



**INSTITUTO POTOSINO DE INVESTIGACIÓN  
CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA, A.C.**

**Posgrado en Ciencias en Biología Molecular**

**Mecanismos de Acción de la Citocina Proinflamatoria TNF- $\alpha$   
Sobre el Tejido Adiposo: SerpinA3g Participa en la Inhibición  
de la Diferenciación Adiposa y la Resistencia a la Insulina  
Inducidas por esta Citocina**

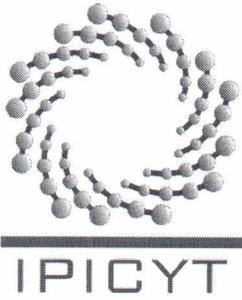
Tesis que presenta

**Rebeca Mejía Elizondo**

Para obtener el grado de  
**Doctora en Ciencias en Biología Molecular**

Director de la Tesis  
**Dr. Luis Antonio Salazar Olivo**

**San Luis Potosí, S.L.P., 30 de junio de 2014**



## Constancia de aprobación de la tesis

La tesis "*Mecanismos de Acción de la Citocina Proinflamatoria TNF- $\alpha$  Sobre el Tejido Adiposo: SerpinA3g Participa en la Inhibición de la Diferenciación Adiposa y la Resistencia a la Insulina Inducidas por esta Citocina*" presentada para obtener el Grado de Doctora en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por **Rebeca Mejía Elizondo** y aprobada el **treinta de junio del dos mil catorce** por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Dr. Luis Antonio Salazar Olivo  
**Director de la tesis**

Dr. J. Sergio Casas Flores  
**Miembro del Comité Tutorial**

Dra. Lina Raquel Riego Ruiz  
**Miembro del Comité Tutorial**

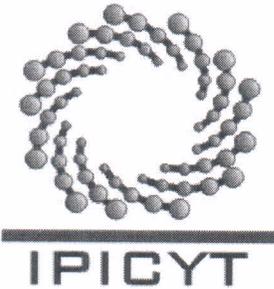
Dra. Patricia Ponce Noyola  
**Miembro del Comité Tutorial**



## **CRÉDITOS INSTITUCIONALES**

Esta tesis se realizó en el Laboratorio de Biotecnología Médica y Pecuaria de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C. bajo la dirección del Dr. Luis Antonio Salazar Olivo y fue financiada parcialmente por CONACyT (2004-C01-45804).

Durante la realización del trabajo la autora recibió una beca académica del CONACyT (141922) y apoyos especiales del IPICYT (SA-078/2005 y SA-222/2005).



# Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

## Acta de Examen de Grado

El Secretario Académico del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., certifica que en el Acta 071 del Libro Primero de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Doctorado en Ciencias en Biología Molecular está asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 30 días del mes de junio del año 2014, se reunió a las 12:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

<b>Dra. Patricia Ponce Noyola</b>	<b>Presidente</b>	<b>UGTO</b>
<b>Dr. J. Sergio Casas Flores</b>	<b>Secretario</b>	<b>IPICYT</b>
<b>Dra. Lina Raquel Riego Ruiz</b>	<b>Sinodal</b>	<b>IPICYT</b>
<b>Dr. Luis Antonio Salazar Olivo</b>	<b>Sinodal</b>	<b>IPICYT</b>

a fin de efectuar el examen, que para obtener el Grado de:

**DOCTORA EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR**

sustentó la C.

**Rebeca Mejía Elizondo**

sobre la Tesis intitulada:

*Mecanismos de Acción de la Citocina Proinflamatoria TNF- $\alpha$  Sobre el Tejido Adiposo: SerpinA3g Participa en la Inhibición de la Diferenciación Adiposa y la Resistencia a la Insulina Inducidas por esta Citocina.*

que se desarrolló bajo la dirección de

**Dr. Luis Antonio Salazar Olivo**

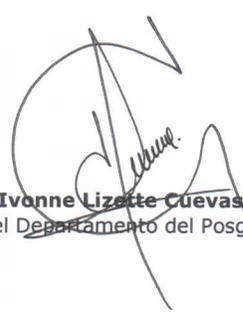
El Jurado, después de deliberar, determinó

**APROBARLA**

Dándose por terminado el acto a las 14:10 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fe el Secretario Académico del Instituto.

A petición de la interesada y para los fines que a la misma convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 30 días del mes de junio de 2014.

  
**Dr. Marcial Bonilla Marín**  
Secretario Académico

  
**Mtra. Ivonne Lizette Cuevas Vélez**  
Jefa del Departamento del Posgrado



*Solos podemos lograr muy poco; juntos,  
podremos hacer mucho.*

*Hellen Keller*

## DEDICATORIAS:

A Dios: porque a pesar de todos mis tropiezos nunca me has dejado sola, ¡Gracias porque sigo creyendo que aún sin verte siempre estás a mi lado!

A mis padres: por su confianza, apoyo y cariño, por haberme dado las alas para volar y porque cada vez que regreso a casa, sus palabras y abrazos me dan nuevas fuerzas para seguir adelante... ¡Los amo con todo mi corazón!

A mis hermanos: Liliana, Ana Ruth, Gloria y Jesús porque sin saberlo, siempre tuvieron un detalle que me ayudó a salir adelante en todos los momentos. ¡Los quiero muchísimo!

A mis sobrinos: Samuel, Daniela, Jesús Eduardo, Ana Sofía y Jethro porque cada vez que veo sus ojos me reflejan el amor de Dios.

A: Alma Delia, Angelina, Hortensia y Jorge, porque la distancia no es impedimento para estar juntos. Siempre están en mi corazón y en mis momentos de tristeza recuerdo todos sus consejos y los momentos que juntos hemos pasado.

A Claudia, Cytllalic y Jacqueline porque son el regalo más valioso que Dios me dió en el IPICyT.

A las familias Larrinaga-Aguilar y Hernández-Larrinaga. En especial a mi Tía Angelita, porque sin conocerme me abrieron su corazón y su cariño hizo que mi estancia en Guanajuato haya sido inolvidable, siempre las llevaré en mi corazón.

A la Sra. Ana María Medrano Llamas por su cariño siempre.

A mis compañeros de la ULIEG, del IPICyT, del IIBE y de la Facultad de Medicina de la UASLP porque de todos he aprendido cosas maravillosas que

siempre guardaré en mi corazón. ¡Gracias por haber hecho que mi estancia en estas instituciones haya sido especial y llena de increíbles momentos!

A los Doctores: Ricardo Espinosa Tanguma, Ulises Meza Villanueva, Sergio Sánchez-Armass, Rafael Rubio García, Lina Riego Ruíz, Ángel Alpuche Solís, Sergio Casas Flores, Rocío Ortiz López y de manera muy especial a Mireya Sánchez Garza por siempre estar pendientes de mi formación y de una u otra manera, impulsarme para la conclusión de esta tesis.

A la Dra. Agnès Revol de Mendoza, por haberme enseñado lo fascinante que es transmitir el conocimiento, por haberme escuchado cuando más lo necesité y por ser una Gran Maestra.

A las Doctoras Patricia Ponce Noyola y Carmen Cano Canchola, por todos los conocimientos transmitidos, por su paciencia y porque desde el primer día en el IIBE me hicieron sentir como en casa.

A mis alumnos de quienes todos los días aprendo cosas increíbles, gracias por sus sonrisas y entusiasmo que contagian siempre.

A mis compañeros de trabajo de la UCEM, ¡gracias por su buena vibra siempre!

Al Dr. Víctor Mateo Saavedra Alanis, por ser MI PAPÁ CIENTIFÍCO, gracias porque aún sin seguir siendo su estudiante, me dedicó su tiempo para asesorarme en mis experimentos, escuchar mis seminarios y siempre estar presente en esta tesis. Por seguir siendo la persona que me enseña cada día que cuando las cosas se hacen con amor y dedicación salen mejor.

Y a ti, Gilberto, por haber transformado estos últimos meses en los más maravillosos de mi vida, por impulsarme cada día a ser una mejor persona y porque cuando estamos juntos siento que nada es imposible. Te amo.

*¡Nunca dejes que nadie te diga que no puedes hacer algo. Ni siquiera yo. Si tienes un sueño ve por él...!*

*Steve Conrad*

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Dr. Luis Antonio Salazar Olivo por los apoyos económicos obtenidos para la realización de esta tesis.

A la Dra. Patricia Ponce Noyola del Departamento de Biología (IIBE), de la División de Ciencias Naturales y Exactas Campus Guanajuato, Universidad de Guanajuato y al Dr. Víctor Mateo Saavedra Alanis de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí por darme la oportunidad de integrarme a sus grupos de investigación y (por) su valiosa asesoría para la realización de esta tesis.

A la I.A.Z Cytllalic Rangel del Camino, al M. en C. Marco Aurelio Álvarez y al Dr. en C. Ángel J. Alonso Castro, por el apoyo técnico brindado para la realización de esta tesis.

A la Dra. Vilma Maldonado Lagunas y al Dr. Jorge Meléndez-Zajgla del Instituto Nacional de Cancerología por la obtención del RNA de interferencia así como de las líneas celulares modificadas.

A la Dra. Lina R. Riego Ruiz y el Dr. J. Sergio Casas Flores, miembros de mi Comité Tutorial, por sus aportaciones para mejorar este trabajo.

A los Dres. Jorge A. Alegría Torres y Ricardo Espinosa Tanguma por tomarse el tiempo para leer este manuscrito y con sus comentarios, enriquecerlo.

A todo el personal del IPICyT (profesores, estudiantes, personal administrativo, técnico y de intendencia) por ser parte importante de mi formación.

## CONTENIDO

<b>CONSTANCIA DE APROBACIÓN</b> .....	ii
<b>CRÉDITOS INSTITUCIONALES</b> .....	iii
<b>ACTA DE EXAMEN</b> .....	iv
<b>DEDICATORIAS</b> .....	vi
<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	ix
<b>CONTENIDO</b> .....	x
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	xii
<b>ABREVIATURAS</b> .....	xiv
<b>RESUMEN</b> .....	xvi
<b>ABSTRACT</b> .....	xvii
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>2. ANTECEDENTES</b> .....	2
2.1 Tejido adiposo	
2.2 Adipogénesis y sus inhibidores	
2.3 Citocinas proinflamatorias y tejido adiposo	
2.4 Inhibidores de serin-proteasas	
2.5 Análisis de expresión diferencial de genes	
2.6 Uso de siRNA como herramienta para el silenciamiento de genes	
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	20
3.1 Objetivo general	
3.2 Objetivos específicos	
<b>4. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	21
4.1 Cultivos celulares	

4.2 Despliegue diferencial	
4.3 Análisis de RT-PCR semi-cuantitativa	
4.4 Transfección del RNA de interferencia para SerpinA3g en células 3T3-F442A	
4.5 Ensayos de captura de 2-NBDG por adipocitos 3T3-F442A	
4.6 Análisis estadístico	
<b>5. RESULTADOS</b> .....	<b>27</b>
5.1 TNF- $\alpha$ pero no RA ni TGF- $\beta$ induce la expresión de SerpinA3g en células 3T3-F442A	
5.2 TNF- $\alpha$ induce la expresión de SerpinA3g tanto en preadipocitos como en adipocitos 3T3	
5.3 SerpinA3g media el efecto antiadipogénico de TNF- $\alpha$	
5.4 SerpinA3g media la resistencia a insulina inducida por TNF- $\alpha$	
<b>6. DISCUSIÓN</b> .....	<b>36</b>
<b>7. CONCLUSIONES</b> .....	<b>42</b>
<b>8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>43</b>
<b>9. ANEXO</b> .....	<b>60</b>

Artículo publicado en *The Citokine-Journal*

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Distribución del estado nutricional de hombres y mujeres de 20 años o más de acuerdo a la clasificación del Índice de Masa Corporal .....	2
<b>Figura 2.</b> Anomalías metabólicas implicadas con la obesidad .....	3
<b>Figura 3.</b> Componentes claves en el sistema de balance de energía .....	5
<b>Figura 4.</b> Principales moléculas sintetizadas en el tejido adiposo que actúan de manera local y sistémica.....	6
<b>Figura 5.</b> Factores de transcripción involucrados en la cascada de acontecimientos que dan lugar al inicio del programa adipogénico.....	7
<b>Figura 6.</b> Mecanismos por los que la inflamación altera la señalización de la insulina. ....	11
<b>Figura 7.</b> Representación esquemática de la técnica de despliegue diferencial .....	16
<b>Figura 8.</b> La expresión de genes selectivos puede ser silenciados por RNA de interferencia específicos.....	18
<b>Figura 9.</b> TNF- $\alpha$ induce la expresión de la SerpinA3g en preadipocitos 3T3-F442A.....	28
<b>Figura 10.</b> TNF- $\alpha$ induce la expresión de la SerpinA3g a lo largo de la vía adipogénica de las células 3T3-F442A.....	30
<b>Figura 11.</b> La SerpinA3g media el efecto antiadipogénico de TNF- $\alpha$ .....	31
<b>Figura 12.</b> La SerpinA3g media los efectos antiadipogénicos de TNF- $\alpha$	

pero no los del RA o TGF- $\beta$ .....	33
<b>Figura 13.</b> SerpinA3g media la resistencia a la insulina inducida por TNF- $\alpha$ .....	35
<b>Figura 14.</b> Posible mecanismo de acción de TNF- $\alpha$ en la línea celular para la inducción de la expresión de la SerpinA3g.....	39

## ABREVIATURAS

A/C/G/T	Adenina/Citosina/Guanina/Timina
AM	Medio Adipogénico
BLAST	Alineamiento de secuencias de tipo local, del inglés <b>Basic Local Alignment Search Tool</b>
BSA	Albúmina Sérica Bovina, del Inglés <b>Bovine Seric Albumin</b>
C/EBP	Proteínas de unión al potenciador CCAAT, del inglés <b>CCAAT/Enhancer Binding Proteins</b>
cDNA	Ácido Desoxirribonucleico Complementario
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
DEPC	Dietilpirocarbonato
DMEM	Medio Dulbecco's modificado por Eagle, del inglés <b>Dulbecco's Modified Eagle Medium</b>
GAPDH	Gliceraldehído Fosfato Deshidrogenasa
GLUT-4	Transportador de glucosa tipo 4
IFN- $\gamma$	Interferón $\gamma$
IKKB	Inhibidor de la cinasa de NF $\kappa$ B
IL-1	Interleucina 1
IL-6	Interleucina 6
IRS-1	Sustrato del receptor de insulina 1
mRNA	Ácido Ribonucleico Mensajero
NAM	Medio No Adipogénico
NF $\kappa$ B	Factor de transcripción nuclear $\kappa$ B

PAI-1	Inhibidor del activador del plasminógeno 1
PBS	Amortiguador salino de fosfatos
PPAR	Receptor nuclear activado por proliferadores peroxisomales, del inglés <b>P</b> eroxisome <b>P</b> roliferator- <b>A</b> ctivated <b>R</b> eceptor
RA	Ácido Retinoico
RT-PCR	Transcripción Reversa- Reacción en Cadena de la Polimerasa, del inglés <b>R</b> everse <b>T</b> ranscription- <b>P</b> olymerase <b>C</b> hain <b>R</b> eaction
TAB	Tejido adiposo blanco
TAM	Tejido adiposo marrón
TGB- $\beta$	Factor de Crecimiento Transformante Tipo $\beta$
TNF- $\alpha$	Factor de Necrosis Tumoral Tipo $\alpha$
siRNA	RNA de interferencia

## RESUMEN

### **Mecanismos de acción de la citocina proinflamatoria TNF- $\alpha$ sobre el tejido adiposo: SerpinA3g participa en la inhibición de la diferenciación adiposa y la resistencia a la insulina inducidas por esta citocina**

El factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) es un modulador del metabolismo del tejido adiposo. Sin embargo, los mecanismos por los cuales afecta el desarrollo y función de este tejido aún no son totalmente descritos. En este estudio se utilizó la técnica de despliegue diferencial, demostrando que la expresión del inhibidor de serin-proteasas A3g (Serpina3g) es inducida específicamente en preadipocitos 3T3-F442A por TNF- $\alpha$  pero no por otros inhibidores adipogénicos, como el ácido retinoico (AR) o el factor de crecimiento transformante tipo beta (TGF- $\beta$ ). La inducción de la SerpinA3g por TNF- $\alpha$  fue confirmada mediante RT-PCR tanto en preadipocitos, como en adipocitos diferenciados. Además, en células en las que se redujo la expresión de la Serpin3Ag, utilizando un RNA de interferencia (siRNA), se inhibió la antiadipogénesis inducida por TNF- $\alpha$  pero no la inducida por RA y TGF- $\beta$ . Adicionalmente las células 3T3-F442A que no expresan a la SerpinA3g no mostraron la resistencia a la insulina inducida por TNF- $\alpha$ . Nuestros resultados demuestran que la SerpinA3g es específicamente inducida por TNF- $\alpha$  en células 3T3F442A sin importar su estado de diferenciación, y que esta serpina participa en la antiadipogénesis y la resistencia a la insulina inducidas por esta citocina, sugiriendo que la SerpinA3g juega un papel en la modulación del desarrollo y metabolismo del tejido adiposo. Se requieren estudios adicionales para conocer los mecanismos que median los efectos de la SerpinA3g sobre el tejido adiposo.

