 1×10^5 células precursoras en placas de 35 mm y se llevaron a confluencia en medio de cultivo DMEM-F12/10% SFB. Una vez confluentes se estimularon con insulina (200 $\mu\text{g}/\text{mL}$), o con IL-6 (10 ng/mL) en medio de cultivo DMEM-F12/1% SFB. El medio de cultivo se renovó cada 2 días. Las células fueron lisadas (ver lisados celulares) a las 48 horas y a los 6 días de estímulo.

Efecto del inhibidor de metaloproteasas de matriz, Ionomastat

Se sembraron 1×10^5 células en placas de 35 mm y se llevaron a confluencia en medio de cultivo DMEM-F12/10% SFB. Una vez alcanzada la confluencia se trataron con el inhibidor de metaloproteasas Ionomastat (25 μM) en medio de cultivo DMEM-F12/1% SFB. El medio de cultivo se renovó cada 2 días. Las células fueron lisadas a los 6 días de estímulo.

Lisados celulares

Las células se lavaron con HBSS dos veces, se les agregó buffer de lisis Ripa (150 mM NaCl; 0.1% NP-40, 0.5% DOC; 0.1% SDS; 50mM tris pH 8; 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ aprotinina; 0.1 mg/mL PMSF; 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ pepstatina; 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ leupeptina; 1mM NEM; 0.1 mM O-vanadato), y se lisaron a 4°C, utilizando un rastrillo (cell scraper). Se estimó la concentración proteica de los lisados utilizando el kit de BioRad (Bio-Rad D_c Protein assay), para lo cual se tomó una alícuota de 5 μL del lisado y se le agregó 25 μL de

una mezcla de los reactivos A y S en la proporción 50 A:1 S y luego 200 μ L del reactivo B y se midió la densidad óptica en un lector de ELISA a 630 nm de longitud de onda. Los lisados fueron almacenados a -20°C para su uso posterior.

Los lisados celulares contienen las proteínas de membrana plasmática y de organelos intracelulares. En los ensayos de western blot, se mide por lo tanto, el TNF- α de todos los compartimentos celulares, que en este estudio se analiza como mTNF- α (de acuerdo con Borst y Conover, 2005) tomando en cuenta el peso molecular de la proteína y los datos de literatura. (Xu y col., 2002 a)

Western Blot

Una alícuota de 25 μ g de proteína de los lisados se sometió a denaturación en condiciones reductoras con buffer de carga (40% SDS, 20 %Glicerol, 0,012% azul de Bromofenol, 500 mM Tris-HCl) en presencia de β - mercaptoetanol (4%) por 5 minutos a 60°C . Se prepararon los geles de poliacrilamida al 15% y por cada carril se cargó 25 μ g de proteína . La electroforesis se realizó a temperatura ambiente, a 80V hasta que el frente pasó el gel concentrador y luego se aumentó a 120V hasta que el frente salió del gel. El buffer de corrida contiene 50 mM Tris, 190 mM glicina y 0,1% SDS.

A continuación de la electroforesis, se realizó la transferencia de las proteínas desde los geles a membranas de nitrocelulosa. El buffer de transferencia contiene 50mM Tris, 190mM glicina, 20% metanol y 0,1% SDS. La transferencia se realizó a 20V, toda la noche a 4°C . Los sitios de unión inespecífica en las membranas se bloquearon con una solución de albúmina sérica de bovino (BSA) al 5% en TBS-Tween (25mM Tris; 0,1% Tween-20) por 1 hora a temperatura ambiente.

Las membranas se ensayaron para la identificación de TNF- α . Se incubó con el anticuerpo correspondiente durante 1 hora a temperatura ambiente. Se realizaron tres lavados con TBS-Tween (0,05% Tween 20) de 10 minutos cada uno. Luego se incubó con el anticuerpo secundario, anti-IgG de ratón conjugado a peroxidasa por 45 minutos a temperatura ambiente con agitación.

Luego se lavó cuatro veces con TBS-Tween (0,05% Tween 20) por 10 minutos cada vez. Se reveló la membrana usando un kit de quimioluminiscencia (ECL) exponiendo posteriormente a film fotográfico durante 1 a 10 minutos.

Las bandas obtenidas fueron cuantificadas por análisis densitométrico usando el programa Kodak Digital Science, 1D Image 3.0. Los resultados se expresaron como la intensidad relativa con respecto al control y todos los datos fueron corregidos por la intensidad de β -actina como referencia de carga.

Stripping (Lavado de anticuerpos)

Una vez que las membranas se revelaron, se sometieron a un "stripping" para eliminar la unión del anticuerpo con la proteína de interés y ser incubada con otro anticuerpo contra una proteína de referencia para obtener la carga (β -Actina). Las membranas se lavaron en TBS/Tween y luego se colocaron en tubos con solución de stripping (50mM Tris pH 7.2, 10% SDS, 0,07% β -mercaptoetanol) en una estufa a 65 °C, con agitación por 20 minutos. Se lavaron dos veces con PBS por 15 minutos y se continuó con el protocolo para western blot desde la etapa de bloqueo.

Inmunofluorescencia

Se sembraron 2×10^4 células en medio de cultivo DMEM-F12/10% SFB, sobre cubreobjetos de vidrio de 12 mm de diámetro previamente esterilizados y colocados en placas de 4 pozos. Luego de 24h se retiró el medio y se lavó 2 veces con HBSS y finalmente se mantuvieron con medio de cultivo DMEM-F12/10% SFB hasta confluencia. Luego se lavaron las células con HBSS y se fijaron con PBS-paraformaldehído 2% por 10 minutos a temperatura ambiente. Se saturó la placa con PBS/BSA 4% durante 20 minutos a 37°C. Luego se incubó con un primer anticuerpo monoclonal anti-TNF- α (1:100 en BSA 1%) por 45 min a 37°C. Luego se lavó 3 veces con PBS y se incubó en cámara oscura con un anticuerpo secundario anti-IgG de ratón conjugado a FITC (1:200 en BSA 1%) por 45 minutos a 37°C. Luego se lavaron las células 3 veces con PBS. Los cristales fueron montados con una solución de montaje DAKO. Se analizaron las muestras con un microscopio de fluorescencia y se fotografiaron con una cámara Kodak Digital.

Citometría de Flujo

Se sembraron 3×10^4 células en placas de 24 pozos y se llevaron a confluencia en medio DMEM-F12/10% SFB. Una vez confluentes se estimularon con medio de diferenciación por 4, 7 y 11 días. Luego de esto las células fueron desprendidas de la placa con tripsina/EDTA (0.05 y 0.02% p/v), se lavaron con HBSS y se dejaron en PBS. Posteriormente se les agregó una solución de Nile Red 1 μ g/mL, que marca los lípidos

neutros, por 15 minutos a temperatura ambiente, se lavó dos veces con PBS y se cuantificó la fluorescencia por citometría de flujo.

Para los ensayos con el inhibidor de metaloproteasas Ilomastat, se sembraron 3×10^4 células en medio de cultivo DMEM-F12/10% SFB, en placas de cultivo de 24 pozos. Una vez en confluencia se trataron con ilomastat $25 \mu\text{M}$ o medio de diferenciación durante 11 días; el medio fue renovado cada 3 días.

Criopreservación.

Una vez expandidas las células se almacenaron en N_2 líquido. Para ello, las células se desprendieron de las placas con tripsina/EDTA (0,05 y 0,02% p/v), luego se centrifugaron por 5 minutos a 1800 rpm y se resuspendieron a una concentración de 1×10^6 células/mL, en una solución de criopreservación fría que consiste en 90% SFB y 10% DMSO. Se distribuyó 1 mL de la solución celular en cada criotubo y se congeló mediante descenso gradual de la temperatura hasta alcanzar $-196 \text{ }^\circ\text{C}$.

Análisis estadístico

Para los estudios de proliferación se realizó una prueba de ANOVA de 4 vías. Para los estudios de cambios de expresión de mTNF- α se realizaron pruebas de ANOVA de 1 vía y luego pruebas de Tukey para determinar las diferencias entre los puntos estudiados. Las diferencias en los promedios se analizaron con pruebas de T-Student. Los análisis se hicieron con el programa Statistica For Windows v 4.0.

RESULTADOS

I. PROLIFERACIÓN DE CÉLULAS PRECURSORAS DE ADIPOCITOS (CPA): COMPARACIÓN ENTRE CPA PROVENIENTES DE TEJIDO ADIPOSO PERIVISCERAL Y SUBCUTÁNEO.

Como se señaló anteriormente, existen diferencias metabólicas entre los distintos depósitos grasos así como también comportamientos diferentes de los componentes celulares del tejido adiposo, frente a un mismo estímulo o entorno. En general, estas diferencias han sido encontradas en estudios realizados con células y/o explantes de tejido adiposo, provenientes de ratones, de humanos obesos o de sujetos que padecen alguna enfermedad metabólica como diabetes.

