



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA  
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS  
DEPARTAMENTO DE  
CIENCIAS BIOLÓGICAS

**"ALTERACIONES DEL PROCESO ADIPOGÉNICO *IN*  
VITRO EN MODELOS EXPERIMENTALES DE SÍNDROME  
METABÓLICO"**

Lic. María Guillermina Zubiría  
2014



El presente trabajo de tesis para optar por el grado de Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata, ha sido realizado bajo la dirección del Dr. Andrés Giovambattista y la co-dirección del Dr. Eduardo Spinedi, en el Laboratorio de Neuroendocrinología del Instituto Multidisciplinario de Biología Celular (IMBICE).

La Plata, Abril de 2014.

...lento pero viene

el futuro se acerca

despacio

pero viene

ya casi está llegando

con su mejor noticia

con puños con ojeras

con noches y con días

...lento pero viene

el futuro real

el mismo que inventamos

nosotros y el azar

cada vez más nosotros

y menos el azar...

*Mario Benedetti.*

## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero agradecer a Bamba, mi director por enseñarme y brindarme sus conocimientos, por darme el espacio para aprender y equivocarme, por hacer divertido el trabajo en el laboratorio y por sobre todas las cosas por la paciencia que me has tenido.

A mis compañeras del laboratorio, Ana y Amanda por toda la ayuda, el apoyo y las dedicadas correcciones. A Juanis por haber compartido conmigo la primer parte de este trabajo. A Yesi y Andre por este último tiempo compartido en el laboratorio.

En especial a Lu, por ser mi compañera día a día, porque nos cruzó la vida y anduvimos juntas por este arduo camino de hacer la tesis. Por el apoyo y contención en la mesada y en la vida. Por hacerme reír...te voy a extrañar tanto!

A mis papas, por el valioso esfuerzo que siempre hicieron para que pueda formarme, por estar incondicionalmente y por haberme dado la familia hermosa que tengo.

A mis tres hermanas por estar siempre, por la unión y la constante presencia que me hace sentir las cerca.

A Juli, Santi, Cata, Martu, Male y Lucio por los abrazos que curan todo.

A Lau, mi gran AMIGA, por estar siempre que la necesito, por dejarme ser la Nana de la "Enana" más hermosa. Gracias a los tres por convertirse en mi familia de acá. Te adoro!!!

A mis amigas Ro, Yani, Miris y Clau porque siempre están, por los mensajitos y por el apoyo en este último tiempo!!!

A Luba, por su compañía y sus esperas pacientes para salir a la plaza.

A Mari por las charlas y almuerzos por Skype.

A Marix y Euge por los esporádicos, pero no menos importantes encuentros.

A Juan, Lau, Loli, Fer y la Peque, por mantener tantos años de amistad.

A Lucio por el soporte técnico de último momento y por darme ánimo en la recta final.

A toda la gente del IMBIKEY por el lindo ambiente de trabajo. A todos los becarios con los que compartí el día a día, en especial a los chicos de Becarios 1: Bel, Lau, Javi, Mariel y Juli, gracias por los mates y las charlas.

A Agus y Sil, que junto con Lu nos tocó compartir los años de doctorado. Seguimos restando!

A la gente del Bioterio, del Sector de Cultivos y del Sector de Lavado por su buena predisposición, en especial a Dani por ayudarme con las cirugías y a Joel por el material siempre a punto.

A Griselda, por las lindas horas compartidas esperando que aparezcan las benditas nubecitas. A toda la gente del LISIN por ayudarme con el citómetro.

A la gente del IGEVET, especialmente a Diego por todas las veces que me recibió para usar el Nanodrop.

Al IMBICE y sus autoridades por darme el lugar donde realizar esta Tesis.

Al Dr. Eduardo Spinedi por ser el co-director de esta Tesis y por sus aportes a la misma.

Al CONICET y la ANPCyT por otorgarme las becas que me permitieron realizar este proyecto.

Y a todas las ratitas que desinteresadamente se brindaron en pos de estos resultados!!

# ÍNDICE

|  |    |
|--|----|
| ÍNDICE.....  | 3  |
| ABREVIATURAS .....   | 6  |
| INTRODUCCIÓN .....   | 8  |
| El surgimiento del Síndrome Metabólico como una afección epidémica.....                            | 9  |
| SM y Obesidad en América Latina y en Argentina. ....   | 11 |
| Síndrome Metabólico y su asociación con la obesidad. ....  | 13 |
| Componentes dietarios y hormonales que influyen en la generación de alteraciones metabólicas. .... | 14 |
| Consumo excesivo de fructosa. ....   | 14 |
| Exceso de glucocorticoides. ....   | 17 |
| Tejido Adiposo y Adipogénesis.....   | 20 |
| HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....   | 29 |
| Hipótesis.....   | 30 |
| Objetivo General.....  | 30 |
| Objetivos específicos .....  | 31 |
| DISEÑO EXPERIMENTAL Y METODOLOGÍA .....  | 32 |
| 1. Animales experimentales. ....   | 33 |
| 2. Diseño Experimental. ....   | 33 |
| 2.1. Generación de los animales MSG.....   | 33 |
| 2.2. Generación de los animales con Síndrome Metabólico inducido por consumo de fructosa. ....     | 34 |
| 2.3. Diseño experimental general.....  | 34 |
| 3. Técnicas Quirúrgicas utilizadas en el Modelo MSG: Adrenalectomía.....                           | 35 |
| 4. Obtención de las muestras de Plasma. ....   | 36 |
| 5. Medida de diferentes metabolitos en circulación.....  | 36 |
| 5.1. Determinación de Glu. ....  | 36 |
| 5.2. Determinación de TG. ....   | 36 |
| 5.3. Determinación de LEP. ....  | 36 |
| 5.4. Determinación de CORT. ....   | 37 |
| 5.5. Determinación de INS.....   | 38 |
| 5.6. Determinación de Adipoq y TNF $\alpha$ . ....   | 38 |
| 6. Obtención del TARP. ....  | 38 |