**PALABRAS CLAVE:** TNF- $\alpha$ , 3T3 adipogénesis, resistencia a la insulina, SerpinA3g, siRNA.

## **ABSTRACT**

### **Mechanisms of action of the proinflammatory cytokine TNF- $\alpha$ on adipose tissue: SerpinA3g involved in the inhibition of adipose differentiation and insulin resistance induced by this cytokine**

Tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ) is a proven modulator of adipose metabolism, but the mechanisms by which this cytokine affects the development and function of adipose tissue have not been fully elucidated to date. Using differential display analysis, in this study, we demonstrate that gene expression of the serine protease inhibitor A3g (Serpina3g) is specifically induced in 3T3-F442A preadipocytes by TNF- $\alpha$  but not by other adipogenic inhibitors, such as retinoic acid (RA) or transforming growth factor type beta (TGF- $\beta$ ). The specific induction of SerpinA3g by TNF- $\alpha$  was confirmed by RT-PCR in both preadipose and terminally differentiated 3T3-F442A cells. The knockdown of SerpinA3g using small interfering RNA prevented the antiadipogenesis elicited by TNF- $\alpha$  in 3T3-F442A cells but not the antiadipogenesis induced by RA or TGF- $\beta$ . SerpinA3g-silenced 3T3-F442A cells also did not display TNF- $\alpha$ -induced insulin resistance. Our results demonstrate that SerpinA3g is specifically induced by TNF- $\alpha$  in 3T3-F442A cells, regardless of their stage of differentiation, and participates in the antiadipogenesis and insulin resistance induced by this cytokine. Our results suggest that SerpinA3g plays a role in the TNF- $\alpha$  modulation of adipose tissue development and metabolism. Additional studies are warranted regarding the mechanisms mediating adipose SerpinA3g effects.

**KEYWORDS:** TNF- $\alpha$ , 3T3 adipogenesis, insulin resistance, SerpinA3g, siRNA.

## 1. INTRODUCCIÓN

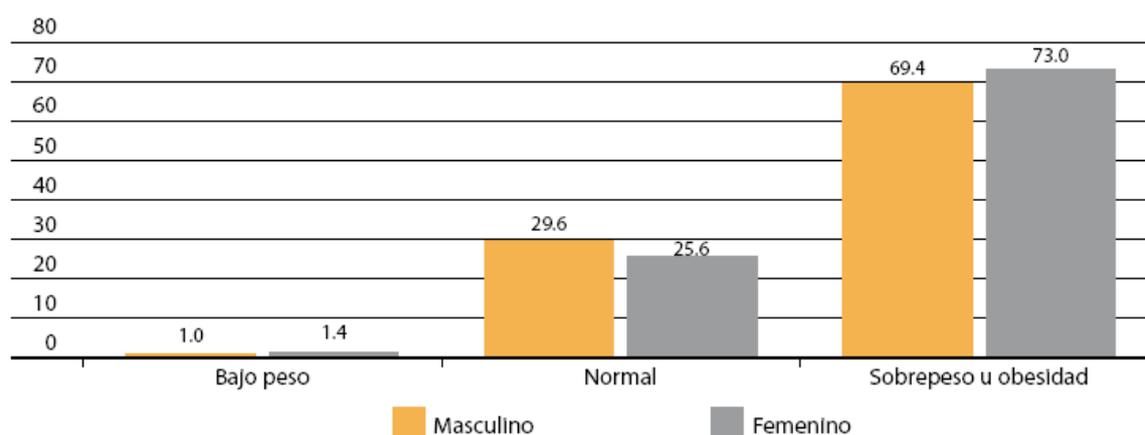
La resistencia a la insulina es un estado comúnmente asociado a la obesidad y a la diabetes (Diabesidad). Estudios realizados tanto en animales como en humanos demuestran que la ganancia o pérdida de peso se correlaciona con una peor o mejor sensibilidad a la insulina, respectivamente. Se han propuesto varios factores que podrían relacionar la obesidad con la resistencia a la insulina. Entre los candidatos están los ácidos grasos libres, el TNF- $\alpha$ , la leptina y la angiotensina, todos ellos secretados por el tejido adiposo (Kershaw y Flier, 2004).

TNF- $\alpha$  es una citocina secretada principalmente por el tejido adiposo y que ejerce sus efectos autocrinos y paracrinos, induciendo resistencia a la insulina (Shoelson, *et al.*, 2006). También se sabe que esta citocina inhibe la diferenciación adipocítica bloqueando la actividad de PPAR $\gamma$ , el cual es un factor de transcripción esencial para la expresión de genes adipogénicos (Cawthorn WP, *et al.*, 2007). Además, se ha descrito que TNF- $\alpha$  es capaz de reducir la captura de glucosa interfiriendo con la vía de señalización de insulina y la disminución de la expresión de Glut-4 en adipocitos de humano y de ratón (Lorenzo M., *et al.*, 2007).

Aunque se conocen algunos elementos de la vía de señalización de TNF- $\alpha$ , los cuales incluyen la activación de NF $\kappa$ B que desencadena una respuesta inflamatoria en el tejido adiposo (Ruan H, *et al.*, 2002), los mecanismos moleculares por los cuales ejerce este efecto aún no se conocen completamente.

## 2. ANTECEDENTES

La obesidad es un problema crónico caracterizado por un exceso de grasa corporal, de elevada prevalencia y de demanda asistencial creciente. Es considerada como una verdadera epidemia del siglo XXI, viéndose incrementada a nivel mundial. Según la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2012 (ENSANUT) siete de cada diez adultos mexicanos presentan sobrepeso y de estos la mitad presentan obesidad lo que constituye un serio problema de salud pública debido a su asociación con el riesgo de enfermedades crónicas no transmisibles (Fig.1).



*Figura 1. Distribución del estado nutricional de hombres y mujeres de 20 años o más de acuerdo a la clasificación del Índice de Masa Corporal. México, ENSANUT 2012, (www.insp.mx).*

La etiología de la obesidad incluye factores genéticos y ambientales que interactúan de forma compleja dando como resultado un incremento excesivo de la masa corporal adiposa, debido a la acumulación de grasa en el tejido y al decremento en el gasto energético. La obesidad implica un riesgo para la salud dado que lleva asociada todo un conjunto de anomalías metabólicas que se

conocen como el síndrome metabólico. Éstas incluyen: *diabetes mellitus* tipo II, dislipidemias, enfermedades cardiovasculares, hipertensión arterial y ciertos tipos de cáncer (Fig. 2).

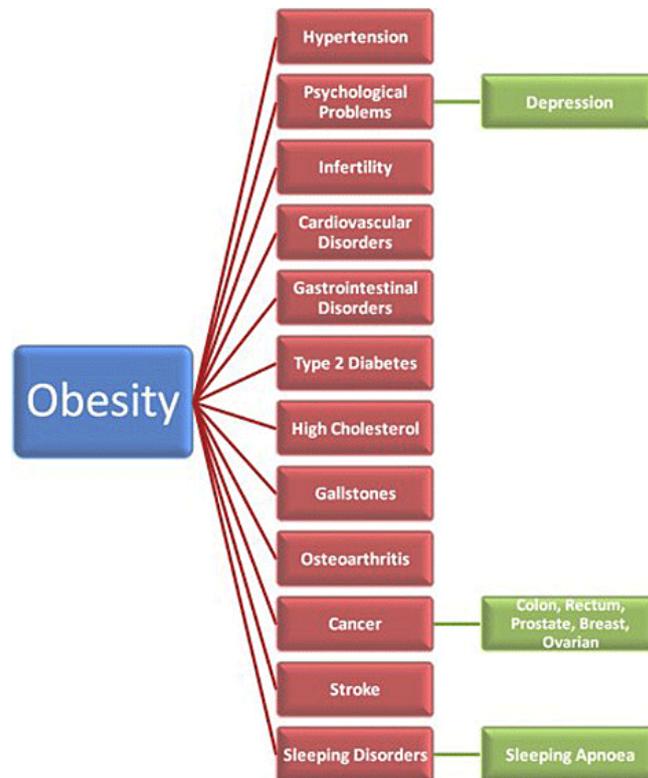


Figura 2. Anomalías metabólicas implicadas con la obesidad. Modificada de Flores-Lázaro et al., 2011.

Una de las complicaciones más graves de la obesidad es la resistencia a la insulina dado a que está directamente relacionada con la aparición de diabetes tipo II (Rabe, et al., 2008). La insulina es la hormona más importante del control y mantenimiento del tejido adiposo. Actúa facilitando la acumulación de triglicéridos mediante la estimulación de la lipoproteína lipasa, inhibiendo la lipólisis, aumentando la captación de glucosa y actuando en la diferenciación de preadipocitos en adipocitos maduros. Son muchos los factores que inducen esta resistencia a la insulina pero los mecanismos por los cuales ocurre aún no se han descrito completamente. De hecho, en los últimos años nuevos estudios

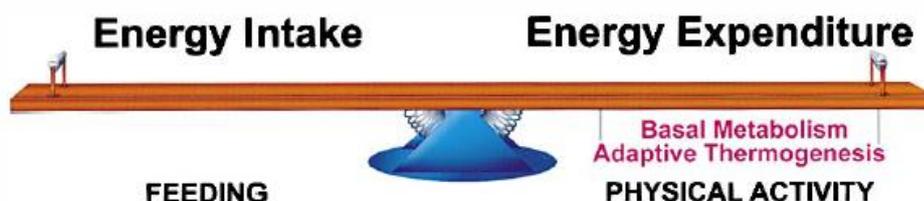
han mostrado la relación que existe entre la obesidad, la resistencia a la insulina y la aterosclerosis, los cuales no están solo asociados a las hiperlipidemias sino también a estados de inflamación en donde el adipocito tiene un papel central (Berg *et al.*, 2004). Dado el aumento de casos de obesidad en el mundo y la relevancia que tiene conocer los procesos biológicos por los que se induce la resistencia a esta hormona, es importante el estudio de los factores y los mecanismos requeridos para la generación de nuevos adipocitos, así como de las sustancias que el adipocito secreta y que ocasionan estas severas complicaciones. Conocer estos mecanismos ampliará el panorama en el desarrollo de terapias antiobesidad con blancos más específicos y efectivos.

## **2.1 Tejido adiposo**

Los animales se encuentran constantemente bajo la amenaza de la falta de alimento, por lo que el almacenamiento de energía en su cuerpo es esencial para la mayoría de sus actividades (Spiegelman *et al.*, 1993). El tejido adiposo juega un papel crucial en la regulación y la disfunción patológica de la homeostasis energética. En mamíferos, la homeostasis energética es un compromiso entre el aporte y el gasto energético y en buena parte, el equilibrio se consigue a través de la respuesta coordinada entre el sistema nervioso y los tejidos adiposos, siendo estos últimos la fuente principal de reserva del organismo y también el sistema de disipación energética (Valenzuela A. y Sanhueza J., 2009).

Situaciones como la ingesta de alimentos, la gestación, la regulación de la temperatura corporal y el ejercicio físico, son procesos que determinarán el

balance energético y en última instancia afectarán el peso corporal (Fig. 3). La producción o movilización de las reservas lipídicas se llevará a cabo en función del excedente calórico procedente de la dieta o de la carencia energética dada en situaciones de ayuno, respectivamente.



*Figura 3. Componentes claves en el sistema de balance de energía. Tomada de Spiegelman y Flier, 2001.*

En humanos se ha demostrado ampliamente que la diferenciación de la célula adiposa y la acumulación de grasa en la misma, son procesos fuertemente relacionados con la aparición y desarrollo de la obesidad (Ramaclé y Grégoire, 1992). En mamíferos, existen dos tipos de tejidos adiposos: el Tejido Adiposo Blanco (TAB) y el Tejido Adiposo Marrón (TAM). Ambos tienen capacidad de metabolizar y almacenar lípidos; sin embargo, sus funciones son diferentes. El TAM tiene como función permitir la disipación de energía en forma de calor en vez del almacenamiento de ésta. El TAB, que es el tejido adiposo mayoritario, está extensamente distribuido por todo el cuerpo en grandes cantidades y contiene varios tipos celulares, como son: adipocitos, en los cuales se almacenan las gotas de grasa; preadipocitos, fibroblastos, células endoteliales de los vasos sanguíneos y macrófagos (Esteve, 2013). Aunque tradicionalmente se consideraba al TAB como un reservorio pasivo de energía,

actualmente se sabe que juega un papel mucho más activo en la regulación del metabolismo y la homeostasis corporal (Ailhaud, 2006; Havel, 2004; Kershaw y Flier, 2004; Guerre-Millo, 2002) mediante la secreción de factores endocrinos y paracrinos, denominados grupalmente adipocinas (Frühbeck *et al.*, 2001) (Fig. 4).

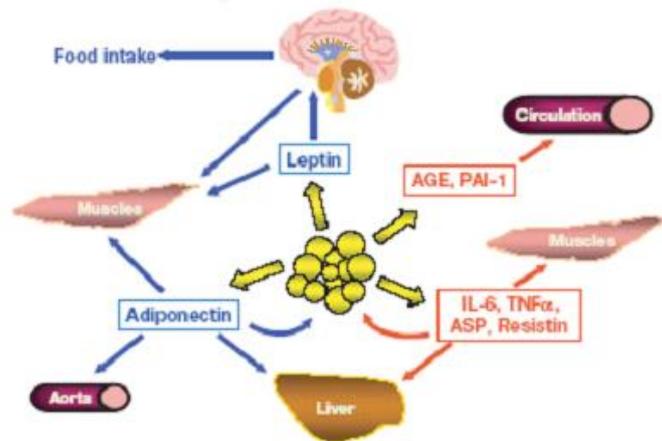


Figura 4. Principales moléculas sintetizadas en el tejido adiposo que actúan de manera local y sistémica. Tomada de Kershaw y Flier, 2004.

## 2.2 Adipogénesis y sus inhibidores

Los cambios en la cantidad de masa de tejido adiposo pueden estar asociados con cambios en el número y/o en el tamaño del adipocito (Kawada *et al.*, 2001) procesos conocidos como hiperplasia e hipertrofia respectivamente. Los procesos de captura de ácidos grasos, lipogénesis y lipólisis pueden alterar el tamaño del adipocito. Sin embargo, los cambios en el número de adipocitos se dan por cambios en la maduración de preadipocitos a través del proceso conocido como adipogénesis (Grégoire *et al.*, 1998; Gonzalez, 2005).