Con el objeto de caracterizar las células precursoras de adipocitos (CPA) de tejido adiposo subcutáneo (Sc) y perivisceral (Pv) provenientes de pacientes sanos, evaluamos su capacidad proliferativa y la comparamos con la de células obtenidas de pacientes obesos. Como se muestra en la figura 3, las CPA-Sc presentan una capacidad proliferativa mayor que las CPA-Pv ($p < 0.001$). Esta característica se manifestó tanto en CPA de pacientes no obesos como de pacientes obesos. Se observó además que las CPA-Sc aisladas de tejido adiposo de pacientes obesos presentan una capacidad proliferativa mayor, a partir de los 9 días de cultivo, que las provenientes de pacientes no obesos ($p = 0,03$) (figura 4A), mientras que, la capacidad proliferativa de CPA-Pv de pacientes obesos es similar a aquella de pacientes no obesos (figura 4B).

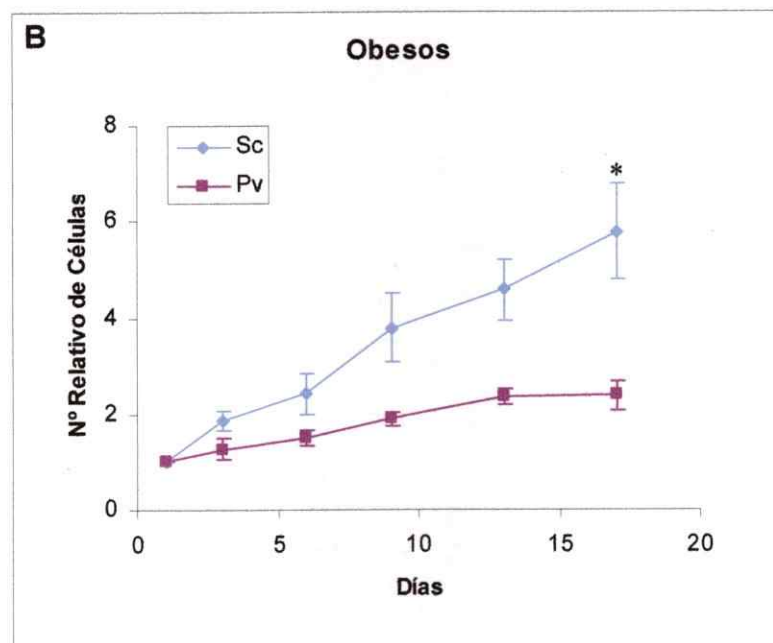
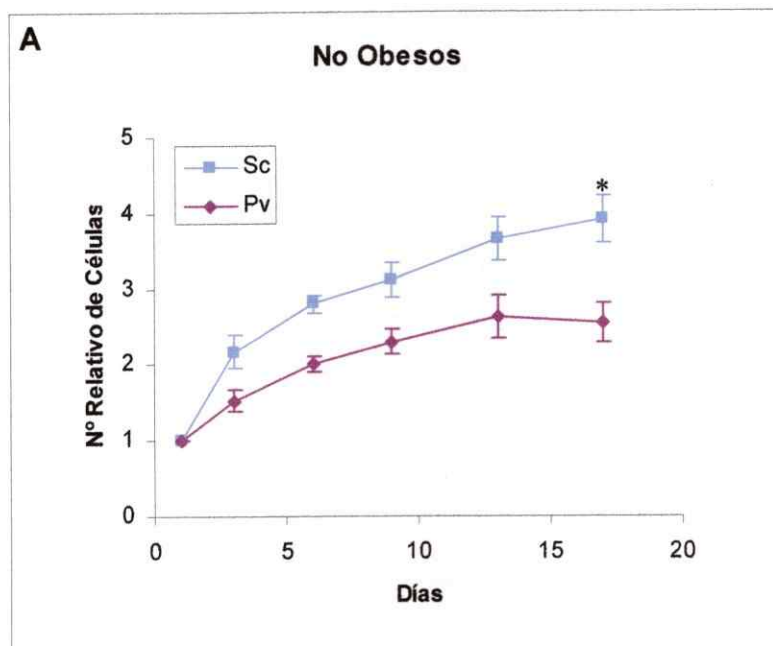


Figura 3: Velocidad de proliferación de células precursoras de adipocitos de tejido adiposo subcutáneo (Sc) y de tejido adiposo perivisceral (Pv).

A) Proliferación de CPA de pacientes no obesos. B) proliferación de CPA de pacientes Obesos. Nº Relativo de Células = Nº de células día n / Nº células día 1. Los datos corresponden al promedio \pm ES. (No obesos: muestras de 4 pacientes distintos; Obesos: muestras de 3 pacientes distintos; experimentos realizados en triplicado)

* ANOVA (F = 4,4; 1gl; p < 0.001).

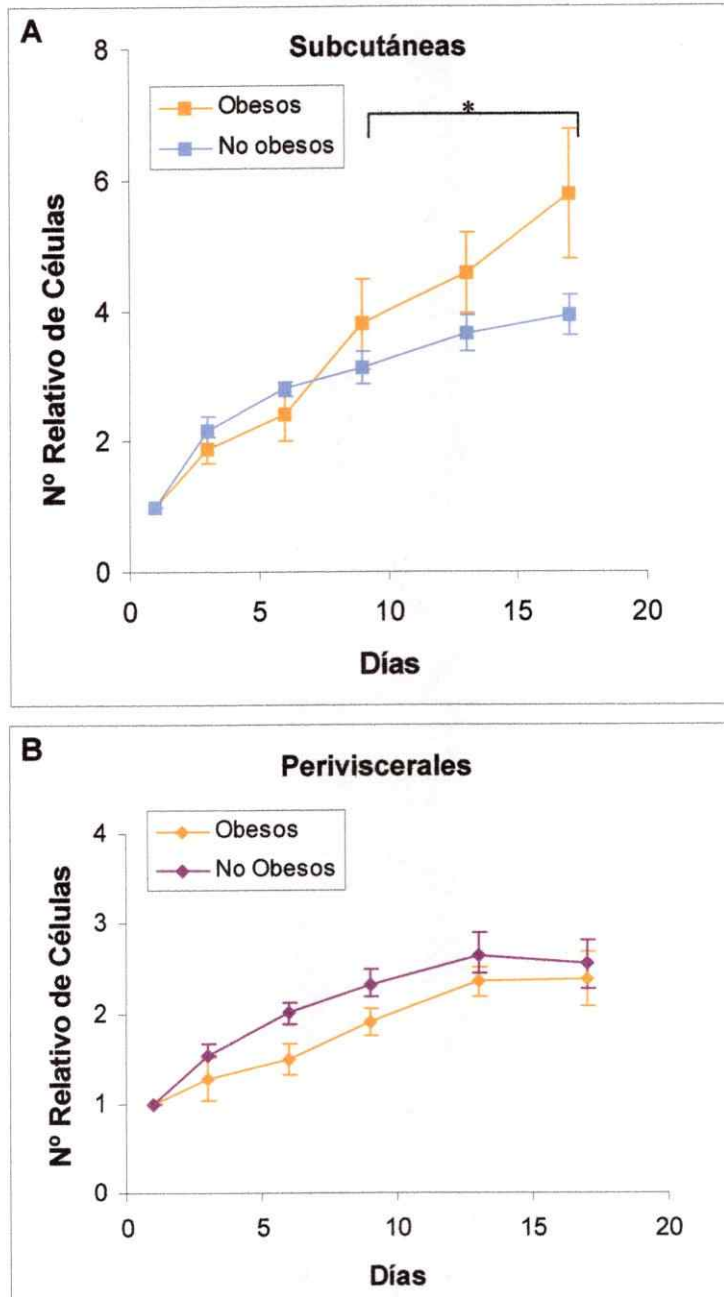


Figura 4: Comparación de la velocidad de proliferación de CPA de pacientes no obesos y obesos.

A) Proliferación de CPA-Sc de pacientes obesos y no obesos, B) Proliferación de CPA-Pv de pacientes obesos y no obesos. (Nº relativo de células = Nº de células día n/Nº células día 1) Los datos corresponden al promedio de 3 pacientes obesos y 4 no obesos \pm ES.

*ANOVA (F = 4,0; 1gl; p = 0,04)

II. DIFERENCIACIÓN DE CÉLULAS PRECURSORAS DE ADIPOCITOS: COMPARACIÓN ENTRE CPA PROVENIENTES DE TEJIDO ADIPOSO PERIVISCERAL Y TEJIDO ADIPOSO SUBCUTÁNEO.