La adipogénesis se inicia por la producción de dos factores de transcripción claves en el proceso, las proteínas  $\alpha$  de unión al potenciador CCAAT (C/EBP $\alpha$ ) (Darlington *et al.*, 1998) y los receptores  $\gamma$  nucleares

activados por proliferadores peroxisomales (PPAR $\gamma$ ) (Chawla *et al.*, 1994) los cuales son responsables de la expresión de genes específicos del adipocito como son los genes codificantes para la sintasa de ácidos grasos (FAS), la glicerol 3-fosfato deshidrogenasa (G3PDH), la acetil-CoA carboxilasa (ACO), el receptor de glucosa GLUT-4 y el receptor de insulina entre otros (Rangwala y Lazar, 2000; Rosen *et al.*, 2000; Tong y Hotamisligil, 2001) (Fig. 5). La adipogénesis es regulada por diversas señales, las cuales ejercen efectos positivos o negativos sobre el proceso (Ntambi y Kim, 2000). Estos factores pueden ser de origen adipocítico o preadipocítico o venir de otras fuentes (Warne, 2003).

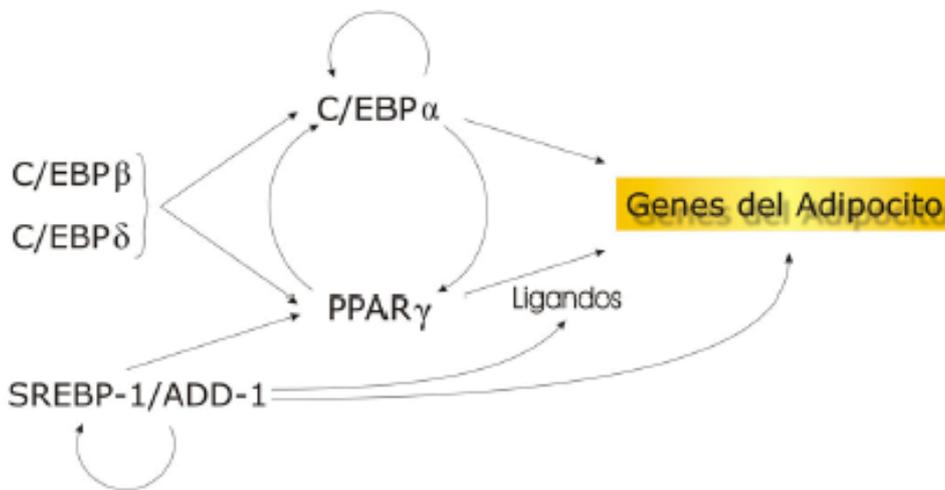


Figura 5. Factores de transcripción involucrados en la cascada de acontecimientos que dan lugar al inicio del programa adipogénico. Modificada de Tong *et al.*, 2000.

En nuestro laboratorio trabajamos con un modelo experimental *in vitro* para comprender la generación de nuevas células adiposas, los preadipocitos 3T3-F442A de ratón (Green y Kehinde, 1976). Este modelo permite estudiar ventajosamente los mecanismos moleculares de la adipogénesis. Inicialmente, los preadipocitos proliferantes salen del ciclo celular, normalmente mediante procesos de inhibición por contacto (Holley y Kiernan, 1968). Para estimular la

adipogénesis en estas células, se tratan con inductores adipogénicos que incluyen factores séricos (Kuri-Harcuch y Green, 1978), cuya naturaleza aún es desconocida, así como insulina. Los inductores de adipogénesis promueven a los preadipocitos a llevar a cabo una o dos rondas de expansión clonal antes de iniciarse los procesos de activación transcripcional de genes marcadores del adipocito y la adquisición del fenotipo adipocitario (Shao y Lazar, 1997). El proceso de adipogénesis habitualmente se describe como una cascada de eventos genéticos (MacDougald y Lane, 1995). A través de este proceso, en el citoplasma de la célula van apareciendo gotas lipídicas y a lo largo del tiempo, éstas irán incrementando y fusionándose hasta formar una o dos grandes gotas lipídicas que ocuparán gran parte del citoplasma.

Las señales que reprimen la diferenciación del adipocito son igualmente importantes para determinar el destino de los preadipocitos. Se han descrito una gran variedad de agentes y factores que interfieren con el proceso como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) (Filipak *et al.*, 1988; Hotamisligil *et al.*, 1993); el factor de crecimiento transformante tipo beta (TGF- $\beta$ ) (Ignotz y Massagué, 1985; Torti *et al.*, 1989) y el ácido retinoico (RA) (Kuri-Harcuch, 1982).

El TNF- $\alpha$  se considera un inhibidor de la diferenciación adiposa *in vitro* (Xu y Hotamisligil, 2001). El TNF- $\alpha$  secretado o unido a membrana mediante el receptor tipo 1 del TNF- $\alpha$  (TNFR1) inhibe la adipogénesis a través de la vía de NF $\kappa$ B mediante el bloqueo de la inducción de PPAR $\gamma$  y C/EBP $\alpha$  (Zhang *et al.*, 1996).

Otro potente regulador del desarrollo de la célula mesenquimal es el TGF- $\beta$ . La capacidad de estimulación de la proliferación de los preadipocitos y

la inhibición de la adipogénesis *in vitro* por TGF- $\beta$  exógeno está bien documentada (Choy *et al.*, 2000). Acorde con esto, la diferenciación adiposa de ratones transgénicos que sobre-expresan el gen que codifica para el TGF- $\beta$  está significativamente disminuida (Clouthier *et al.*, 1997). La secreción de TGF- $\beta$  activo y la capacidad de los receptores de TGF- $\beta$  decrecen durante la diferenciación, indicando que TGF- $\beta$  es una señal producida de manera endógena que actúa manteniendo a los preadipocitos en un estado indiferenciado.

Otro inhibidor importante del proceso adipogénico es el ácido retinoico (RA) el cual se obtiene de la dieta como derivado de la vitamina A, por oxidación enzimática del retinol. Durante varios años, la capacidad del RA de afectar varios procesos de diferenciación, incluyendo las fases terminales de la diferenciación del adipocito, ha sido ampliamente reconocida. Cuando se usa en concentraciones supra-fisiológicas, el RA inhibe la diferenciación adiposa de líneas celulares y de preadipocitos primarios de cerdo (Dimaculangan *et al.*, 1994; Suruyawan y Hu., 1997). Ha sido ampliamente demostrado que el RA actúa en las fases tempranas del proceso de diferenciación ya que sólo es capaz de bloquear la diferenciación cuando es añadido en estadios tempranos del proceso (conjuntamente con los inductores adipogénicos), mientras que si las células ya han llegado a los estadios finales de diferenciación, el tratamiento con RA ya no es efectivo (Stone y Bernlohr, 1990; Klein *et al.*, 2000). Este hecho se corrobora con las observaciones de que el tratamiento con RA previene la inducción de C/EBP $\alpha$  e interfiere con los mecanismos que inducen, a la vez que mantienen la expresión de PPAR $\gamma$  (Xue *et al.*, 1996). Además, investigaciones recientes indican que el efecto inhibitorio del ácido

retinoico ocurre antes de la expresión de PPAR $\gamma$ , mediante el bloqueo de la inducción de C/EBP $\beta$  (Schwarz *et al.*, 1997).

Cabe mencionar que éstos no son los únicos inhibidores del proceso adipogénico pero si, los más estudiados (Harp, 2004).

### **2.3 Citocinas proinflamatorias y tejido adiposo**

El tejido adiposo secreta una gran variedad de productos que pueden ejercer efectos locales o sistémicos. Entre ellos se encuentran citocinas proinflamatorias como la interleucina 1 (IL-1), interleucina 6 (IL-6), el interferón gamma (IFN- $\gamma$ ) y el TNF- $\alpha$  (Grégoire *et al.*, 1992; Ohsumi *et al.*, 1994). Estas citocinas son inhibidores de la diferenciación adiposa *in vitro* y pueden jugar un papel importante en la atrofia del tejido adiposo. TNF- $\alpha$  ha recibido particular atención, dado su papel regulador en la cantidad de masa de tejido adiposo. El TNF- $\alpha$  es sintetizado y secretado en el adipocito (Kern *et al.*, 1995), por lo que juega un papel paracrino y autocrino en el control de la función adiposa. Además se ha reportado que TNF- $\alpha$  al participar en el desarrollo del proceso inflamatorio está directamente relacionado con la inducción de resistencia a la insulina (Popa *et al.*, 2007). Varios mecanismos se han propuesto para tratar de explicar como TNF- $\alpha$  induce resistencia a la insulina tanto en adipocitos como sistémicamente. TNF- $\alpha$  inhibe la fosforilación en tirosinas por parte del receptor de insulina al parecer por la fosforilación en residuos de serina de los IRS-1. La cinasa del inhibidor de NF $\kappa$ B (el IKK-B) se ha identificado como una cinasa celular responsable de la fosforilación de los IRS-1 en respuesta a TNF- $\alpha$  (Hotamisligil *et al.*, 1994). Además TNF- $\alpha$  estimula lipólisis en el tejido adiposo (Yuan *et al.*, 2001) lo que da como resultado un incremento en la

concentración de ácidos grasos libres los cuales contribuyen al desarrollo del fenotipo de resistencia a la insulina. Otro efecto importante de TNF- $\alpha$  es que se ha reportado que induce la activación de NF $\kappa$ B lo que se asocia con una represión de muchos genes involucrados en la captura y almacenamiento de ácidos grasos libres y glucosa en el adipocito (Fig. 6). Esto sugiere que NF $\kappa$ B activado en respuesta a TNF- $\alpha$ , media los cambios en las proteínas del adipocito que son esenciales para conducir a una resistencia a la insulina (Ruan *et al.*, 2002).

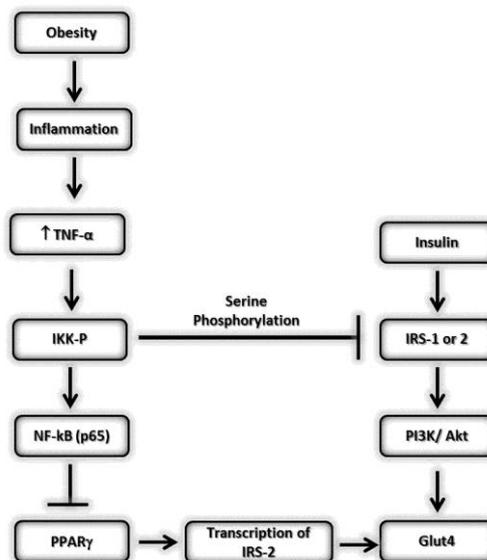


Figura 6. Mecanismos por los que la inflamación altera la señalización de la insulina.

Modificada de Ye J, 2009.

## 2.4 Inhibidores de serin-proteasas y tejido adiposo

Las enzimas proteolíticas o proteasas, son enzimas que catalizan la ruptura hidrolítica de enlaces peptídicos específicos en sus proteínas blanco. Estas enzimas están ampliamente distribuidas en plantas, animales y microorganismos (Laskowski y Kato, 1980; Bale y Huber, 1993; Christeller,

2005; Joanitti *et al.*, 2006). En organismos superiores, cerca del 2% de los genes codifican para estas enzimas (Barrett, *et al.*, 2001). Las proteasas desempeñan un papel clave en muchos procesos biológicos, siendo indispensables para el mantenimiento y la supervivencia de los organismos. Las proteasas se clasifican como cisteína, aspartato, serina y metalo proteasas, según las características de su sitio activo (Barrett, 1986). A pesar de que las enzimas proteolíticas son indispensables para las células y organismos, pueden ser dañinas cuando se encuentran en exceso. Por ello estas actividades deben estar reguladas y controladas (Laskowski y Kato, 1980; Rawlings *et al.*, 2004). Las formas de controlar a estas enzimas son varias y se pueden mencionar por ejemplo, la síntesis como pre-proteínas inactivas, la especificidad de sustrato y la interacción con proteínas que puedan inhibirlas.

Los inhibidores de proteinasas son el factor más importante de control de las enzimas proteolíticas, los cuales forman complejos con proteínas blanco para inactivarlos. Estos inhibidores son muy comunes y están ampliamente distribuidos en todos los organismos. Han sido aislados y caracterizados de plantas, animales y microorganismos (Christeller, 2005). Los inhibidores de proteasas han sido agrupados en distintas familias o subfamilias según sus secuencias o estructuras de los dominios respectivamente. Unos de los inhibidores más importantes en organismos superiores son los inhibidores de serin-proteasas conocidos también como serpinas (serine proteinase inhibitors) que son una superfamilia de proteínas de 350 a 500 aminoácidos, relacionadas estructuralmente y así denominadas por su actividad inhibidora de las serin-proteasas. Cumplen con una variedad de funciones dependiendo del tejido en

donde se expresen; por ejemplo, se encuentran involucradas en la conversión y el transporte hormonal, la inhibición de las cascadas proinflamatorias, activación del complemento, fibrinólisis y angiogénesis, (Law *et al.*, 2006). Se han identificado más de 500 serpinas diferentes (Potempa *et al.*, 1994; Silverman *et al.*, 2001).

Como se ha mencionado, el tejido adiposo secreta una gran variedad de proteínas que cumplen con papeles importantes en el metabolismo y recientemente se han descrito nuevas proteínas secretadas por este tejido que pertenecen a la superfamilia de las serpinas como los son visfatina, vaspina y el Inhibidor 1 del Activador del Plasminógeno (PAI-1) (Fukuhara *et al.*, 2005; Hida *et al.*, 2005; Pandey *et al.*, 2005; Liang *et al.*, 2006; Scroyen *et al.*, 2007).

La visfatina es una molécula secretada por los adipocitos viscerales, idéntica a una citocina derivada de los linfocitos identificada como un factor estimulante de colonias pre-B más de una década atrás. Este factor, inhibe la apoptosis de neutrófilos activados y ha sido relacionado con procesos inflamatorios, incluyendo lesión pulmonar aguda. La visfatina se une y activa al receptor de insulina mediante un sitio diferente del de la insulina. Los estudios recientes sugieren que la visfatina podría ser un importante regulador inmunitario con propiedades proinflamatorias potenciales (Fukuhara *et al.*, 2005).

El Inhibidor de serin-proteasas derivado del tejido adiposo visceral (vaspina) es un nuevo miembro de la superfamilia de las serpinas cuyo peso fluctúa entre 45 y 50 kDa. La expresión de la vaspina es específica del tejido adiposo y es regulada por PPAR $\gamma$ . La administración de vaspina humana recombinante mejora la sensibilidad a la insulina y la tolerancia a la glucosa y

normaliza la expresión génica del tejido adiposo en modelos murinos de obesidad inducida por la dieta (Hida *et al.*, 2005). En los seres humanos, la expresión de vaspina no se encuentra limitada al tejido adiposo visceral sino que comprende el subcutáneo. La expresión de vaspina presenta correlación con el nivel de adiposidad y su detección es infrecuente en sujetos delgados (Hida *et al.*, 2005).

PAI-1 es otro miembro de la superfamilia de las serpinas, secretado al menos en parte por los adipocitos. PAI-1 es el inhibidor primario de la fibrinólisis e inactiva al activador del plasminógeno y también podría estar involucrado en la angiogénesis y aterogénesis. Como sucede con muchos factores secretados por adipocitos, su expresión y secreción son máximas en depósitos grasos viscerales. Los niveles circulantes de PAI-1 se encuentran aumentados en el síndrome metabólico. La mejoría de la sensibilidad a la insulina mediante la pérdida de peso o el tratamiento con metformina o tiazolidinedionas reduce los niveles circulantes de PAI-1. Por lo tanto, el PAI-1 es más que un biomarcador del síndrome metabólico y, en contraste con vaspina, tiene efectos negativos que pueden contribuir al estado inflamatorio pro coagulante de la obesidad (Pandey *et al.*, 2005; Liang *et al.*, 2006; Scroyen *et al.*, 2007).

Se han realizado estudios de transcriptómica (Ruan *et al.*, 2002; Bolduc *et al.*, 2004) y proteómica (Kratchmarova *et al.*, 2002; Zvonic *et al.*, 2007) en donde se han descrito más serpinas expresadas en el tejido adiposo; sin embargo, el papel de muchas de ellas sigue sin ser explorado.

## **2.5 Análisis de expresión diferencial de genes**

Los organismos superiores contienen alrededor de 30,000 genes diferentes, de los cuales, sólo una pequeña fracción, probablemente un 15%, se expresan en cada célula individual. Es ésta elección la que determina procesos biológicos como crecimiento, desarrollo, diferenciación, homeostasis, respuesta a estímulos, la regulación del ciclo celular, envejecimiento e incluso muerte celular programada (Hu *et al.*, 1996). El curso del desarrollo normal, así como los cambios patológicos que se producen durante enfermedades, ya sean causadas por una única mutación génica o por complejos efectos multigenéticos, es dirigido por cambios en la expresión génica (Beardsley, 1991).

La identificación y caracterización de los genes expresados diferencialmente, es la base en el entendimiento de los procesos moleculares que regulan los aspectos de la biología de los organismos, lo cual es importante en muchos campos de la biología moderna como la medicina. De allí, que a través del tiempo se han diseñado estrategias para clonar y/o conocer genes expresados diferencialmente como son la hibridación sustractiva (Diatchenko *et al.*, 1996), los micro arreglos (Schena, 1996), el análisis serial de la expresión génica (SAGE), (Velculescu *et al.*, 1995) y el despliegue diferencial (DD), (Liang y Pardee., 1992).

El despliegue diferencial es una de las metodologías más utilizadas debido a las ventajas que ofrece. Este método, descrito en 1992 por Liang y Pardee, permite identificar genes que se expresan diferencialmente comparando subgrupos de DNA complementario (cDNA, se sintetiza a partir de

mRNA) amplificados arbitrariamente mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Liang y Pardee, 1998) (Fig. 7).

Una estrategia ampliamente usada para estudiar el desarrollo del tejido adiposo, ha sido el análisis de los mecanismos de acción de compuestos que inhiben la diferenciación de las células adiposas; sin embargo, a pesar de los conocimientos que se han generado, los mecanismos de acción de estos inhibidores no se conocen a detalle (Boeuf *et al.*, 2001; Boeuf *et al.*, 2002). La comprensión detallada de la adipogénesis demanda el entendimiento de los patrones de expresión génica durante el proceso; es decir, que genes se encuentran encendidos o apagados en éste, y en qué vías metabólicas o mecanismos celulares están éstos involucrados, por lo que el conocer como se encuentra la expresión génica en presencia de estos compuestos que inhiben la adipogénesis, puede ser de gran utilidad para comprender el proceso.

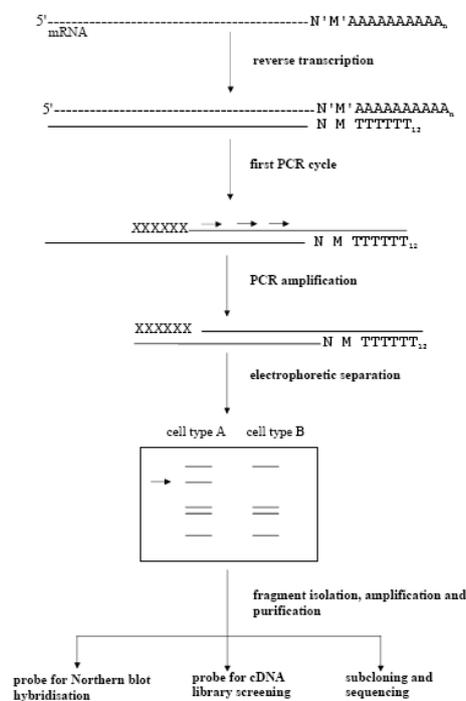


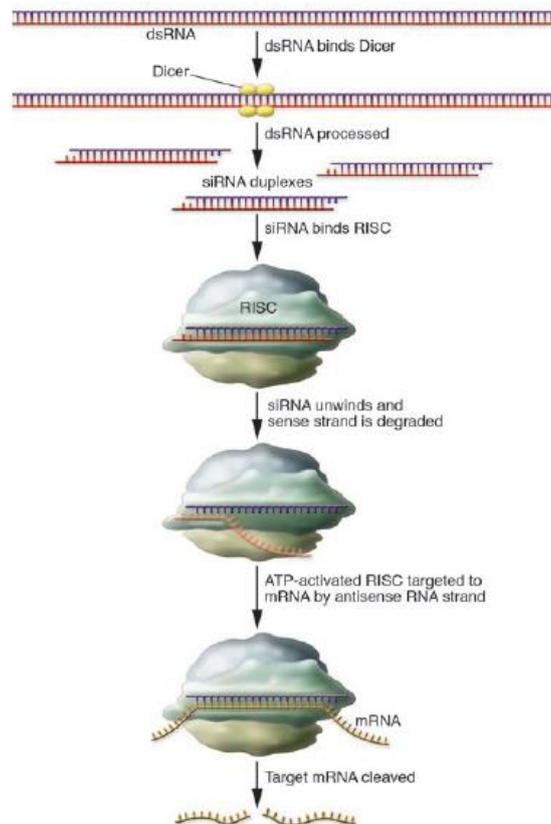
Figura 7. Representación esquemática de la técnica de despliegue diferencial. Tomada de Colonna-Romano *et al.*, 1998.

## **2.6 Uso de siRNA como herramienta para el silenciamiento de genes**

Una de las principales estrategias utilizadas en la investigación científica para el estudio de los distintos mecanismos celulares se denomina “pérdida de función”. Este concepto se refiere a la eliminación específica de la función de una proteína en la célula para después evaluar los cambios y así definir el papel que juega dicha proteína. La anulación de la función se puede hacer de varias maneras. Una de las más antiguas es la de inducir una mutación en el gen ocasionando la pérdida de la función de la proteína. Una segunda técnica es la de inactivar genes (*gene knockout*) en donde el gen que genera a la proteína de interés, no es expresado en la célula (Mansour, 1990).

El silenciamiento por RNA es un mecanismo altamente conservado en la naturaleza, en el que moléculas de RNA de doble cadena regulan la expresión de genes, por lo que la interferencia del RNA es otra herramienta molecular muy eficiente para reducir la expresión de un gen (Dykxhoorn y Lieberman, 2005; Sen *et al.*, 2006). Además es una estrategia fácil y rápida para degradar mRNA mediante la introducción de un RNA pequeño de doble cadena (siRNA) homólogo al mRNA celular de interés removiéndolo específicamente con base a la secuencia nucleotídica. Se trata de un mecanismo específico ya que el silenciamiento génico se basa en la complementariedad de bases entre la molécula de siRNA y la molécula de mRNA. Si la complementariedad de bases es perfecta se producirá la hidrólisis del mensajero mientras que, si no lo es, simplemente se inhibirá la traducción al impedir la unión del ribosoma. El mecanismo mejor caracterizado es aquel que se inicia con la incorporación a la célula de una molécula larga de ARN de cadena doble, conocida como dsRNA (Double-Stranded RNA). En el citoplasma la molécula de dsRNA es reconocida

por la enzima Dicer que la fragmenta en pequeñas moléculas de cadena doble, llamadas siRNA (Small Interfering RNA). Cada molécula de siRNA es incorporada a un complejo multiproteico conocido como RISC (RNAi Silencing Complex). Este complejo separa las dos hebras de la molécula de siRNA quedándose una de las hebras incorporada en el complejo. La hebra que queda en el complejo es usada como molde para reconocer a la molécula de mRNA, si la complementariedad con el mRNA diana es perfecta el complejo RISC degrada este mRNA (Fig. 8). Si por el contrario la complementariedad no es perfecta, el complejo RISC no degrada el mRNA pero sí evita la unión del ribosoma. En cualquiera de los dos casos se produce el silenciamiento del gen complementario a la secuencia de la molécula de siRNA.



*Figura 8. La expresión de genes selectivos puede ser silenciada por RNAs de interferencia específicos (siRNAs). Tomada de Gewirtz, 2007.*

En este trabajo utilizamos despliegue diferencial para poder identificar genes que se expresan de manera diferencial en células 3T3-F442A tratadas con TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$  y RA, inhibidores probados de la diferenciación adiposa. Una vez identificados y confirmada la expresión diferencial de estos genes seleccionamos a la SerpinA3g inducida específicamente por el inhibidor de la adipogénesis TNF- $\alpha$ . Esta molécula resulto de interés debido a que, como se mencionó, en los últimos años varias serpinas han sido descritas en el tejido adiposo cumpliendo un papel importante en su función. Para conocer el papel de la SerpinA3g en el tejido adiposo se construyó un siRNA de la serpina que se utilizó para transfectar células 3T3-F442A lo que nos permitió evaluar si esta molécula tenía un papel en la antiadipogénesis y la resistencia a la insulina inducida por TNF- $\alpha$ . Nuestros resultados muestran que la SerpinA3g participa en estos dos procesos lo que nos da una nueva pieza de información para conocer más detalles sobre el funcionamiento del tejido adiposo.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo General:**

Analizar los cambios en la expresión génica de preadipocitos 3T3-F442A inducida por diferentes inhibidores de la adipogénesis mediante la técnica de despliegue diferencial con el propósito de entender más sobre los mecanismos moleculares involucrados en el proceso adipogénico.

#### **3.2 Objetivos Específicos:**

- Aislar e identificar genes de la línea 3T3-F442A en presencia de diversos inhibidores del proceso adipogénico mediante despliegue diferencial.
- Analizar la participación de algunos de los genes identificados en los mecanismos de la diferenciación adiposa y otros mecanismos relacionados.
  - Confirmar la expresión diferencial de la SerpinA3g en presencia de TNF- $\alpha$ .
  - Estudiar el papel de la SerpinA3g en la antiadipogénesis y la resistencia a la insulina inducida por TNF- $\alpha$ .

## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1 Cultivos Celulares

Los preadipocitos 3T3-F442A (Dr. W. Kuri-Harcuch, CINVESTAV, México, D.F.) se cultivaron en medio DMEM (GIBCO BRL, Grand Island, NY) suplementado con 7% de suero de ternera (HyClone, Logan, UT). Para los ensayos de despliegue diferencial y los ensayos de RT-PCR, se usaron células preconfluentes que se indujeron a diferenciación con medio adipogénico (AM; DMEM conteniendo 7% de suero de ternera, 5 µg/ml de insulina y 1 µM de d-biotina) o AM adicionado con 10 ng/ml TNF- $\alpha$  (Preprotech, London, UK), 60 pM de TGF- $\beta$  (Preprotech), o 1 µM RA (Sigma Chem., St. Louis MO) concentraciones que se ha reportado inhiben la diferenciación adiposa. Cultivos en paralelo se trataron con medio no adipogénico (NAM, DMEM conteniendo 4% de suero de gato, 5 µg/ml de insulina y 1 µM de d-biotina) como controles no diferenciados (Kuri-Harcuch *et al.*, 1978). Los cultivos se mantuvieron a 37°C en una atmósfera húmeda conteniendo 5% de CO<sub>2</sub>.

### 4.2 Despliegue Diferencial

Las células bajo los diferentes tratamientos se cosecharon a las 48 h postconfluencia y se les hizo una extracción de RNA total con TRIzol® de acuerdo a las especificaciones del fabricante (Invitrogen, Carlsbad, CA). Las muestras de RNA se precipitaron con isopropanol, se disolvieron en agua tratada con 0.1% de DEPC (Sigma Chem., St. Louis MO) y se sometieron a una digestión con una unidad de DNaseI (Invitrogen, Carlsbad, CA) por microgramo de RNA durante 15 minutos a temperatura ambiente para remover

cualquier contaminación con DNA genómico. La calidad y concentración del RNA obtenido se estimó por electroforesis en geles de agarosa al 1% en condiciones no desnaturizantes y por medición de la absorbancia a 260 y 280 nm en un espectrofotómetro con luz UV respectivamente. El despliegue diferencial se realizó por duplicado utilizando RNAimage® (GenHunter Corporation, Nashville, TN) de acuerdo a las instrucciones de manufactura. En resumen 0.2 µg de RNA libre de DNA para cada tratamiento se transcribió en reversa utilizando el oligo dT H-T<sub>11</sub>M (H representa un sitio de restricción para *Hind*III, M representa G, A o C). Tres transcripciones reversa se realizaron para cada muestra de RNA, cada una conteniendo uno de los 3 diferentes oligonucleótidos H-T<sub>11</sub>M. Los productos de la reacción de RT se amplificaron por PCR en presencia de α[<sup>33</sup>P]dCTP, utilizando el correspondiente oligonucleótido H-T<sub>11</sub>M y ocho diferentes oligonucleótidos arbitrarios (H-AP1, AAGCTTGATTGCC; H-AP2, AAGCTTCGACTGT; H-AP3, AAGCTTTGGTCAG; H-AP4, AAGCTTCTCAACG; H-AP5, AAGCTTAGTAGGC; H-AP6, AAGCTTGCACCAT; H-AP7, AAGCTTAACGAGG; H-AP8, AAGCTTTTACCGC) en un termociclador TC-512 (Techne, Staffordshire, UK). Los 24 productos de reacción se separaron en un gel de secuenciación al 6% (Genomyx LR, Beckman Coulter Inc., Fullerton, CA) y se expusieron a una película de rayos X (Kodak, Rochester, NY). Las bandas de interés, de más de 100 pb, se recuperaron del gel para una re-amplificación con el mismo juego de oligonucleótidos. El tamaño de los productos de PCR se verificó utilizando geles de agarosa al 1.5%. Las sondas de cDNA reamplificadas se aislaron de los geles de agarosa utilizando QIAEX kit (Qiagen, Hilden, Germany), y se insertaron dentro del vector pGEM®-T (Promega, Madison, WI) para su

amplificación en las células competentes JM109 (Promega, Madison, WI). Los métodos utilizados para la transformación bacteriana fueron choque térmico o electroporación. Los plásmidos recombinantes se extrajeron y se secuenciaron con el secuenciador automático ABI PRISM 377 (Perkin Elmer, Waltham, MA) en el Laboratorio Nacional de Genómica para la Diversidad del CINVESTAV, Unidad Irapuato o en la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM. La homología de las secuencias se analizó con el programa blast (BLASTX) del NCBI (National Center for Biotechnology Information; <http://www.ncbi.org/BLAST>).

#### **4.3 Análisis de RT-PCR semi-cuantitativa**

El RNA de preadipocitos en proliferación, preadipocitos quiescentes y adipocitos 3T3-F442A tratados con TNF- $\alpha$  durante 24, 48, 72 o 196 h postconfluencia se aisló utilizando TRIzol®. Las muestras de RNA se cuantificaron por espectrofotometría a una longitud de onda de 260 nm. La primer cadena de cDNA se sintetizó a partir de 2  $\mu$ g de RNA total mezclados con 0.5  $\mu$ g de oligonucleótido oligo dT, 200 U de transcriptasa reversa M-MLV (Promega, Madison, WI) y 500  $\mu$ M de dNTP en un amortiguador de reacción 1x. La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 20  $\mu$ l a 42°C durante 90 min. Controles sin transcriptasa reversa se usaron para confirmar la ausencia de DNA genómico. Un microlitro de cDNA se utilizó para hacer PCR semicuantitativa para SerpinA3g y gliceraldehído fosfato deshidrogenasa (GADPH), utilizando las siguientes secuencias de oligonucleótidos: 5'-GTGATCCGCTATGCCTGATT-3'(sentido) y 5'-GGCTTTTGGGTTGAGGAGAT-3'(antisentido) para la SerpinA3g; 5'-

TCACGGCAAATTCAACGGCA-3'(sentido) y 5'-TGTCATGGATGACCTTGGCC-3'(antisentido) para GADPH. Las reacciones de amplificación se realizaron con 25 pmoles de oligonucleótidos, 250  $\mu$ M dNTP, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub> y 1 unidad de *Taq* DNA polimerasa en amortiguador de reacción 1x (Promega, Madison, WI) en un volumen final de 25  $\mu$ l. Los ciclos de amplificación para SerpinA3g consistieron de una desnaturalización inicial a 94°C durante 5 min, seguida por 35 ciclos a 94°C durante 30 s, 58°C durante 30 s y 72°C durante 30 s, y un paso final de polimerización a 72°C durante 5 min en un termociclador PTC-100 DNA (MJ Research Inc, Waltham, MA). Los ciclos de amplificación para GADPH fueron similares a los de la SerpinA3g, excepto que la temperatura de alineamiento fue a 68°C y durante solo 22 ciclos. Las secuencias de los oligonucleótidos utilizados para SerpinA3g se determinaron utilizando la secuencia obtenida del análisis de despliegue diferencial. Los productos de PCR se visualizaron sobre geles de agarosa al 1.3% teñidos con bromuro de etidio. Las imágenes se capturaron con un sistema Gel LOGIC 100 y se les realizó un análisis de densitometría con el software *NIH image* versión 1.61, para normalizar los niveles de los mRNA de la SerpinA3g con GADPH. El número de ciclos se determinó con una cinética de amplificación para que cada cDNA analizado estuviera dentro de un rango de amplificación lineal.