Para evaluar la capacidad de diferenciación de las CPA, las células se estimularon con un medio adipogénico que contiene dexametasona, insulina, isobutilmetilxantina e indometacina (ver metodología) por 7 y 11 días y luego se tiñieron con Oil Red para evidenciar el patrón de acumulación de lípidos. Se observó que las CPA-Pv sometidas a estímulo de diferenciación comienzan a acumular lípidos antes que las CPA-Sc. (figura 5). Al cuantificar mediante citometría de flujo, los lípidos intracelulares de las células estimuladas con el medio adipogénico, se observó que a los 4 días de estímulo, ambos tipos celulares aún no comienzan a acumular lípidos, sin embargo a los 7 y 11 días de diferenciación las CPA-Pv contenían mayor cantidad de lípidos intracelulares que las CPA-Sc (figura 6); esta diferencia disminuyó a los 14 días de estímulo adipogénico alcanzando valores de intensidad media de fluorescencia (IMF) muy similares entre ambos tipos de CPA (datos no mostrados).

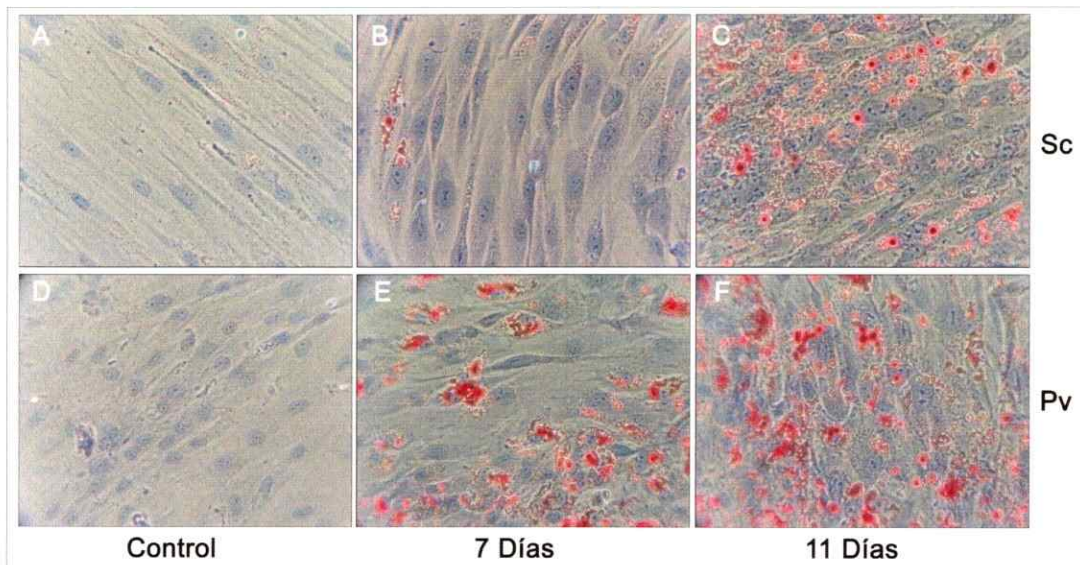


Figura 5: Evaluación de la diferenciación de CPA por tinción con Oil Red.

Fotografías digitales tomadas en microscopio invertido a un aumento de 40x. Las células fueron estimuladas con medio de diferenciación por 7 y 11 días, y luego fueron teñidas con Oil Red. A y D: controles sin diferenciar, B y E: CPA diferenciadas por 7 días, C y F: CPA diferenciadas por 11 días. A, B, C: CPA subcutáneas; D, E, F: CPA periviscerales.

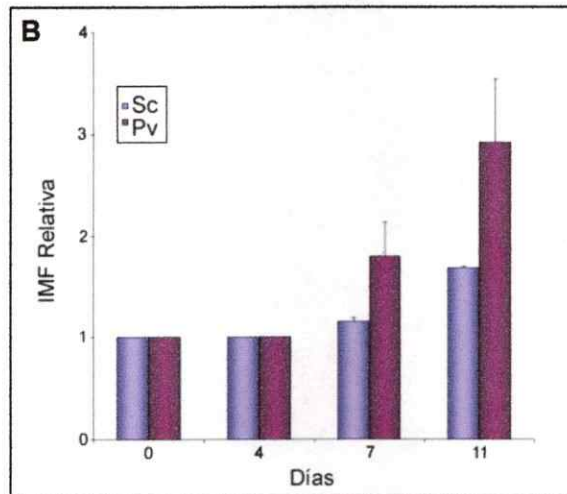
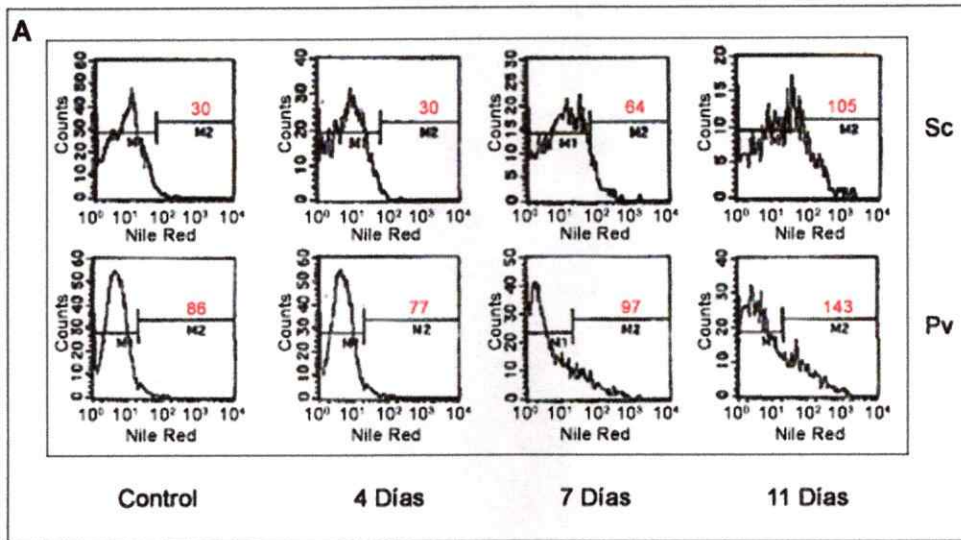


Figura 6: Cuantificación por citometría de flujo de la acumulación de lípidos en CPA estimuladas a diferenciarse.

El contenido de lípidos intracelular fue cuantificado por citometría de flujo en CPA estimuladas a diferenciarse tratadas con Nile Red. A) Histograma representativo de dos experimentos. En rojo: valores de intensidad media de fluorescencia. B) Gráfico de la IMF relativa (IMF relativa = IMF día n/IMF control).vs días de diferenciación. Se muestra el promedio de dos experimentos \pm ES.

III. EXPRESIÓN DE TNF- α DE MEMBRANA (mTNF- α) EN CPA PROVENIENTES DE TEJIDO ADIPOSO PERIVISCERAL Y TEJIDO ADIPOSO SUBCUTÁNEO.

a. Las CPA de ambos depósitos grasos expresan mTNF- α

Para conocer si las CPA expresan mTNF- α , se realizaron ensayos de inmunofluorescencia en células no permeabilizadas, de forma que sólo se marquen las proteínas de la membrana y no haya interferencia con las proteínas intracelulares.

Se observó que tanto las CPA-Sc como las CPA-Pv expresan dicha proteína en la membrana. (Figura 7). Por ensayos de Western Blot (WB) se cuantificó la expresión de mTNF- α . Como se muestra en la figura 8, la expresión de mTNF- α en las CPA-Pv fue significativamente mayor que en las CPA-Sc. ($p = 0,021$; $n=7$ Pv, $n=6$ Sc).

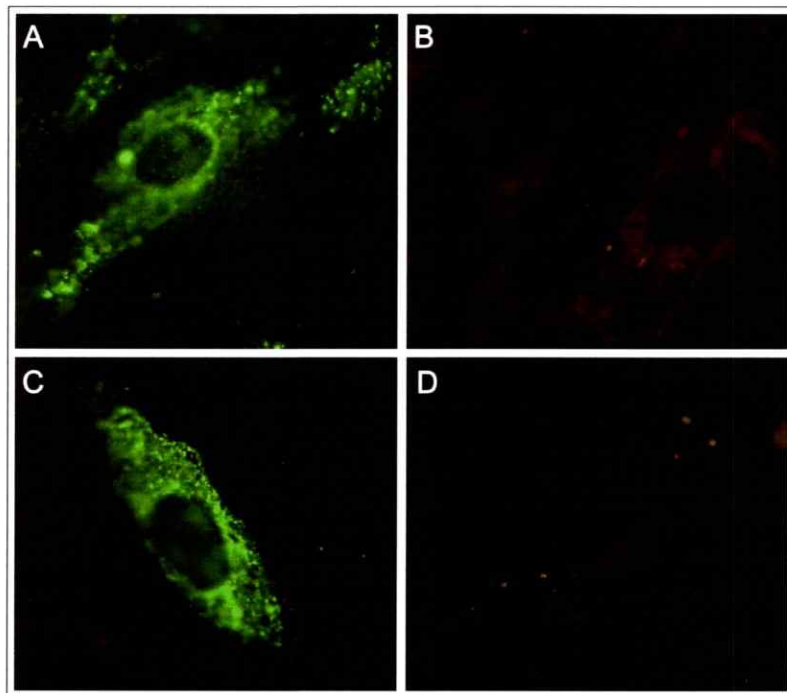


Figura 7: Evaluación por inmunofluorescencia de la expresión de mTNF- α en CPA.

Fotografías digitales de Inmunofluorescencias para mTNF- α captadas en un microscopio de fluorescencia con aumento 100x. A y B son CPA -Sc, C y D CPA -Pv. B y D son controles negativos.

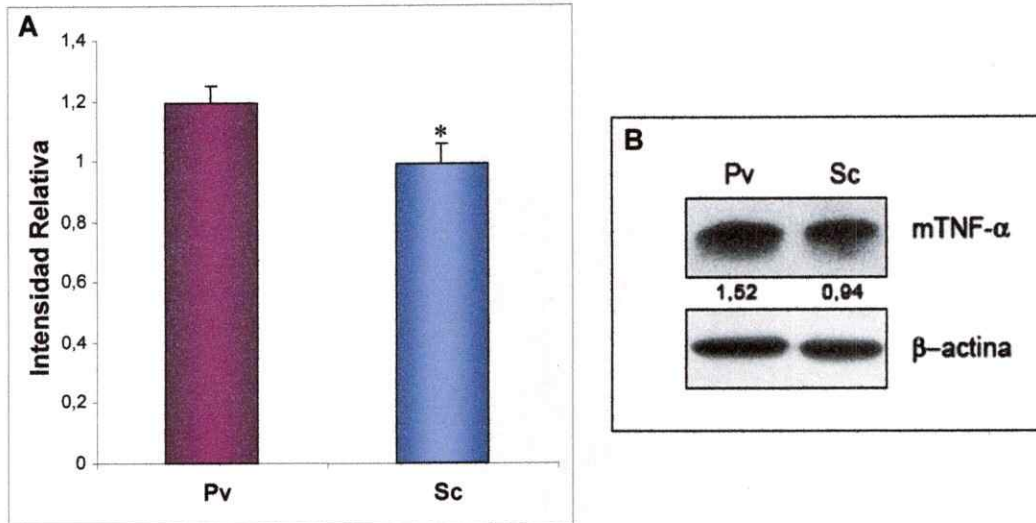


Figura 8: Cuantificación de la expresión de mTNF- α por western blot de lisados de CPA
 A) Intensidad relativa obtenida de la digitalización de las bandas de WB de lisados de CPA de 7 muestras de tejido Sc y 6 muestras de tejido Pv. (Promedio \pm ES) B) WB representativo, los números indican la intensidad de las bandas corregido por actina.
 *T de Student $p = 0,02$

b. Efecto de Insulina sobre la expresión de mTNF- α

Dado que la insulina regula los procesos de balance energético en el tejido adiposo, y que sTNF- α antagoniza la función de insulina sobre estos procesos, evaluamos el efecto de insulina sobre la expresión de mTNF- α . Para esto, las CPA fueron estimuladas con insulina a concentraciones de 10,5 $\mu\text{g/ml}$, 50 $\mu\text{g/ml}$ y 100 $\mu\text{g/ml}$ y no se observó cambios en la expresión de mTNF- α en comparación con el control (datos no mostrados). Sin embargo, como se muestra en la figura 9, con 200 $\mu\text{g/ml}$ de insulina se observó un aumento significativo en la expresión de mTNF- α a los 6 días de tratamiento con respecto al control y 2 días de tratamiento, tanto en CPA-Sc ($p = 0,025$) como en CPA-Pv ($p = 0,001$)

c. Efecto de IL-6 sobre la expresión de mTNF- α

Puesto que el tejido adiposo secreta IL-6 y que sus niveles en la circulación aumentan en individuos obesos y que además, IL-6 presenta funciones similares a las que ejerce sTNF- α en el tejido adiposo, nos pareció interesante evaluar si IL-6 tiene un efecto sobre la expresión de mTNF- α en CPA de tejido adiposo humano. Como se muestra en la figura 10, la expresión de mTNF- α no es afectada por el estímulo con IL-6 en las CPA-Pv, sin embargo en CPA-Sc se observa una disminución significativa a los 6 días de tratamiento con IL-6 con respecto al día 2 de tratamiento ($p = 0,01$).

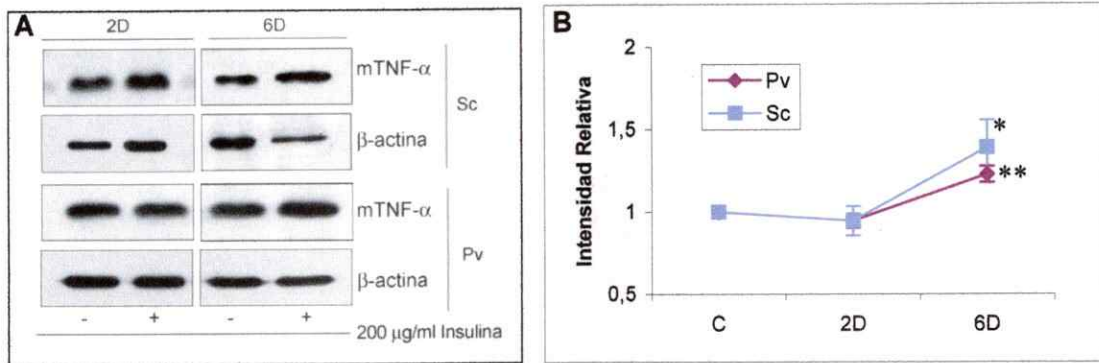


Figura 9: Análisis por western blot del efecto de insulina sobre la expresión de mTNF- α .

A) WB representativo para mTNF- α , de lisados de CPA-Sc y CPA-Pv, tratadas con insulina por 2 días (2D) y por 6 días (6D).

B) Gráfico de la digitalización de las bandas, se muestra el promedio de la intensidad relativa \pm ES, con respecto al control (C) fijado en uno (4 experimentos independientes).

* Sc, ANOVA (F = 6,5; 2 gl; p = 0,025). Análisis Post hoc de Tukey p = 0,002 con respecto al día 2 y p = 0,0005 con respecto al control.

** Pv, ANOVA (F = 16,4; 2 gl; p = 0,001). Análisis Post hoc de Tukey p = 0,04 con respecto al día 2 y p = 0,02 con respecto al control

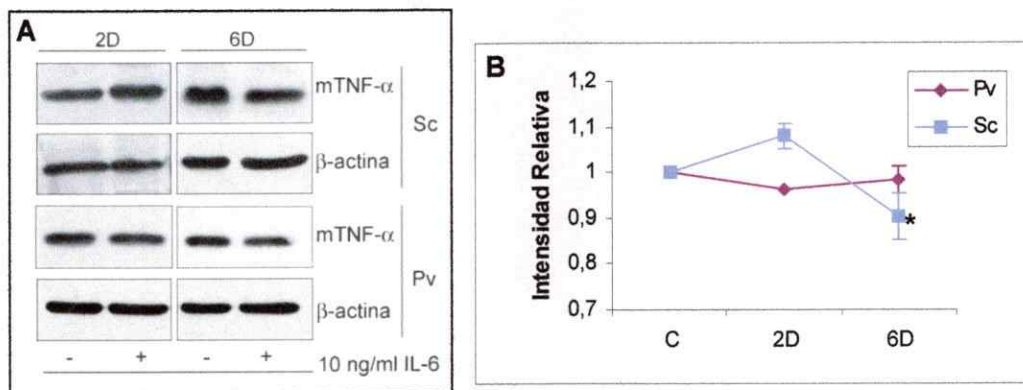


Figura 10: Análisis por western blot del efecto de IL-6 sobre la expresión de mTNF- α .

A) WB representativo para mTNF- α , de lisados de CPA-Sc y CPA-Pv, tratadas con IL-6 por 2 días (2D) y por 6 días (6D).

B) Gráfico de la digitalización de las bandas, se muestra el promedio de la intensidad relativa \pm ES, con respecto al control (C) fijado en uno (3 experimentos Pv; 4 Sc).