#### **4.4 Transfección del RNA de interferencia para la SerpinA3g en células 3T3-F442A**

El siRNA de la SerpinA3g de ratón se generó con el vector RNAi-Ready pSiren-RetroQ (Clontech, CA, USA), de acuerdo a las instrucciones de manufactura,

utilizando el siguiente oligonucleótido de doble cadena, derivado de la secuencia NM\_009251 del banco de genes: 5'gatccACCTGACAACTCCCTACTTTTCAAGAGAAAGTAGGGAGTTGTCAGG TTTTTTg-3'. Para generar las partículas infecciosas retrovirales, la línea celular PT67 (Clontech, CA, USA) con una confluencia del 80% se transfectó con 6 µg del vector con el siRNA para SerpinA3g o el vector control en placas de cultivo de 60 mm utilizando Lipofectamine 2000 (Invitrogen, CA, USA). Las células fueron entonces seleccionadas durante 7 días con 15 µg/ml puromicina (Invitrogen, CA, USA). Los cultivos condicionados con medio libre de suero con títulos virales de  $0.5 \times 10^6$  cfu/ml se cosecharon y se pasaron a través de filtros de acetato de celulosa. Las células 3T3-F442A se incubaron 36 h en medio condicionado y se seleccionaron con puromicina durante 7 días. La expresión apagada de la SerpinA3g se corroboró mediante análisis de RT-PCR en cultivos mantenidos en AM + TNF $\alpha$  por 48 h. Los efectos de los inhibidores adipogénicos sobre la diferenciación de los preadipocitos 3T3-F442A silenciados en la SerpinA3g se evaluaron siete días después del tratamiento estimando el grado de acumulación lipídica utilizando la tinción con rojo oleoso (Ramírez-Zacarías *et al.*, 1992).

#### **4.5 Ensayos de captura de 2-NBDG por adipocitos 3T3-F442A**

Adipocitos maduros 3T3-F442A control o 3T3-F442A SerpinA3g silenciados cultivados en placas de 96 pozos para fluorescencia, se pre-incubaron durante 2 días con 10 ng/ml TNF- $\alpha$  para inducirles resistencia a insulina (Hotamisligil *et al.*, 1994). Después de este tiempo las monocapas celulares se lavaron e incubaron durante 60 min con PBS conteniendo 1 mg/ml BSA y 80 µM del

análogo fluorescente de la D-glucosa 2-[N-7-(nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)amino]-2-deoxy-D-glucose (2-NBDG; Invitrogen, Carlsbad, CA) (Zou *et al.*, 2005; Alonso-Castro y Salazar-Olivo, 2008) en presencia de 100 nM de insulina o 10  $\mu$ M del hipoglucemiante oral Rosiglitazone (RGZ; Cayman Chemical Co., Ann Arbor, MI). Después de la incubación, los cultivos se lavaron para quitar el 2-NBDG libre y la fluorescencia retenida en las monocapas de células se midió con un lector de fluorescencia para microplaca Tecan-GENios (Tecan, Salzburg, Austria), a una longitud de onda de excitación de 485 nm y una longitud de onda de emisión de 535 nm, utilizando el software Magellan 4.0. La incorporación de 2-NBDG inducida por insulina en células 3T3 no preincubadas con ninguna citocina se consideró como el 100% de incorporación específica de 2-NBDG.

#### **4.6 Análisis estadístico**

Los datos se expresaron como la media  $\pm$  desviación estándar de cuatro experimentos independientes realizados por duplicado. El análisis estadístico se hizo mediante ANOVA de una sola vía. Las diferencias se consideraron significativas cuando  $P \leq 0.05$ .

## 5. RESULTADOS

### 5.1 TNF- $\alpha$ , pero no RA ni TGF- $\beta$ , induce la expresión de la SerpinA3g en células 3T3-F442A

Para comparar los patrones de expresión inducidos en preadipocitos 3T3F442A por diversos inhibidores adipogénicos, realizamos un análisis de despliegue diferencial. Preadipocitos 3T3-F442A confluentes se trataron durante 48 horas con medio adipogénico (AM) o medio adipogénico con concentraciones inhibitorias de TGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$  o ácido retinoico (RA). Cultivos paralelos se mantuvieron en condiciones preadiposas con medio no adipogénico (NAM). El RNA total de cada condición se sometió a un análisis de despliegue diferencial como se describe en materiales y métodos. En la figura 9A se muestra el despliegue diferencial que revela, entre otros, un fragmento de PCR expresado de manera diferencial en las células tratadas con TNF- $\alpha$ . Este fragmento fue obtenido con el juego de oligonucleótidos H-T11A y H-AP4. Este fragmento no fue inducido ni por AR ni por TGF- $\beta$ . Una vez que este fragmento se re-amplificó, clonó y secuenció, se comparó mediante un análisis *in silico* utilizando BLAST (Fig. 9B) con la secuencias de ratón para SerpinA3g, PAI-1 y vaspina. Este análisis mostró que este fragmento tiene un 99% de identidad con SerpinA3g. Para confirmar la inducción específica de la SerpinA3g por TNF- $\alpha$  se realizó un análisis de RT-PCR realizado a partir de RNA total obtenido de preadipocitos cultivados en las mismas condiciones utilizadas para el ensayo de despliegue diferencial. Siempre se incluyó el análisis de la expresión del mRNA de GAPDH como control interno. Los datos se presentan como la media  $\pm$  SE de cuatro experimentos independientes hechos por

duplicado. Las letras minúsculas indican las diferencias significativas de acuerdo a la prueba de ANOVA ( $P < 0.05$ ) comparada con su respectivo control.

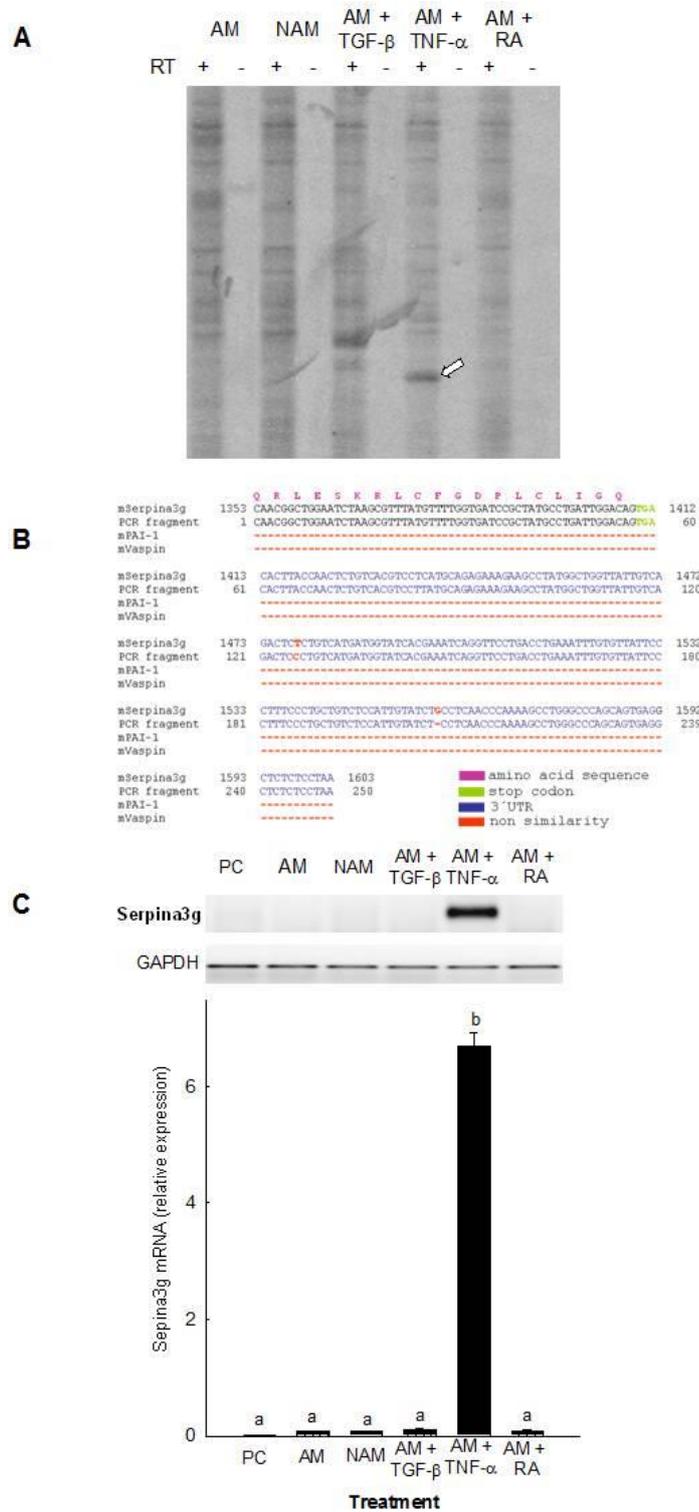


Figura 9. TNF- $\alpha$  induce la expresión de la SerpinA3g en preadipocitos 3T3-F442A

## **5.2 TNF- $\alpha$ induce la expresión de la SerpinA3g tanto en preadipocitos como en adipocitos 3T3**

Para caracterizar mejor la expresión de la SerpinA3g inducida por TNF- $\alpha$ , analizamos la expresión de esta serpina a lo largo del proceso de diferenciación de las células 3T3-F442A. Para esto el RNA total de preadipocitos 3T3-F442A en crecimiento exponencial incubados en presencia y ausencia de 10 ng/ml de TNF- $\alpha$  durante 48 h (A), de preadipocitos quiescentes inducidos a diferenciación en presencia de TNF- $\alpha$  (B), de adipocitos terminalmente diferenciados en presencia o ausencia de la citocina (C). La expresión de la SerpinA3g fue analizada mediante RT-PCR semi-cuantitativa utilizando GAPDH como control interno. Controles sin transcriptasa reversa fueron siempre realizados (datos no mostrados). Las figuras son representación de cuatro experimentos independientes realizados por duplicado. Los datos se presentan como la media  $\pm$  SE. Las letras minúsculas indican las diferencias significativas de acuerdo a la prueba de ANOVA ( $P < 0.05$ ). El análisis de RT-PCR mostró que TNF- $\alpha$  induce la expresión de la SerpinA3g en preadipocitos en proliferación (Fig. 10A), así como en células quiescentes incubadas con medio adipogénico durante 8 días (Fig. 10B). La expresión de la SerpinA3g fue inducida solamente con TNF- $\alpha$  a las 24 h y alcanzó su nivel máximo después de 48 h de tratamiento. Además, los niveles de expresión de la SerpinA3g se mantuvieron por al menos 8 días (Fig. 10B). También analizamos la inducción de la expresión de la SerpinA3g por TNF- $\alpha$  en adipocitos 3T3F442A maduros. En estas células terminalmente diferenciadas, TNF- $\alpha$  induce la expresión de la serpina, aunque, a diferencia de las células preadiposas, en un patrón de incremento que culmina después de

los 8 días de incubación (Fig. 10C). Nuestros resultados muestran que TNF- $\alpha$  induce la expresión de la SerpinA3g en células 3T3-F442A independientemente de su estado de diferenciación y sugieren que la serpina pudiera jugar más de un papel en el funcionamiento de las células adiposas.

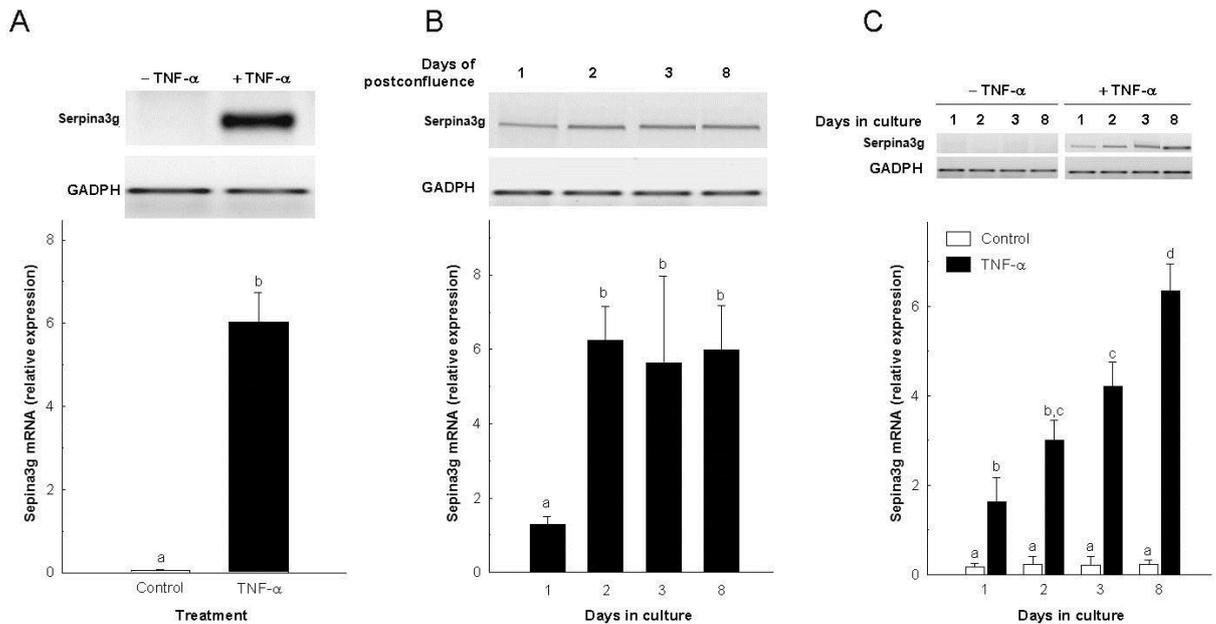


Figura 10. TNF- $\alpha$  induce la expresión de la SerpinA3g a lo largo de la vía adipogénica de las células 3T3-F442A

### 5.3 SerpinA3g media el efecto antiadipogénico de TNF- $\alpha$

Para explorar si la SerpinA3g está involucrada en la inhibición de la adipogénesis por TNF- $\alpha$ , transfectamos preadipocitos 3T3-F442A con un siRNA para la SerpinA3g y confirmamos mediante RT-PCR la interferencia de la expresión de la serpina en cultivos tratados con TNF- $\alpha$  a las 48 h postconfluencia. Las células 3T3-F442A SerpinA3g silenciadas, no expresaron el mRNA de la serpina en respuesta a TNF- $\alpha$  mientras que las células 3T3-F442A control mostraron una alta expresión de este mRNA cuando fueron tratadas

con la citocina (Fig. 11A). Posteriormente, se indujo la adipogénesis tanto en las células normales (3T3-F442A control) como en las transfectadas con el siRNA para la SerpinA3g (3T3-F442A SerpinA3g silenciadas) en ausencia o presencia de TNF- $\alpha$ . La figura 11B muestra que las células 3T3-F442A SerpinA3g silenciadas mostraron una capacidad adipogénica igual a las de las células 3T3-F442A control, pero su diferenciación adiposa no fue bloqueada por TNF- $\alpha$ , ya que la acumulación lipídica en las células interferidas fue casi igual de alta en ausencia o en presencia de la citocina. La acumulación lipídica en las células 3T3-F442A control al contrario, fue bloqueada por TNF- $\alpha$  como se esperaba.