* Sc ANOVA (F=7,26; 2 gl; p = 0,01). Análisis Post hoc de Tukey p = 0,01 con respecto al día 2.

d. Modulación de la expresión de mTNF- α durante el proceso de diferenciación de las CPA. Efecto de Ilomastat.

Se evaluó por inmunofluorescencia, la expresión de mTNF- α en CPA diferenciadas, no permeabilizadas. Como se muestra en la figura 11 las CPA, sometidas durante 11 días al estímulo de diferenciación expresan mTNF- α . Por ensayos de Western Blot se observa que la cantidad de mTNF- α en las CPA diferenciadas es mayor que en las CPA controles (sin diferenciar) $p= 0,02$. (Figura 12). En CPA-Sc el aumento observado es de $65 \pm 33\%$ y en CPA-Pv de $42 \pm 25\%$. Si bien el aumento en la expresión de mTNF- α se evidenció en las CPA provenientes de ambos tejidos, dicho aumento no fue diferente entre CPA-Pv y CPA-Sc.

Con el objeto de conocer si el aumento en la expresión de mTNF- α tenía lugar antes o durante la acumulación de lípidos intracelulares que se evidencia en etapas tardías del proceso de diferenciación, evaluamos la expresión de mTNF- α a los 4 días de tratamiento con medio de diferenciación, puesto que a ese tiempo de estímulo adipogénico, aún no se observa la presencia de gotas de lípidos intracelulares (figura 6). Nuestros resultados indicaron que la expresión de mTNF- α en CPA provenientes de ambos depósitos grasos, aumenta con respecto al control luego de 4 días con el estímulo de diferenciación; en CPA-Sc el aumento fue de $30 \pm 17\%$ y en CPA-Pv de $31 \pm 13\%$. (promedio \pm ES de 3 experimentos diferentes). En la figura 13, se muestra un western blot representativo en el que se observa el aumento de mTNF- α a las 4 días del estímulo de diferenciación. Estos datos señalan que, en CPA, el aumento de mTNF- α tiene lugar antes de la aparición de gotas de lípidos intracelulares lo que sugiere una relación entre mTNF- α y el proceso de lipogénesis.

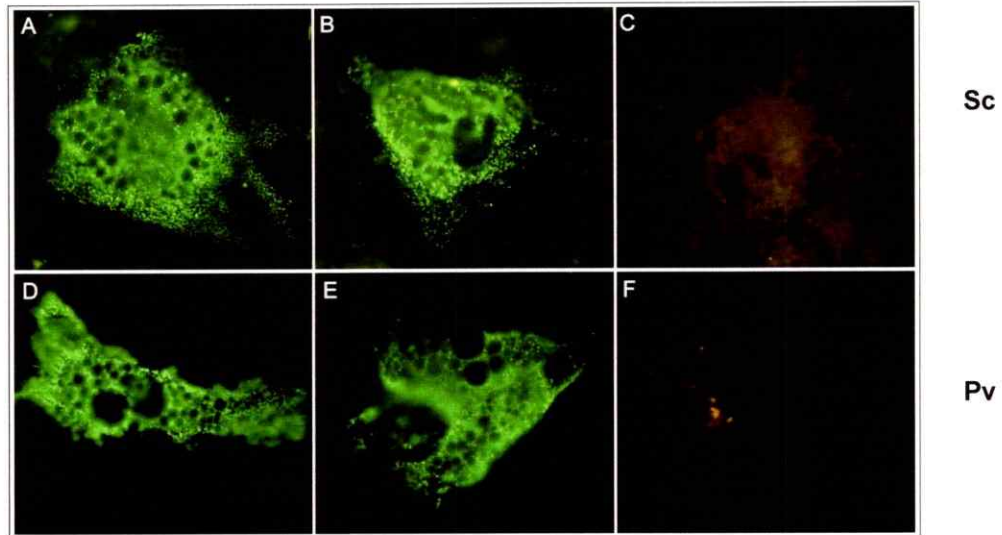


Figura 11: Evaluación por inmunofluorescencia de la expresión de mTNF- α en CPA estimuladas a diferenciarse.

Fotografías digitales de Inmunofluorescencias para mTNF- α captadas en un microscopio de fluorescencia a un aumento de 100X, en CPA estimuladas a diferenciarse durante 11 días. A, B y C son CPA-Sc, D, E y F CPA-Pv. C y F son controles negativos.

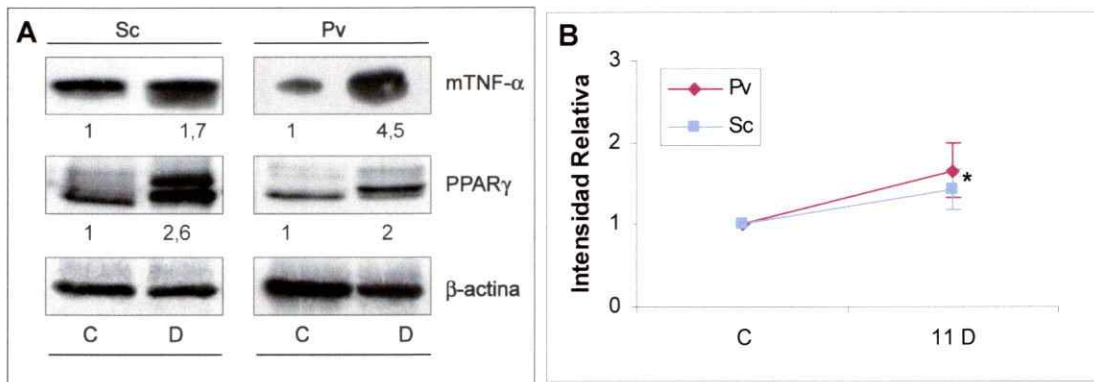


Figura 12: Análisis de la expresión de mTNF- α por western blot de lisados de CPA estimuladas a diferenciarse.

A) Análisis por WB (representativo) de la expresión de mTNF- α , PPAR- γ y β -actina en lisados de CPA no diferenciadas (C) y CPA diferenciadas por 11 días (D). Los números indican la intensidad relativa de las bandas. B) Gráfico de la digitalización de las bandas, se muestra el promedio de la intensidad relativa \pm ES con respecto al control fijado en 1. (5 experimentos para CPA-Pv y 6 para CPA-Sc).

*ANOVA ($p = 0,02$), aumento significativo con respecto al control en ambos tipos de CPA.

Para evaluar si un aumento en la expresión de mTNF- α , se correlaciona con la aparición de gotas de lípidos intracelulares, se incubaron las CPA en ausencia del estímulo de diferenciación, con Ionomycin un inhibidor genérico de metaloproteasas, de manera que se inhiba el procesamiento de mTNF- α .

Como se muestra en la figura 13, al tratar las CPA con Ionomycin se observa un aumento en la expresión de mTNF- α , lo que sugiere una inhibición de su procesamiento. Una vez probado el efecto de Ionomycin sobre la expresión de mTNF- α , evaluamos su efecto en la acumulación lipídica en CPA-Pv, que como se mostró antes, presentan una mayor capacidad de acumulación de lípidos en comparación con las CPA-Sc. Cuando las CPA-Pv fueron estimuladas con Ionomycin por 11 días se observó un aumento en el contenido de lípidos intracelulares, en comparación con el control, aunque menor que el observado en CPA sometidas a estímulo adipogénico por el mismo tiempo (figura 14).

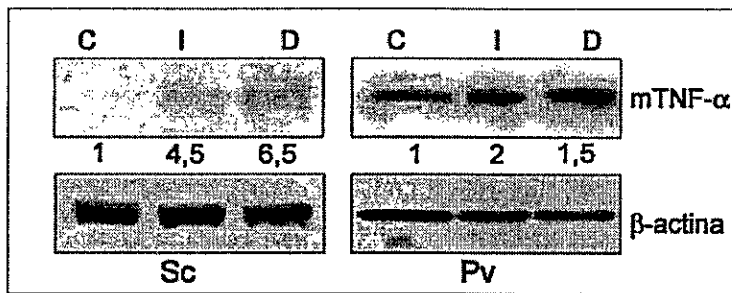


Figura 13: Análisis por western blot del efecto de ilomastat sobre la expresión de mTNF- α . Las CPA fueron tratadas por 4 días con ilomastat un inhibidor de metaloproteasas. Western blot para mTNF- α . C: control; I: ilomastat; D: diferenciación (4 días de tratamiento). En números: Intensidad relativa de las bandas del WB.