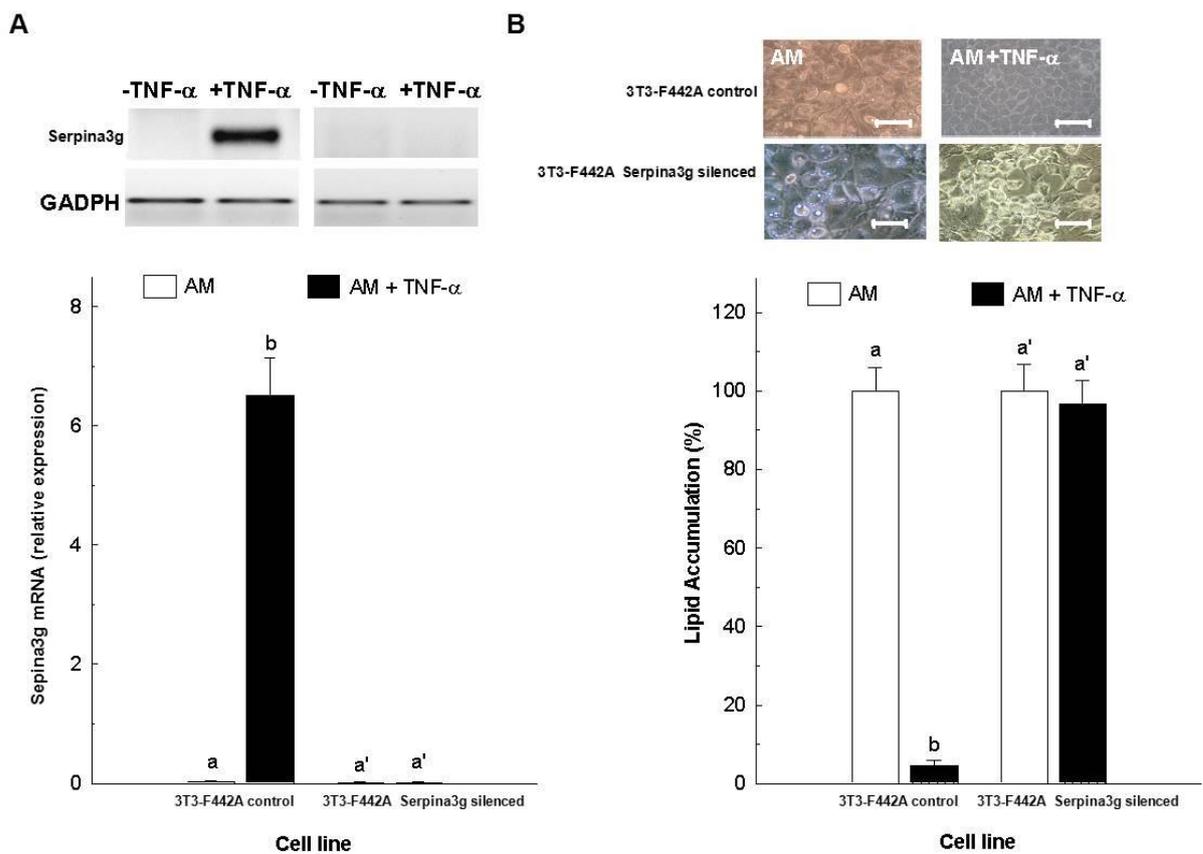


Figura 11. La SerpinA3g media el efecto antiadipogénico de TNF- $\alpha$

Para precisar el papel de la SerpinA3g en la inhibición de la adipogénesis por TNF- $\alpha$  probamos los efectos de otros inhibidores adipogénicos sobre la diferenciación de células 3T3-F442A SerpinA3g silenciadas. La diferenciación adiposa de preadipocitos 3T3-F442A control o transfectados con siRNA-SerpinA3g (3T3-F442A SerpinA3g silenciados) se indujo con medio adipogénico (AM) o AM adicionado con 1  $\mu$ M de ácido retinoico (RA), 60 pM de TGF- $\beta$  o 10ng/ml de TNF- $\alpha$ . Los cultivos control recibieron medio no adipogénico (NAM). Después de 7 días, los cultivos se fijaron y tiñeron con rojo oleoso y la adipogénesis fue cuantificada por la acumulación intraplasmática de lípidos. Los resultados se presentan como la media  $\pm$  SE de tres experimentos independientes realizados por triplicado. Las letras minúsculas indican las diferencias significativas de acuerdo a la prueba de ANOVA ( $P \leq 0.05$ ). Tanto RA como TGF- $\beta$  bloquearon la acumulación lipídica en estas células así como en las células 3T3-F442A control (Fig. 12). Estos resultados muestran que la SerpinA3g media los efectos antiadipogénicos de la citocina proinflamatoria TNF- $\alpha$  pero no participa en la antiadipogénesis inducida por los otros inhibidores RA y TGF- $\beta$ .

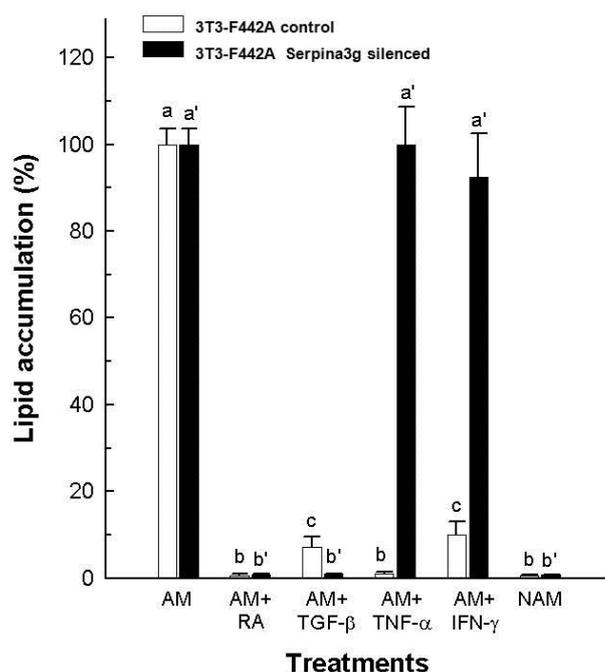


Figura 12. La SerpinA3g media los efectos antiadipogénicos de  $TNF-\alpha$  pero no los del RA o  $TGF-\beta$ .

#### 5.4 SerpinA3g media la resistencia a insulina inducida por $TNF-\alpha$

Además de sus efectos antiadipogénicos,  $TNF-\alpha$ , induce también resistencia a la insulina en adipocitos (Hotamisligil *et al.*, 1994), aunque los mecanismos a los cuales se debe esta inducción aún no son totalmente claros. Para establecer si la SerpinA3g participa en la resistencia a la insulina inducida por esta citocina, tratamos adipocitos maduros 3T3-F442A control y 3T3-F442A SerpinA3g silenciados con  $TNF-\alpha$  y evaluamos sobre estas células el efecto de la insulina sobre la captura de glucosa utilizando el análogo fluorescente 2-NBDG. Adipocitos maduros 3T3-F442A control (A) o 3T3-F442A SerpinA3g silenciados (B), pre-tratados con  $TNF-\alpha$  para inducir resistencia a la insulina fueron incubados por 60 min con PBS/BSA que contenía 80  $\mu M$  de 2-NBDG y

las concentraciones indicadas de insulina (Ins) 100 nM o 10  $\mu$ M de roziglitazona (RGZ). Después, se lavaron los cultivos para retirar el 2-NBDG libre de los cultivos y la fluorescencia asociada a las monocapas de células fue medida en una microplaca para leer fluorescencia. Los resultados se muestran como la media  $\pm$  SE de tres experimentos independientes hechos por triplicado. Las letras minúsculas indican la diferencia significativa de acuerdo a la prueba de ANOVA ( $P \leq 0.05$ ). Los adipocitos 3T3-F442A control, no pre-tratados con la citocina, incorporaron el análogo de la glucosa en respuesta a la insulina y tal respuesta fue abolida con el pre-tratamiento con TNF- $\alpha$ . Sin embargo, las células 3T3 normales pretratadas con TNF- $\alpha$  siguen respondiendo a la acción del hipoglucemiante oral roziglitazona (RGZ) (Fig. 5A). Por otro lado, los adipocitos 3T3-F442A SerpinA3g silenciados incorporaron el 2-NBDG en respuesta a la insulina, tanto en las células no tratadas con TNF- $\alpha$  como en las tratadas. Así como las células normales los adipocitos 3T3-F442A SerpinA3g silenciados siguieron respondiendo a la RGZ después del tratamiento con TNF- $\alpha$  (Fig. 5B).

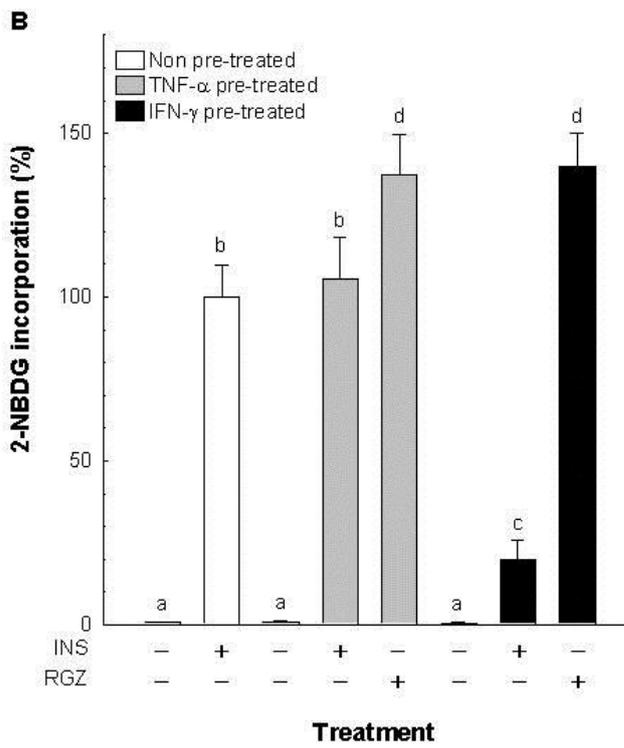
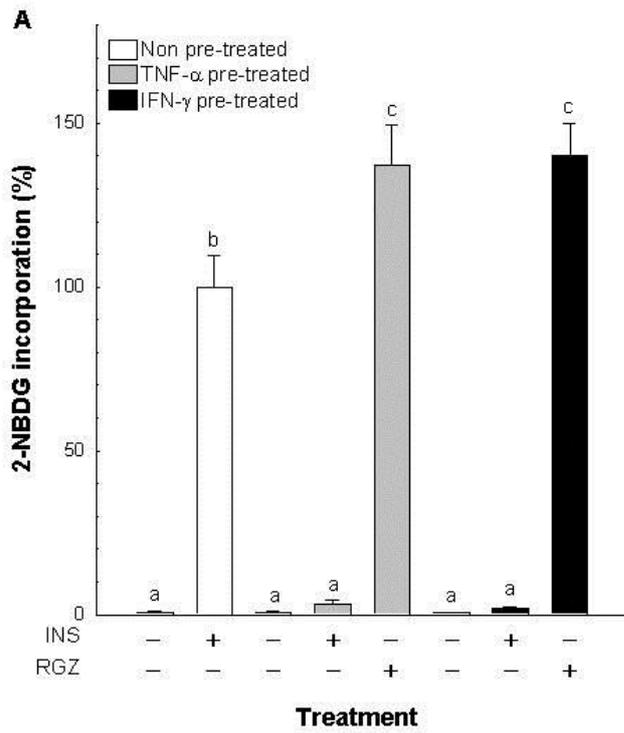


Figura 13. SerpinA3g media la resistencia a la insulina inducida por TNF- $\alpha$ .

## 6. DISCUSIÓN

TNF- $\alpha$  es una citocina proinflamatoria con efectos pleiotrópicos sobre la proliferación y la diferenciación celular. Aunque es bien conocido que inhibe la diferenciación adiposa y que induce resistencia a insulina en los tejidos blanco de esta hormona, los mecanismos moleculares por los cuales afecta estos dos procesos aún no están completamente entendidos. Para conocer más elementos de los mecanismos de acción de TNF- $\alpha$ , comparamos la expresión génica de células 3T3-F442A tratadas con esta citocina y otros inhibidores adipogénicos bien conocidos pero de diferente naturaleza química, el TGF- $\beta$ , un factor de crecimiento, y el ácido retinoico, un terpeno de bajo peso molecular. Se sabe que los tres compuestos interfieren el compromiso a la diferenciación terminal mediada por genes tempranos como PPAR $\gamma$  y C/EBP $\alpha$  (Hotamisligil, *et al.*, 1993; Schwarz *et al.*, 1997; Choy *et al.*, 2000); sin embargo, otros eventos involucrados en los efectos de estos inhibidores se desconocen.

Nuestros resultados de despliegue diferencial mostraron la inducción de la SerpinA3g, un miembro de la familia de inhibidores de serin-proteasas, de manera específica por TNF- $\alpha$  y no por los otros inhibidores de la adipogénesis. El análisis comparativo de la secuencia de la SerpinA3g, mostró que esta serpina corresponde al gen ortólogo humano  $\alpha$ -1-antiquimiotripsina (Inglis *et al.*, 1991; Horvath *et al.*, 2005), una proteína de fase aguda reportada en procesos inflamatorios (Gabay y Kushner, 1999). La inducción de la SerpinA3g observada en nuestros experimentos se había mostrado anteriormente en adipocitos 3T3-L1 en respuesta a TNF- $\alpha$  (Ruan *et al.*, 2002), adicionalmente nosotros mostramos que la expresión de la SerpinA3g es inducida en las

diferentes fases de diferenciación de estas células, dado que pudimos reconocer el mRNA de la SerpinA3g tanto en preadipocitos proliferativos o quiescentes como en adipocitos con diferente grado de madurez. Este efecto resultó específico para TNF- $\alpha$ , ya que los otros inhibidores no indujeron la expresión de la serpina.

Para explorar a mayor detalle el papel de la SerpinA3g en el funcionamiento y desarrollo del tejido adiposo, bloqueamos su expresión mediante un siRNA. El primer aspecto que analizamos fue la participación de la SerpinA3g en la inhibición de la diferenciación adiposa. Encontramos que las células 3T3-F4424 SerpinA3g silenciadas no fueron sensibles al efecto inhibitorio de TNF- $\alpha$  observado en las células control. La participación de la SerpinA3g en la antiadipogénesis fue específica para TNF- $\alpha$  puesto que las células silenciadas siguieron siendo sensibles a los efectos antiadipogénicos de RA y TGF- $\beta$ . Estos resultados prueban que la SerpinA3g participa en el efecto antiadipogénico de TNF- $\alpha$  y sugieren un mecanismo al menos parcialmente diferente de los de RA y TGF- $\beta$ . La vía antiadipogénica para TNF- $\alpha$  sería común a otras citocinas proinflamatorias con efectos antiadipogénicos como el IFN- $\gamma$  (Grégoire *et al.*, 1992), el cual se ha reportado que también induce la expresión de la SerpinA3g en macrófagos (Hemerman *et al.*, 2002) y en las células 3T3-F442A (datos no presentados). Dado que TNF- $\alpha$  se sabe es un regulador transcripcional del factor nuclear NF- $\kappa$ B y que la unión de este factor regula la expresión de diversos genes inflamatorios en diversos tipos celulares, podemos sugerir que la SerpinA3g inducida por esta citocina entra dentro de este tipo de genes dado que estudios previos han revelado que NF- $\kappa$ B induce de manera importante al promotor de la SerpinA3g (Hampson *et al.*, 2001).

Consecuentemente esta molécula afecta múltiples procesos como la diferenciación celular. Aunque el mecanismo por el cual lo hace aún no se esclarece y hacen falta experimentos adicionales, nosotros sugerimos que podría ser a través de la inhibición de catepsinas como la S, K y L quienes se sabe incrementan su expresión y actividad durante la adipogénesis participando en la degradación de fibronectina y que se ha probado bloquean la diferenciación adiposa cuando son inhibidas (Taleb, *et al.* 2006, Yin, *et al.* 2006 y Yang, *et al.* 2007) (Fig. 14). Recordemos que algunas de las serpinas tienen como blancos este tipo de proteínas.

Otro efecto importante del TNF- $\alpha$  sobre el metabolismo del tejido adiposo, es la resistencia a insulina inducida por esta citocina. Para analizar la participación de la SerpinA3g en la resistencia a insulina mediada por TNF- $\alpha$  comparamos la incorporación de glucosa en células 3T3 control y SerpinA3g silenciadas pretratadas o no con esta citocina para inducir resistencia a insulina (Hotamisligil *et al.*, 1993). En ausencia del pre-tratamiento con TNF- $\alpha$  ambas líneas celulares captaron el análogo fluorescente de la glucosa, 2-NBDG, en respuesta a la insulina y lo hicieron pobremente en ausencia de la hormona. Por el contrario luego del pretratamiento con TNF- $\alpha$  las células normales se hicieron resistentes a la insulina y no respondieron al efecto de la hormona incorporando 2-NBDG, en tanto que las células SerpinA3g silenciadas pretratadas con la citocina incorporaron glucosa a niveles similares que las células no tratadas con la citocina. Experimentos adicionales utilizando IFN- $\gamma$ , otra citocina inductora de resistencia a insulina, en las células SerpinA3g silenciadas (Shiba *et al.*, 1998), mostraron la inducción de una resistencia parcial a la hormona a juzgar por el grado de incorporación de 2-NBDG

alcanzado en las células pretratadas con IFN- $\gamma$  (datos no mostrados). En conjunto nuestros resultados sugieren que la SerpinA3g media la resistencia a insulina por TNF- $\alpha$  y parcialmente la inducida por IFN- $\gamma$ , lo que supone que esta serpina puede estar participando en vías de señalización con un componente común para ambas citocinas en sus efectos inductores de resistencia a insulina. Aquí el factor nuclear NF- $\kappa$ B juega un papel importante ya que al ser estimulado por TNF- $\alpha$  y este a su vez estar posiblemente activando a esta serpina nos permite comprender por lo menos de manera parcial la participación de esta proteasa en la resistencia a la insulina inducida por la citocina. Sin embargo el cómo y a través de qué mecanismo lo hace aún no es claro podría deberse también a la inhibición de catepsinas que se ha probado participan también en la señalización de la insulina (Posner, 2003; Navab, *et al.* 2008) (Fig. 14).

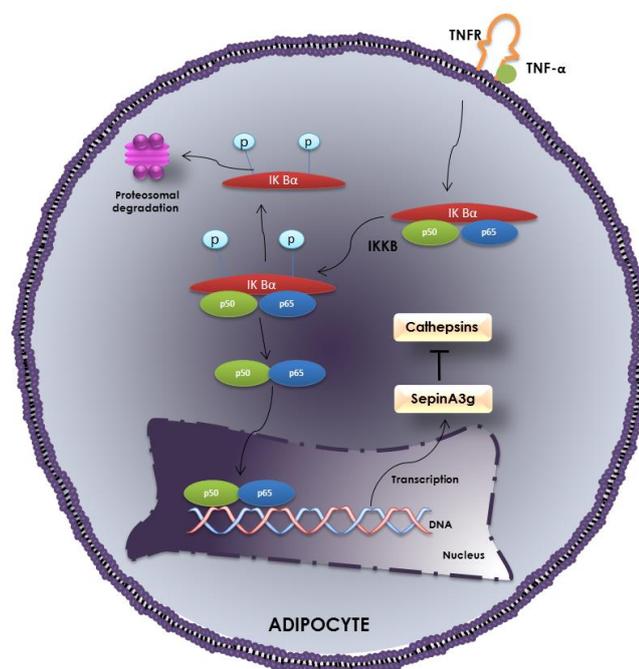


Figura 14. Posible mecanismo de acción de TNF- $\alpha$  en la línea celular para la inducción de la expresión de la SerpinA3

SerpinA3g se suma a la familia de serin-proteasas relacionadas con tejido adiposo, como PAI-1, Vaspina y Visfatina (Fukuhara *et al.*, 2005; Hida *et al.*, 2005; Pandey *et al.*, 2005), las cuales han sido descritas en tejido adiposo y se ha reportado que juegan un importante papel en diversos aspectos del metabolismo de dicho tejido. De éstas, PAI-1 es también inducida por TNF- $\alpha$  y se ha detectado en tejido adiposo visceral y subcutáneo de ratas obesas. Aunque en adipocitos 3T3-L1 se ha observado que PAI-I es necesario para inducir resistencia a insulina y para inhibir la diferenciación adipocítica (Liang *et al.*, 2006), resultados obtenidos en la línea celular 3T3-F442A parecen indicar que no tiene un efecto inhibitor, al menos en esta línea celular (Liang *et al.*, 2006; Scroyen *et al.*, 2007).

Es importante mencionar que aunque la mayoría de las serpinas son secretadas algunas tienen una localización intracelular (Potempa *et al.*, 1994). Un ejemplo de ello es la SerpinA3g que se ha encontrado se expresa primariamente como intracelular debido a que carece de la secuencia N-terminal de translocación a retículo endoplásmico que la dirigiría hacia el exterior de la célula.

Otros trabajos han abordado el papel de TNF- $\alpha$  en los procesos aquí estudiados. TNF- $\alpha$  inhibe la fosforilación del receptor de insulina en residuos de tirosina pero induce su fosforilación en residuos de serina (Hotamisligil *et al.* 1994). Además, TNF- $\alpha$  activa al complejo IKK conduciendo a la fosforilación de I $\kappa$ B, lo que induce a su poliubiquitinización y subsecuente degradación en el proteasoma lo que conduce a la liberación y translocación nuclear de NF $\kappa$ B donde reprime genes adipocíticos e induce muchos genes pro-inflamatorios y preadipocíticos (Yuan *et al.*, 2001; Tamori *et al.*, 2002) (Fig. 14). Aunque el

papel de IKK en la inducción de resistencia a insulina por TNF- $\alpha$  aún no es clara, algunos trabajos sugieren que es por inducir cambios en la fosforilación del IRS-1 (Hotamisligil *et al.*, 1994; Yuan *et al.*, 2001) mientras que otros sugieren que lo hace por la fosforilación de Akt (Austin *et al.*, 2008). Por lo que los hallazgos encontrados por nosotros dan una nueva pieza de información que permite acercarnos más al conocimiento de los mecanismos moleculares por los cuales TNF- $\alpha$  actúa. Aunque SerpinA3g ha sido previamente identificada en la lista de proteínas inducidas por TNF- $\alpha$  en adipocitos diferenciados, nuestros resultados son los primeros en mostrar que el efecto inhibitorio temprano de esta citocina, requiere de la expresión de la serpina desde antes de la diferenciación. Además en este trabajo mostramos que la inhibición de la expresión de la serpina previene la resistencia a insulina inducida por TNF- $\alpha$  y al menos parcialmente la inducida por INF $\gamma$  (datos no mostrados). Más investigaciones en torno al papel de la SerpinA3g en el tejido adiposo están justificadas y nos permitirán un mayor conocimiento de la fisiología y patología del tejido adiposo.

## 7. CONCLUSIONES

- La identificación de la SerpinA3g en células 3T3F442A tratadas con TNF- $\alpha$  aporta una nueva pieza de información para entender los mecanismos moleculares por los cuales esta citocina proinflamatoria induce antiadipogénesis y resistencia a la insulina.
- Además este trabajo ofrece nueva información para comprender que la antiadipogénesis inducida por TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$  y AR, aunque tienen en común inhibir a factores de transcripción claves en el proceso adipogénico, como lo son PPAR $\gamma$  y C/EBP $\alpha$ , los mecanismos por los cuales promueven esta inhibición es diferente.
- El poder conocer cada vez más moléculas implicadas en el desarrollo y metabolismo del tejido adiposo nos permitirá crear estrategias terapéuticas adecuadas para el tratamiento de la obesidad así como de la diabetes tipo II, evitando así las complicaciones de estos problemas de salud pública a nivel mundial.

## 8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ailhaud G: Adipose tissue as a secretory organ: from adipogenesis to the metabolic syndrome. *C R Biol* 329:570-577, 2006

Alonso-Castro AJ, Salazar-Olivo LA: The anti-diabetic properties of *Guazuma ulmifolia* Lam are mediated by the stimulation of glucose uptake in normal and diabetic adipocytes without inducing adipogenesis. *J Ethnopharmacol* 118:252-256, 2008

Austin RL, Rune A, Bouzakri K, Zierath JR, Krook A: siRNA-mediated reduction of IKK $\beta$  prevents TNF- $\alpha$ -induced insulin resistance in human skeletal muscle. *Diabetes* 57:2066-2073, 2008

Baly DL, Zarnowski MJ, Carswell N, Michaelis OE: Insulin resistant glucose transport activity in adipose cells from the SHR/N-corpulent rat. *J Nutr* 119:628-632, 1989

Barrett AJ: The classes of proteolytic enzymes. Boca Raton, Florida: CRC Press, 1986

Barrett AJ, Rawlings ND, O'Brien EA: The MEROPS database as a protease information system. *J Struct Biol* 134:95-102, 2001

Beardsley T: Smart genes. *Sci Am* 265:86-95, 1991.

Berg AH, Lin Y, Lisanti MP, Scherer PE: Adipocyte differentiation induces dynamic changes in NF-kappaB expression and activity. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 287:E1178-1188, 2004

Bode W, Huber R: Natural protein proteinase inhibitors and their interaction with proteinases. *EJB Reviews* 1992: 43-61, 1993

Boeuf S, Keijer J, Franssen-Van Hal NL, Klaus S: Individual variation of adipose gene expression and identification of covariated genes by cDNA microarrays. *Physiol Genomics* 11:31-36, 2002

Boeuf S, Klingenspor M, Van Hal NL, Schneider T, Keijer J, Klaus S: Differential gene expression in white and brown preadipocytes. *Physiol Genomics* 7:15-25, 2001

Bolduc C, Larose M, Lafond N, Yoshioka M, Rodrigue MA, Morissette J, Labrie C, Raymond V, St-Amand J: Adipose tissue transcriptome by serial analysis of gene expression. *Obes Res* 12:750-757, 2004

Cawthorn WP, Heyd F, Hegyi K, Sethi JK: Tumour necrosis factor-alpha inhibits adipogenesis via a beta-catenin/TCF4 (TCF7L2)-dependent pathway. *Cell Death Differ* 14: 1361-1373, 2007

Chawla A, Schwarz EJ, Dimaculangan DD, Lazar MA: Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) gamma: adipose-predominant expression and induction early in adipocyte differentiation. *Endocrinology* 135:798-800, 1994

Choy L, Skillington J, Derynck R: Roles of autocrine TGF-beta receptor and Smad signaling in adipocyte differentiation. *J Cell Biol* 149:667-682, 2000

Clouthier DE, Comerford SA, Hammer RE: Hepatic fibrosis, glomerulosclerosis and a lipodystrophy-like syndrome in PEPCK-TGF-beta1 transgenic mice. *J Clin Invest* 100:2697-2713, 1997

Colonna R, Leone A, Maresca B: Differential-Display Reverse Transcription-PCR (DDRT-PCR). *Springer Lab Manual*, 1998.

Christeller JT: Evolutionary mechanism acting on proteinase inhibitor variability. *FEBS J* 272:5710-5722, 2005

Darlington GJ, Ross SE, MacDougald OA: The role of C/EBP genes in adipocyte differentiation. *J Biol Chem* 273:30057-60, 1998

Diatchenko L, Lau YF, Campbell AP, Chenchik A, Moqadam F, Huang B, Lukyanov S, Lukyanov K, Gurskaya N, Sverdlov ED, Siebert PD: Suppression subtractive hybridization: A method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:6025-6030, 1996

Dimaculangan DD, Chawla A, Boak A, Kagan HM, Lazar M.A: Retinoic acid prevents downregulation of ras recision gene/lysyl oxidase early in adipocyte differentiation. *Differentiation* 58:47-52, 1994

Dyxhoorn DM, Lieberman J: The silent revolution: RNA interference as basic biology, research tool, and therapeutic. *Annu Rev Med* 56:401-423, 2005

Esteve Ràfols M: Tejido adiposo: heterogeneidad celular y diversidad funcional. *Endocrinol Nutr* 1-13, 2013

Filipak M, Sparks RL, Tzen CY, Scott RE: Tumor necrosis factor inhibits the terminal event in mesenchymal stem cell differentiation. *J Cell Physiol* 137:367-373, 1988

Flores-Lázaro JL, Rodríguez-Martínez E, Rivas-Arancilia S: Metabolic consequences of the functional alterations of adipose tissue in obese patients. *Rev Med Hosp Gen Méx* 74:157-165, 2011

Fukuhara A, Matsuda M, Nishizawa M, Segawa K, Tanaka M, Kishimoto K, Matsuki Y, Murakami M, Ichisaka T, Murakami M, Ichisaka T, Murakami H, Watanabe E, Takagi T, Akiyoshi M, Ohtsubo T, Kihara S, Yamashita S, Makishima M, Funahashi T, Yamanaka S, Hiramatsu R, Matsuzawa Y, Shimomura I: Visfatin: A protein secreted by visceral fat the mimics the effects of insulin. *Science* 307:426-430, 2005

Frühbeck G, Gómez-Ambrosi J, Muruzábal FJ, Burrell MA: The adipocyte: a model for integration of endocrine and metabolic signaling in energy metabolism regulation. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 280:E827-E847, 2001

Gabay C, Kushner I: Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. *N Engl J Med* 340:448-454, 1999

Gewirtz AM: on future's doorstep: RNA interference and the pharmacopeia of tomorrow. *J Clin Invest* 117: 3612-3614

Gonzalez FJ: Getting fat: two new players in molecular adipogenesis. *Cell Metab* 1:85-86, 2005

Green H, Kehinde O: Spontaneous heritable changes leading to increased adipose conversion in 3T3 cells. *Cell* 7:105-113, 1976

Grégoire F, De Broux N, Hauser N, Heremans H, Van Damme J, Remacle C: Interferon-gamma and interleukin-1 beta inhibit adipogenesis in cultured rodent preadipocytes. *J Cell Physiol* 151:300-309, 1992

Grégoire FM, Smas CM, Sook SH: Understanding adipocyte differentiation. *Physiol Rev* 78:783–809, 1998

Guerre-Millo M: Adipose tissue hormones. *J Endocrinol Invest* 25:855-861, 2002

Hampson L, Hampson IN, Babichuk CK, Cotter L, Bleackley RC: A minimal serpin promoter with high activity in haemopoietic progenitors and activated T cells. *Hematol J* 2: 150-160, 2001

Harp JB: New insights into inhibitors of adipogenesis. *Curr Opin Lipidol* 15:303-307, 2004

Havel PJ: Update on adipocyte hormones: regulation of energy balance and carbohydrate/lipid metabolism. *Diabetes* 53:S143-S151, 2004

Hemerman JA, Hayashi F, Schroeder LA, Gygi SP, Haas AL, Hampson L, Coughlin P, Aebersold R, Aderem A: Serpin2a is induced in activated macrophages and conjugates to a ubiquitin homolog. *J Immunol* 168:2415-2423, 2002

Hida K, Wada J, Eguchi J, Zhang H, Baba M, Seida A, Hashimoto I, Okada T, Yasuhara A, Nakatsuka A, Shikata K, Hourai S, Futami J, Watanabe E, Matzuki Y, Hiramatsu R, Akagi S, Makino H, Kanwar YS: Visceral adipose tissue-derived serine protease inhibitor: A unique insulin-sensitizing adipocytokine in obesity. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:10601-10615, 2005

Holley RW, Kiernan JA: Contact inhibition of cell division in 3T3 cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 60:300-304, 1968

Horvath AJ, Irving JA, Rossjohn J, Law RH, Bottomley SP, Quinsey NS, Pike RN, Couglin PB, Whisstock JC: The murine orthologue of human antichymotrypsin: a structural paradigm for clade A3 serpins. *J Biol Chem* 280:43168-43178, 2005

Hotamisligil GS, Murray DL, Choy LN, Spiegelman BM: Tumor necrosis factor alpha inhibits signaling from the insulin receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:4854-4858, 1994

Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM: Adipose expression of tumor necrosis factor- $\alpha$ : direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science* 259:87-91, 1993

Hu E, Liang P, Spiegelman: Identification of novel genes involved in adipose differentiation by differential display. *Methods in Molecular Biology* 85 (Differential Display Methods and Protocols):195-204, 1996

Ignotz RA, Massagué J: Type  $\beta$  transforming growth factor controls the adipogenic differentiation of 3T3 fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA* 82:8530-8534, 1985

Inglis JD, Lee M, Davidson DR, Hill RE: Isolation of two cDNAs encoding novel alpha 1-antichymotrypsin-like proteins in a murine chondrocytic cell line. *Gene*.106:213-20, 1991

Ishizuka K, Usui I, Kanatani Y, Bukhari A, He J, Fujisaka S, Yamazaki Y, Suzuki H, Hiratani K, Ishiki M, Iwata M, Urakaze M, Haruta T, Kobayashi M: Chronic tumor necrosis factor- $\alpha$  treatment causes insulin resistance via insulin receptor substrate-1 serine phosphorylation and suppressor of cytokine signaling-3 induction in 3T3-L1 adipocytes. *Endocrinology* 148:2994-3003, 2007

Jain RG, Phelps KD, Pekala PH: Tumor necrosis factor- $\alpha$  initiated signal transduction in 3T3-L1 adipocytes. *J Cell Physiol* 179:58-66, 1999

Joanitti GA, Freitas SM, Silva LP: Proteinaceous protease inhibitors: Structural features and multiple functional faces. *Current Enzyme Inhibition* 2:199-217, 2006

Kasuga M: Insuline resistance and pancreatic  $\beta$  cell failure. *J Clin Invest* 116:1756-1760, 2006.