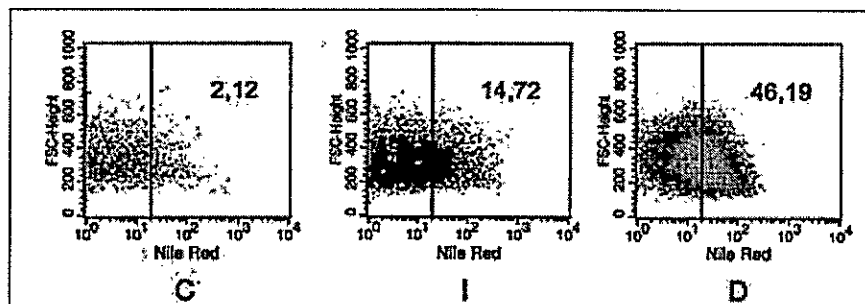


Figura 14: Análisis por citometría de flujo de la acción de ilomastat en la acumulación de lípidos en CPA-Pv
CPA-Pv tratadas con ilomastat (I), o medio de diferenciación (D) y sin tratamiento (C) por 11 días. Citometría de flujo para lípidos marcados con Nile Red, los números indican el porcentaje de células con marca positiva.

DISCUSIÓN

La mayoría de los estudios relativos a la distribución anatómica del tejido adiposo se han focalizado en las diferencias metabólicas y endocrinas de los distintos compartimentos grasos. Sin embargo, existe poca información respecto de las diferencias regionales como determinantes del potencial proliferativo y de diferenciación de las células adiposas.

En este estudio se comparó la capacidad proliferativa de células precursoras de adipocitos (CPA) de tejido adiposo humano provenientes de depósitos grasos subcutáneo y perivisceral, obtenidos de pacientes sanos no obesos. Los resultados mostraron que las CPA-Sc proliferan a mayor velocidad que las CPA-Pv. Estos resultados concuerdan con otros obtenidos con células provenientes de tejido adiposo de ambos depósitos, de pacientes obesos (Tchkonina y col., 2005; van Harmelen y col., 2004). Sin embargo, en estos estudios no se comparó la velocidad de proliferación de células provenientes de sujetos sanos no obesos. En esta tesis, analizamos también la capacidad proliferativa de células provenientes de ambos depósitos adiposos de 3 pacientes obesos y la comparamos con la de pacientes no obesos. Observamos que las CPA-Sc provenientes de pacientes obesos, presentan un mayor potencial de proliferación que las de pacientes no obesos, sin embargo, las CPA-Pv de ambos tipos de pacientes presentan una proliferación similar.

Se ha descrito que los cambios en la masa del tejido adiposo pueden estar asociados con un cambio en el número de adipocitos y/o un cambio en el volumen de los mismos. El cambio en el número de adipocitos está gobernado por cambios en la maduración de los preadipocitos (CPA) por adipogénesis, por muerte celular mediada por apoptosis y por cambios en la replicación de los preadipocitos. (Warne, 2003)

Nuestros resultados apuntan a señalar que en los pacientes obesos el aumento de la masa de tejido adiposo estaría en parte, determinada por un aumento en el número de células del tejido adiposo subcutáneo.

En cuanto a la capacidad de diferenciación observamos que, luego del estímulo adipogénico, las CPA-Pv en cultivo, comienzan a acumular lípidos antes y en mayor cantidad que las CPA-Sc. Al respecto, los datos de la literatura son controversiales; van Harmelen y col. (2004) y Shahparaki y col. (2002) evaluaron la capacidad adipogénica de CPA de ambos depósitos grasos midiendo la actividad de la enzima glicerol 3 - fosfato deshidrogenasa (G3PDH), y no observaron diferencias entre CPA provenientes de los distintos depósitos a los 16 días y tres semanas de diferenciación respectivamente. En cambio, Tchkonja y col. (2002) encontraron mayor acumulación de lípidos y mayor actividad de G3PDH en CPA-Sc que en CPA-Pv a los 10 días de estímulo adipogénico. En los estudios mencionados utilizan CPA provenientes de pacientes obesos (hombres y mujeres indistintamente) y el medio de diferenciación no contiene suero fetal (Chemically defined). Es posible que las diferencias en la metodología tengan un impacto en los resultados obtenidos. Cabe señalar que el tiempo al cual se evalúa el proceso de diferenciación puede influir en los resultados. Nosotros observamos diferencias en la diferenciación, entre ambos tipos de CPA, a los 7 y 11 días de adición del medio de diferenciación, sin embargo a tiempos mas largos, éstas tendieron a desaparecer.

Por otra parte, evaluamos la expresión de TNF- α de membrana en CPA de tejido adiposo tanto subcutáneo como perivisceral y encontramos que las CPA de ambos tejidos expresan mTNF- α , siendo mayor la expresión en las CPA-Pv que en las CPA-Sc. Al respecto, no encontramos en la literatura información acerca de la

expresión de mTNF- α por células precursoras de adipocitos aisladas de tejido adiposo humano.

En homogenizados de muestras de tejido adiposo subcutáneo humano, Xu y col. (2002a) encontraron expresión de mTNF- α tanto en pacientes obesos como no obesos, siendo significativamente mayor en pacientes obesos. Por su parte, Borst y Conover (2005) detectaron expresión de mTNF- α en TA-Pv de ratas y observaron una tendencia a una mayor expresión de mTNF- α en ratas obesas con respecto a ratas no obesas. Voros y col. (2004), utilizando un modelo de ratones transgénicos que expresan una forma no procesable de TNF- α , observaron que éstos poseen adipocitos de mayor tamaño y un peso corporal mayor que los ratones controles y concluyen que TNF- α de membrana estimula la formación de tejido adiposo. Estos antecedentes sugieren que un aumento de mTNF- α se relaciona con un aumento en la adiposidad.

Examinamos luego el efecto de insulina sobre la expresión de mTNF- α en células precursoras de adipocitos. Los resultados señalan que al incubar las CPA por 6 días a una concentración de 200 $\mu\text{g/ml}$ de insulina la expresión de mTNF- α aumentó significativamente con respecto a los 2 días de estímulo. Este aumento de TNF- α en la membrana sugiere que insulina podría estar ejerciendo un efecto inhibitorio del procesamiento de TNF- α . En general, los datos de la literatura relativos a la acción de insulina sobre TNF- α se refieren a la expresión de mRNA y/o a niveles locales o sistémicos de TNF- α soluble, sin considerar la expresión de la proteína de membrana.

En el tejido adiposo está bien establecido que existe una interrelación entre las acciones de sTNF- α e insulina. Insulina actúa estimulando la lipogénesis mientras que sTNF- α incrementa la lipólisis (Saltiel y Kahn 2001; Sewter y col., 1999; Rotter y col., 2003; Rydén y col., 2004). Así mismo, se ha propuesto que sTNF- α producido

localmente en el tejido adiposo podría modular la acción de insulina en el transporte de glucosa en el adipocito. Al respecto, se reportó que la secreción de TNF- α se correlaciona negativamente con la lipogénesis estimulada por insulina. (Löfgren y col., 2000)

Por otra parte, se demostró que concentraciones suprafisiológicas de insulina administradas a sujetos sanos aumentó la expresión del mRNA para TNF- α en el tejido adiposo, sin observarse cambios en los niveles circulantes de TNF- α . Sin embargo, los autores no determinaron niveles locales de sTNF- α . (Krogh-Madsen, 2004). En otro estudio se vió que el estímulo con insulina a una concentración de 40 μ g/ml no tenía efecto sobre la liberación de TNF- α en explantes tejido adiposo o adipocitos aislados, desde pacientes normales. (Sweter y col., 1999). Nosotros, no observamos tampoco cambios en la expresión de mTNF- α con concentraciones similares de insulina.

Evaluamos además, el efecto de IL-6 sobre la expresión de mTNF- α y observamos que en CPA-Sc la expresión de mTNF- α disminuye a los 6 días de tratamiento con IL-6. Mohamed-Ali (1999), propuso que sTNF- α en el tejido adiposo induciría la liberación de IL-6 y que ésta sería una señal endocrina, puesto que los niveles circulantes de IL-6 se correlacionan con el producido por el TA y niveles de obesidad, pero que TNF- α actuaría de forma local. Además se ha encontrado que la cantidad de IL-6 producida por el tejido adiposo es mucho mayor en comparación con TNF- α (Fain y col.; 2004 a,b). En otro estudio encontraron que los niveles de IL-6 se correlacionan negativamente con la respuesta a insulina (transporte de glucosa) (Bastard y col., 2002). Estos datos sugieren una regulación entre los niveles de estas citoquinas, como propone Mohamed-Ali (1999)

Cuando estimulamos con medio adipogénico a las CPA, encontramos que aumenta la cantidad de mTNF- α con respecto a CPA controles y que este aumento ocurre antes que la aparición de gotas de lípidos, dado que a los 4 días con estímulo adipogénico se puede observar este incremento. En un estudio con CPA-Sc estimuladas a diferenciarse, los autores examinaron los niveles de mRNA para TNF- α y no observaron cambios en la expresión entre células controles y diferenciadas (Wang y col., 2005). Esto podría indicar que el aumento de mTNF- α observado por nosotros no se debe a un aumento de la síntesis sino que una disminución de su procesamiento.