Kawada T, Takahashi N, Fushiki T: Biochemical and physiological characteristics of fat cell. *J Nutr Sci Vitaminol* 47:1-12, 2001

Kern PA, Saghizadeh M, Ong JM, Bosch RJ, Deem R, Simsolo RB: The expression of tumor necrosis factor in human adipose tissue. Regulation by obesity, weight loss and relationship to liprotein lipase. *J Clin Invest* 95:2111-1119, 1995.

Kershaw EE, Flier JS: Adipose tissue as an endocrine organ. *J Clin Endocrinol Metab* 89:2548-2556, 2004

Klein ES, Wang JW, Khalifa B, Gavigan SA, Chandraratna RA: Recruitment of nuclear receptor corepressor and coactivator to the retinoic acid receptor by retinoid ligands. Influence of DNA-heterodimer interactions. *J Biol Chem* 275:19401-19408, 2000

Kratchmarova I, Kalume DE, Blagoev B, Scherer PE, Podtelejnikov AV, Molina H, Bickel PE, Andersen JS, Fernandez MM, Bunkenborg J, A proteomic approach for identification of secreted proteins during the differentiation of 3T3-L1 preadipocytes to adipocytes. *Mol Cell Proteomics* 1:213-222, 2002

Kuri-Harcuch W: Differentiation of 3T3-F442A cells into adipocytes is inhibited by retinoic acid. *Differentiation* 23:164-169, 1982

Kuri-Harcuch W, Green H: Adipose conversion of 3T3 cells depends on a serum factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 75:6107-6109, 1978

Laskowski M, Kato I: Protein inhibitors of proteinases. *Ann Rev Biochem* 49: 593-626, 1980.

Law RHP, Zhang Q, McGowan S, Buckle AM, Silverman GA, Wong W, Rosado CJ, Langendorf CG, Pike RN, Bird PI, Whisstock JC: An overview of the serpin superfamily. *Genome Biol* 7:216.1-216.11, 2006

Liang P, Pardee AB: Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science* 257:967-971, 1992

Liang P, Pardee AB: Differential display: a general protocol. *Mol Biotechnol* 10:261-267, 1998

Liang X, Kanjanabuch T, Mao SL, Hao CM, Tang YW, Declerck PJ, Hasty AH, Wasserman DH, Fogo AB, Ma LJ: Plasminogen activator inhibitor-1 modulates adipocyte differentiation. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 290:E101-E113, 2006

Lorenzo M, Fernández-Veledo R, Vila-Bedmar, García-Guerra L, De Alvaro C, Nieto-Vazquez I: Insulin resistance induced by tumor necrosis factor- $\alpha$  in myocytes and brown adipocytes. *J Anim Sci* 86:E94-E104, 2007

MacDougald OA, Lane MD: Transcriptional regulation of gene expression during adipocyte differentiation. *Annu Rev Biochem* 64:345:373, 1995

Mansour SL: Gene targeting in murine embryonic stem cells: introduction of specific alterations into the mammalian genome. *Genet Anal Tech Appl* 7:219-227, 1990

Navab R, Pedraza C, Fallavollita L, Wang N, Chevet E, Auguste P: Loss of responsiveness to IGF-I in cells with reduced cathepsin L expression levels. *Oncogene* 27:4973-8495, 2008

Ntambi JM, Kim YC: Adipocyte differentiation and gene expression. *J Nutr* 130:3122S-3126S, 2000

Ohsumi J, Sakakibara S, Yamaguchi J, Miyadai K, Yoshioka S, Fujiwara T, Horikoshi H, Serizawa N: Troglitazone prevents the inhibitory effects of inflammatory cytokines on insulin-induced adipocyte differentiation in 3T3-L1 cells. *Endocrinology* 135:2279-2282, 1994

Pandey M, Loskutoff DJ, Samad F: Molecular mechanisms of tumor necrosis factor- $\alpha$ -mediated plasminogen activator inhibitor-1 expression in adipocyte. *FASEB J* 19:1317-1319, 2005

Popa C, Netea MG, Van Riel LCM, Van der Meer JWM, Stalenhoef AFH: The role of TNF $\alpha$  in chronic inflammatory conditions, intermediary metabolism and cardiovascular risk. *J Lipid Res* 48:751-762, 2007

Posner BI. Regulation of insulin receptor kinase activity by endosomal processes: possible areas for therapeutic intervention. *Curr Opin Investig Drugs* 4:430-434, 2003

Potempa J, Korzus E, Travis J: The serpin superfamily of proteinase inhibitors: structure, function, and regulation. *J Biol Chem* 269:15957-15960, 1994

Rabe K, Lehrke M, Parhofer KG, Broedl UC: Adipokines and Insulin Resistance. *Mol Med* 14:741-751, 2008

Ramacle C, Gregoire F: Cellular and molecular biology in the study of obesity. *Acta Clin Belg Suppl* 14:3-12, 1992

Ramirez-Zacarias JL, Castro-Muñozledo F, Kuri-Harcuch W: Quantitation of adipose conversion and triglycerides by staining intracytoplasmic lipids with oil red O. *Histochemistry* 97:493-497, 1992

Rangwala SM, Lazar MA: Transcriptional control of adipogenesis. *Annu Rev Nutr* 20:535-559, 2000

Rosen ED, Walkey CJ, Puigserver P, Spiegelman BM: Transcriptional regulation of adipogenesis. *Genes Dev* 14:1293-1307, 2000.

Ruan H, Hacohen N, Golub TR, Parijs LV, Lodish HF: Tumor necrosis factor- $\alpha$  suppresses adipocyte-specific genes and activates expression of preadipocyte genes in 3T3-L1 adipocytes: Nuclear factor-kappaB activation by TNF- $\alpha$  is obligatory. *Diabetes* 51:1319-1336, 2002

Ruan H, Lodish HF: Insulin resistance in adipose tissue: direct and indirect effects of tumor necrosis factor- $\alpha$ . *Cytokine Growth Factor Rev* 14:447-455, 2003

Ruan H, Miles PDG, Ladd CM, Ross K, Golub TR, Olefsky JM, Lodish HF: Profiling gene transcription *in vivo* reveals adipose tissue as an immediate

target of tumor necrosis factor- $\alpha$ : Implications for insulin resistance. *Diabetes* 51:3176-3188, 2002

Shao D, Lazar MA: Peroxisome proliferator activated receptor  $\gamma$ , CCAAT/enhancer-binding protein  $\alpha$ , and cell cycle status regulate the commitment adipocyte differentiation. *J Biol Chem* 272: 21473-21478, 1997

Schena M: Genome analysis with gene expression microarrays. *Bioessays* 18:427-431, 1996

Schwarz EJ, Reginato MJ, Shao D, Krakow SL, Lazar MA: Retinoic acid blocks adipogenesis by inhibiting C/EBP $\beta$ -mediated transcription. *Mol Cell Biol* 17:1552-1561, 1997

Shoelson SE, Lee J, Goldfine AB: Inflammation and insulin resistance. *J Clin Invest* 116: 1793-1801, 2006

Scroyen I, Christiaens V, Lijnen HR: No functional role of plasminogen activator inhibitor-1 in murine adipogenesis or adipocyte differentiation. *J Thromb Haemost* 5:139-145, 2007

Sen GL, Blau HM: A brief history of RNAi: the silence of the genes. *FASEB J* 20:1293-1299, 2006

Shiba T, Higashi N, Nishimura Y: Hyperglycaemia due to insulin resistance caused by interferon-gamma. *Diabet Med* 15:435-436, 1998

Silverman GA, Bird PI, Carrell RW, Church FC, Coughlin PB, Gettins PGW, Irving JA, Lomas DA, Luke CJ, Moyer RW, Pemberton PA, Remond-O'Donnell, Salvesen GS, Travis J, Whisstock JC: The serpins are an expanding superfamily of structurally diverse proteins. *J Biol Chem* 276:33293-33296, 2001.

Spiegelman BM, Choy L, Hotamisligil GS, Graves RA, Tontonoz P: Regulation of adipocyte gene expression in differentiation and syndromes of obesity/diabetes. *J Biol Chem* 268:6823-6826, 1993

Spiegelman BM, Flier JS: Obesity and the regulation review of energy balance. *Cell* 104:531-543, 2001

Stone RL, Bernlohr DA: The molecular basis for inhibition of adipose conversion of murine 3T3-L1 cells by retinoic acid. *Differentiation* 45:119-127, 1990

Suruyawan A, Hu CY: Effect of retinoic acid on differentiation of cultured pig preadipocytes. *J Anim Sci* 75:112-117, 1997

Taleb S, Canello R, Clément K, Lacasa D: Cathepsin S promotes human preadipocyte differentiation: possible involvement of fibronectin degradation. *Endocrinology* 147:4950-4959, 2006

Tamori Y, Masugi J, Nishino N, Kasuga M: Role of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma in maintenance of the characteristics of mature 3T3-L1 adipocytes. *Diabetes* 51:2045-55, 2002

Tong Q, Dalgin G, Xu H, Ting CN, Leiden JM, Hotamisligil GS: Function of GATA transcription factors in preadipocyte-adipocyte transition. *Science* 290:134-138, 2000

Tong Q, Hotamisligil GS: Molecular mechanisms of adipocyte differentiation. *Rev Endocr Metab Disord* 2:349-355, 2001

Torti FM, Torti SV, Larrick JW, Ringold GM: Modulation of adipocyte differentiation by Tumor Necrosis Factor and Transforming Growth Factor Beta. *J Cell Biol* 108:105-113, 1989

Valenzuela A, Sanhueza J: El tejido adiposo: Algo más que un reservorio de energía. *Grasas y aceites* 60:437-450, 2009

Velculescu VE, Zhang L, Vogelstein B, Kinzler KW: Serial analysis of gene expression. *Science* 270:484-487, 1995

Warne JP: Tumour necrosis factor  $\alpha$ : a key regulator of adipose tissue mass. *J Endocrinol* 177:351-355, 2003

Xing H, Northrop JP, Grove JR, Kilpatrick KE, Su J, Ringold GM: TNF $\alpha$ -mediated Inhibition and reversal of adipocyte differentiation is accompanied by suppressed expression of PPAR $\gamma$  without effects on Pref-1 expression. *Endocrinology* 138:2776-2783, 1997

Xu H, Hotamisligil GS: Signaling pathways utilized by tumor necrosis factor receptor 1 in adipocytes to suppress differentiation. *FEBS Lett* 506:97-102, 2001

Xu H, Sethi JK, Hotamisligil GS: Transmembrane tumor necrosis factor (TNF)-alpha inhibits adipocyte differentiation by selectively activating TNF receptor 1. *J Biol Chem* 274:26287-26295, 1999

Xue JC, Schwarz EJ, Chawla A, Lazar MA: Distinct stages in adipogenesis revealed by retinoid inhibition of differentiation after induction PPAR $\gamma$ . *Mol Cell Biol* 16:1567-1575, 1996

Yang M, Zhang Y, Pan J, Sun J, Liu J, Libby P: Cathepsin L activity controls adipogenesis and glucose tolerance. *Nat Cell Biol* 9:970-977, 2007

Ye J: Emerging role of adipose tissue hypoxia in obesity and insulin resistance. *Int J Obesity* 33:54-66, 2009

Yin X, Han J, Luo T, Wang L, Chen S, Zhao Y: Cathepsin K in adipocyte differentiation and its potential role in the pathogenesis of obesity. *J Clin Endocrinol Metab* 91:4520-4527, 2006

Yuan M, Konstantopoulos N, Lee J, Hansen L, Li ZW, Shoelson SE: Reversal of obesity and diet induced insulin resistance with salicylates or targeted disruption of Ikkbeta. *Science* 293:1673-1677, 2001

Zhang B, Berger J, Hu E, Szalkowski D, White-Carrington S, Spiegelman BM: Negative regulation of peroxisome proliferator-activated receptor-gene expression contributes to the antiadipogenic effects of tumor necrosis factor- $\alpha$ . *Mol Endocrinol* 10:1457-66, 1996

Zou C, Wang Y, Shen Z: 2-NBDG as a fluorescent indicator for direct glucose uptake measurement. *J Biochem Biophys Meth* 64:207-215, 2005

Zvonic S, Lefevre M, Kilroy G, Floyd E, DeLany JP, Kheterpal I, Gravois A, Dow R, White A, Wu X, Gimble JM: Secretome of primary cultures of human adipose-derived stem cells: modulation of serpins by adipogenesis. *Mol Cell Proteomics* 6:18-28, 2007

## 9. ANEXO

Artículo aceptado para publicación en Cytokine Journal

From: **Cytokine** <[cytokine@elsevier.com](mailto:cytokine@elsevier.com)>

Date: 2014-05-30 13:42 GMT-05:00

Subject: CYTO-14-83R1 - Final Decision

To: [olivo@ipicyt.edu.mx](mailto:olivo@ipicyt.edu.mx)

Ms. No.: CYTO-14-83R1

Title: SerpinA3g participates in the antiadipogenesis and insulin-resistance induced by tumor necrosis factor- $\alpha$  in 3T3-F442A cells

Corresponding Author: Dr. Luis A. Salazar-Olivo

Authors: Rebeca Mejia-Elizondo, M.Sc.; Angel J Alonso-Castro, Ph.D.; Patricia Ponce-Noyola, Ph.D.; Vilma Maldonado-Lagunas, Ph.D.; Jorge Melendez-Zajgla, Ph.D.; Victor Mateo Saavedra-Alanis, Ph.D.

Dear Dr. Salazar-Olivo,

I am pleased to inform you that your manuscript referenced above has been accepted for publication in Cytokine. Proofs of the article-in-press will be sent to you in 3-4 weeks.

Cytokine is the official journal of the International Cytokine Society whose principal function is to hold a major conference annually at different sites around the world. If you are not already a member of the International Cytokine Society and wish to know more about its activities, please visit <http://www.weizmann.ac.il/cytokine/>.

When your paper is published on ScienceDirect, you want to make sure it gets the attention it deserves. To help you get your message across, Elsevier has developed a new, free service called AudioSlides: brief, webcast-style presentations that are shown (publicly available) next to your published article. This format gives you the opportunity to explain your research in your own words and attract interest. You will receive an invitation email to create an AudioSlides presentation shortly. For more information and examples, please visit <http://www.elsevier.com/audioslides>.

Thank you for sending the results of your interesting work to Cytokine. I look forward to receiving additional papers from you in the future.

With kind regards,

Michael Tovey, Ph.D., (Associate Editor)  
Cytokine