Por otra parte, nosotros observamos que al tratar las CPA con un inhibidor de metaloproteasas, con el objeto de inhibir el procesamiento de mTNF- α , las CPA acumulan lípidos sin ser estimuladas a diferenciarse, lo que sugiere que se favoreció la lipogénesis. Al respecto, Togashi y col. (2002) probaron el efecto de un inhibidor de la TACE, en ratones con resistencia a insulina, no diabéticos e hipertensos y encontraron que se mejoraba la sensibilidad a insulina y que al inhibir el procesamiento de TNF- α , no solo disminuye la resistencia a insulina en ratones diabéticos si no que también en los ratones no diabéticos. En otro estudio con ratones obesos (KKA^y) al tratarlos con un inhibidor de metaloproteasas de matriz, observaron que disminuyeron los niveles de glucosa e insulina plasmáticos, debido a una mejora en la sensibilidad a insulina, y este efecto es atribuido a la inhibición del procesamiento de mTNF- α . (Morimoto y col., 1997).

En este estudio encontramos que la expresión de mTNF- α aumenta cuando las CPA son estimuladas a diferenciarse y que este incremento en la expresión se produce antes que las células comienzan a acumular lípidos (fig. 13). Así también, cuando las CPA son expuestas a altas concentraciones de insulina observamos un aumento en la

expresión de mTNF- α . Estos resultados, aunque preliminares, sugieren que mTNF- α podría constituir una señal lipogénica, contrariamente a los efectos lipolíticos descritos para la forma soluble. Esto explicaría que mTNF- α aumente con los estados de hiperinsulinemia y de estímulo adipogénico. Además, si consideramos que IL-6 y sTNF- α producen los mismos efectos sobre el metabolismo lipídico (inhiben la lipogénesis, estimulan lipólisis, producen estados de resistencia a insulina) el hallazgo que IL-6 disminuya mTNF- α podría constituir otra forma de regulación de la homeostasis lipídica. Estudios previos han demostrado respuestas celulares distintas frente a las dos formas de TNF- α , como por ejemplo que mTNF- α es capaz de lisar células que son resistentes a la lisis por la forma soluble de TNF- α , (Grell y col., 1995) o que luego de la administración de LPS, ratones transgénicos con mTNF- α no procesable producen niveles significativamente mayores de IL-12 que los ratones silvestres (Mueller y col., 1999).

Proponemos que, en el tejido adiposo, el equilibrio entre sTNF- α y mTNF- α podría constituir una señal para la homeostasis lipídica (lipólisis vs lipogénesis). En la figura 15 se muestra un esquema de esta propuesta.

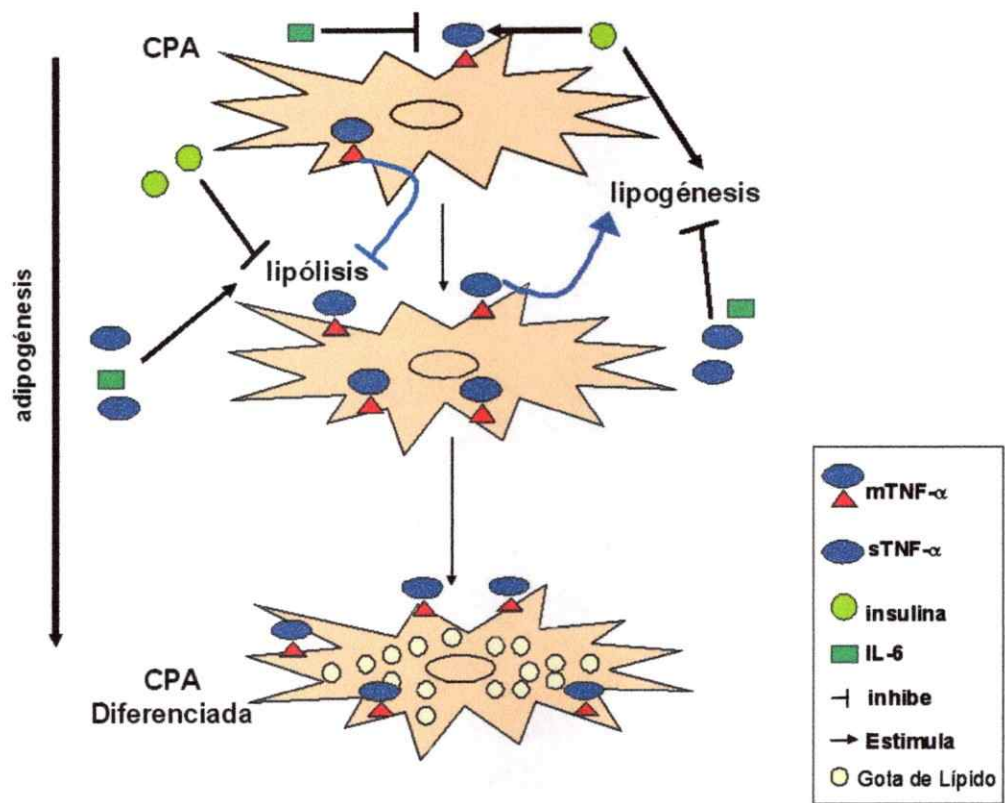


Figura 15: Modelo propuesto. mTNF- α actuaría como una señal lipogénica.

CONCLUSIÓN

In vitro las células precursoras de adipocitos provenientes de tejido adiposo humano tienen respuestas diferenciales según el origen del depósito del cual se han aislado. Esto se traduce en diferencias en la capacidad proliferativa y de diferenciación así como en la expresión de mTNF- α y su regulación por señales implicadas en el metabolismo lipídico entre las CPA de tejido adiposo Sc y Pv .

mTNF- α en CPA podría constituir una señal lipogénica, aunque se requiere de un estudio mas exhaustivo para confirmar esta propuesta.

BIBLIOGRAFÍA

Alessi, M. C.; Peiretti, F.; Morange, P.; Henry, M.; Nalbone, G. y Juhan-Vague, I. 1997 "Production of plasminogen activator inhibitor 1 by human adipose tissue: possible link between visceral fat accumulation and vascular disease". *Diabetes* 46, 860-867.

Arner P. 2001 "Regional differences in protein production by human adipose tissue". *Biochemical Society Transactions* 29, 72-75.

Arner P. 2003 "The adipocyte in insulin resistance: key molecules and the impact of the thiazolidinediones". *Trends Endocrinol. Metab.* 14, 137-145.

Bastard, J. P.; Maachi, M.; Tran van Nhieu, J.; Jardel, C.; Bruckert, E.; Grimaldi, A.; Robert, J.; Capeau, J. y Hainque, B. 2002. "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, 2084-2089.

Bornstein, S. R.; Abu-Asab, M.; Glasow, A.; Páth, G.; Hauner, H.; Tsokos, M.; Chrousos, G. P. y Scherbaum, W. A. 2000 "Immunohistochemical and ultrastructural localization of leptin and leptin receptor in human white adipose tissue and differentiating human adipose cells in primary culture". *Diabetes* 49, 532-538.

Borst, S. E. y Conover, C. 2005. "High-fat diet induces increased tissue expression of TNF- α ". *Life Sci.* 77, 2156-2165.

Coppack, S.W. 2001 "Pro-inflammatory cytokines and adipose tissue". *Proc. Of the Nutrition Soc.* 60, 349-356.

Cowherd, R.M.; Lyle, R.E y McGehee Jr, R.E. 1999 "Molecular regulation of adipocyte differentiation" *Semin. Cell Develop. Biol.* 10, 3-10.

Eissner, G.; Kolch, W. y Scheurich, P. 2004 "Ligands working as receptors: reverse signalling by members of the TNF superfamily enhance the plasticity of the immune system". *Cytokine & Growth factor Rev.* 10, 353-366.

Fain, J.N.; Madan, A.K.; Hiler, M. L.; Cheema, P. y Bahouth, S.W. 2004 a. "Comparison of the release of adipokines by adipose tissue, adipose tissue matrix, and adipocytes from visceral and subcutaneous abdominal adipose tissues of obese humans". *Endocrinol.* 145, 2273-2282.

Fain, J. N.; Bahouth, S. W. y Madan A. K. 2004 b. "TNF- α release by the nonfat cells of human adipose tissue". *Int. J. Obes* 28, 616-622.

Frayn, K.N.; Karpe, F.; Fielding, B.A.; Macdonald, I.A. y Coppack, S.W. 2003 "Integrative physiology of human adipose tissue" *Int. J. Obes Relat and Metab Disord.* 27, 875-888.

Fried S. K., Bunkin D. A., Greenberg A. S. 1998 "Omental and subcutaneous adipose tissues of obese subjects release Interleukin-6: Depot difference and regulation by glucocorticoid". *J. Clin. Endocrinol. Metab* 83, 847-850.

Frühbeck, G.; Gómez-Ambrosi, J.; Muruzábal, F.J. y Burrel M.A. 2001 "The adipocyte: a model for integration of endocrine and metabolic signaling in energy metabolism regulation". *Am J Physiol Endocrinol Metab* 280, E827-E847.

Giorgino, F.; Laviola, L. y Eriksson. J. W. 2005 "Regional differences of insulin action in adipose tissue: insights from *in vivo* and *in vitro* studies". *Acta. Physiol. Scand.* 183, 13-30

Gregoire, F.M.; Smas, C.M. y Sul H.S. 1998 "Understanding Adipocyte Differentiation". *Physiol Reviews* 78, 783-809

Grell, M.; Douni, E.; Wajant, H.; Lohden, M.; Clauss, M.; Maxeiner, B.; Georgopoulos, S.; Lesslauer, W.; Kollias, G.; Pfizenmaier, K. y Scheurich, P. 1995 "The Transmembrane Form of Tumor Necrosis Factor Is the Prime Activating Ligand of the 80 kDa Tumor Necrosis Factor Receptor" *Cell*, 83, 793-802.

Hauner, H. 2004 "The new concept of adipose tissue function". *Physiol Behav* 83, 653-658.

Hotamisligil, G.S.; Arner, P.; Caro, J.F.; Atkinson, R.L y Spiegelman, B.M 1995 "Increased adipose tissue expresión of tumor necrosis factor- α in human obesity and insulin resistance" *J. Clin. Invest.*95, 2409-2415.

Kern, P.A.; Saghizadeh, M.; Ong, J.M.; Bosch, R.J.; Deem, R. y Simsolo, R.B. 1995 "The expression of tumor necrosis factor in human adipose tissue: regulation by obesity, weight loss, and relationship to lipoprotein lipase".*J. Clin. Invest.* 95, 2111-2119.

Kern, P.A.; Ranganathan, S.; Li, C.; Wood L. y Ranganthan G. 2001 "Adipose tissue tumor necrosis factor and interleukin-6 expresion in human obesity and insulin resistance". *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 280, E745-E751.

Krogh-Madsen, R.; Plomgaard, P.; Keller, P.; Keller, C. y Pedersen, B K. 2004 "Insulin stimulates interleukin-6 and tumor necrosis factor- α gene expression in human subcutaneous adipose tissue" *Am J Physiol Endocrinol Metab* 286, E234–E238.

Löfgren, P.; van Harmelen, V.; Reynisdottir, S.; Näslund, E.; Rydén, M.; Rössner, S. y Arner, P. 2000. "Secretion of tumor necrosis factor- α shows a strong relationship to insulin-stimulated glucose transpor in human adipose tissue". *Diabetes* 49, 688-692.

MacDougald, O.A. y Mandrup, S. 2002 "Adipogenesis: forces that tip the scales". *Trends Endocrinol. Metab.*13; 5-11.

Mohamed-Ali, V.; Pinkney, J.H. y Coppack, S.W. 1998 "Adipose tissue as an endocrine and paracrine organ" *Int. J. Obes.* 22, 1145-1158

Mohamed-Ali, V., Goodrick S., Bulmer K., Holly J.M.P., Yudkin J.S. y Coppack S.W. 1999 "Production of soluble tumor necrosis factor receptors by human adipose tissue in vivo". *Am. J. Physiol* 277 (*endocrinol metab*) 40, E971-E975.

Moreno, M.J. y Martínez, J.A. 2002 "El tejido Adiposo: órgano de almacenamiento y órgano secretor" *ANALES Sis San Navarra.* 25, 29-39.

Morimoto, Y.; Nishikawa, K. y OACI, M. 1997. "KB-R7785, a novel matriz metalloproteinase inhibitor, exerts its antidiabetic effect by inhibiting tumor necrosis factor- α production". *Life Sci.* 61, 795-803.

Mueller, C.; Corazza, N.; Trachsel-Løseth, S.; Eugster, H-P.; Bühler-Jungo, M; Brunner, T. e Imboden, M. A. 1999. "Noncleavable Transmembrane mouse tumor necrosis factor- α (TNF α) mediates effects distinct from those of wild-type TNF α in Vitro and in Vivo". *J. biol. Chem.* 274, 38112-38118.

Qi, C. y Pekala, P.H. 2000 "Tumor Necrosis Factor- α -induced insulin resistance in adipocytes". *Soc. Exp. Biol. Med.* 223; 128-135.

Rotter, V.; Nagaev, I. y Smith, U. 2003 " Interleukin-6 (IL-6) induces insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes an is, like IL-8 and Tumor Necrosis Factor- α , overexpressed in human fat cells from insulin-resistant subjects". *J. Biol. Chem.* 278; 45777-45784.

Rydén, M.; Arvidsson, E.; Blomqvist, L.; Perbeck, L.; Dicker, A. y Arner, P. 2004 "Targets for TNF- α -induced lipolysis in human adipocytes". *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 318: 168-175.

Saltiel, A. R. y Kahn, C. R. 2001 "Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism" *Nature* 414, 799-806.

Sethi, J.K. y Hotamisligil, G.S. 1999 "The role of TNF α in adipocyte metabolism" *Semin Cell Develop Biol.* 10, 19-29

Sewter, C.P.; Digby, J.E.; Blows, F.; Prins, J. y O'Rahilly, S. 1999 "Regulation of tumour necrosis factor-alpha release from human adipose tissue in vitro". *J. Endocrinol.* 163, 33-38.

Shahparaki, A.; Grunder, L. y Sorisky, A. 2002 "Comparison of human abdominal subcutaneous versus omental preadipocyte differentiation in primary culture". *Metabolism* 51, 1211-1215.

Tchkonia, T.; Giorgadze, N.; Pirtskhalava, T.; Tchoukalova, Y.; Karagiannides, I.; Forse, R.A.; Deponte, M.; Stevenson, M.; Guo, W.; Han, J.; Waloga, G.; Lash, T.L.; Jensen, M.D. y Kirkland, J.L. 2002 "Fat depot origin affects adipogenesis in primary cultured and cloned human preadipocytes". *Am. J. Physiol. Regulatory Integrative Comp. Physiol.* 282, R1286-R1296.

Tchkonia, T.; Tchoukalova, Y.D.; Giorgadze, N.; Pirtskhalava, T.; Karagiannides, I.; Forse, R.A.; Koo, A.; Stevenson, M.; Chinnappan, D.; Cartwright, A.; Jensen, M.D. y Kirkland, J.L. 2005 "Abundance of two human preadipocyte subtypes with distinct capacities for replication, adipogenesis, and apoptosis varies among fat depots" *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 288, E267-E277.

Togashi, N.; Ura, N.; Higashiura, K.; Murakami, H. y Shimamoto, K. 2002. "Effect of TNF- α -Converting enzyme inhibitor on insulin resistance in fructose-fed rats" *Hypertension* 39, 578-580.

Van Harmelen, V.; Röhrig, K. y Hauner, H. 2004. "Comparison of proliferation and differentiation capacity of human adipocyte precursor cells from the omental and subcutaneous adipose tissue depot of obese subjects". *Metabolism* 53, 632-637.

Voros, G.; Maquoi, E.; Collen, D. y Lijnen, H.R. 2004 "Influence of membrane-bound tumor necrosis factor (TNF)- α on obesity and glucose metabolism". *J. Thromb. Haemost.* 2; 507-513.

Wang, B.; Jenkins, J. R. y Trayhurn, P. 2005. "Expression and secretion of inflammation-related adipokines by human adipocytes differentiated in culture: integrated response to TNF- α ". *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 288, E731-E740.

Warne, J.P. 2003 "Tumor necrosis factor α : a key regulator of adipose tissue mass" *J. Endocrinol.* 177, 351-355

Xu, H.; Sethi, J.K. y Hotamisligil, G.S. 1999 "Transmembrane tumor necrosis factor (TNF)- α inhibits adipocyte differentiation by selectively activating TNF receptor 1". *J. Biol. Chem.* 274; 26287-26295.

Xu, H. y Hotamisligil G.S. 2001 "Signaling pathways utilized by tumor necrosis factor receptor 1 in adipocytes to suppress differentiation". *FEBS Lett.* 506; 97-102.

Xu, H.; Uysal, K.T.; Becherer, J.D.; Arner, P. y Hotamisligil, G.S. 2002 "Altered Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α) Processing in Adipocytes and Increased Expression of Transmembrane TNF- α in Obesity." *Diabetes* 51, 1876-1883.