|   |    |
|---|----|
| 7. Aislamiento de adipocitos y de las células de la FEV del TARP. ....            | 38 |
| 8. Cuantificación del tamaño celular adipocitario.....                            | 39 |
| 9. Análisis de la composición de la FEV por Citometría de Flujo (FACS).....       | 40 |
| 10. Análisis de marcadores específicos de las células de la FEV.....              | 40 |
| 11. Cultivo de las células de la FEV.....   | 41 |
| 12. Estudio de la capacidad proliferativa de las células de la FEV.....           | 41 |
| 13. Diferenciación adipocitaria <i>in vitro</i> . ....                            | 42 |
| 14. Determinaciones <i>in vitro</i> .....   | 42 |
| 14.1. Extracción de ARN total y cuantificación por PCR Tiempo Real (qPCR). ....   | 42 |
| 14.2. Ensayo de Inmunofluorescencia (IF).....                                     | 44 |
| 14.3. Contenido intracelular de lípidos.....                                      | 44 |
| 14.4. Determinación de la liberación de LEP.....                                  | 45 |
| 14.5. Tinción de Papanicolaou.....  | 45 |
| 14.6. Determinación de porcentaje de diferenciación y grados de maduración. ....  | 46 |
| 15. Análisis estadístico. ....  | 46 |
| RESULTADOS .....  | 48 |
| Modelo de SM con aumento de GCs endógenos.....                                    | 49 |
| Modelo MSG en ratas macho de 30 días de edad.....                                 | 49 |
| Características generales.....  | 49 |
| Características del TARP.....   | 49 |
| Parámetros de diferenciación adipocitaria <i>in vitro</i> . ....                  | 51 |
| Análisis de marcadores adipogénicos <i>in vitro</i> .....                         | 52 |
| Análisis del grado de avance del proceso de diferenciación <i>in vitro</i> .....  | 55 |
| Caracterización de las células de la FEV.....                                     | 57 |
| Modelo MSG en ratas macho de 60 días de edad.....                                 | 62 |
| Características generales.....  | 62 |
| Características del TARP.....   | 62 |
| Comparación de parámetros metabólicos de las ratas MSG. ....                      | 64 |
| Parámetros de diferenciación adipocitaria <i>in vitro</i> . ....                  | 65 |
| Análisis de marcadores adipogénicos <i>in vitro</i> .....                         | 67 |
| Análisis del grado de avance del proceso de diferenciación <i>in vitro</i> . .... | 69 |
| Caracterización de las células de la FEV.....                                     | 71 |
| Modelo MSG con normalización de corticosteronemia.....                            | 76 |
| Parámetros de diferenciación adipocitaria <i>in vitro</i> . ....                  | 78 |
| Estudio de diversos marcadores en las células de la FEV.....                      | 81 |

---

|   |     |
|---|-----|
| Modelo de SM por consumo de una DRF. ....   | 83  |
| Modelo DRF a 3 semanas. ....  | 83  |
| Características generales. ....   | 83  |
| Características del TARP. ....  | 83  |
| Parámetros de diferenciación adipocitaria <i>in vitro</i> . ....                  | 85  |
| Análisis de marcadores adipogénicos <i>in vitro</i> . ....                        | 86  |
| Análisis del grado de avance del proceso de diferenciación <i>in vitro</i> . .... | 89  |
| Caracterización de las células de la FEV. ....                                    | 90  |
| Modelo DRF de 8 semanas. ....   | 95  |
| Características generales. ....   | 95  |
| Características del TARP. ....  | 96  |
| Comparación de parámetros metabólicos de las ratas DRF. ....                      | 98  |
| Parámetros de diferenciación adipocitaria <i>in vitro</i> . ....                  | 99  |
| Análisis de marcadores adipogénicos <i>in vitro</i> . ....                        | 100 |
| Análisis del grado de avance del proceso de diferenciación <i>in vitro</i> . .... | 102 |
| Caracterización de las células de la FEV. ....                                    | 104 |
| DISCUSIÓN. ....   | 108 |
| Consideraciones generales ....  | 109 |
| Modelo de Síndrome Metabólico con elevados glucocorticoides. ....                 | 111 |
| Modelo de Síndrome Metabólico inducido por alto consumo de fructosa. ....         | 124 |
| CONCLUSIONES FINALES. ....  | 138 |
| BIBLIOGRAFÍA. ....  | 144 |



# ABREVIATURAS

ACTH: Hormona Adrenocorticotrofina

ADX: Adrenalectomía

Adipoq: Adiponectina

AGL: ácidos grasos libres

ASP: Proteína estimuladora de la acilación

CORT: Corticosterona

CPA: Células Precursoras Adipocitarias

CPM: Células Mesenquimáticas Pluripotentes

CRH: Hormona Liberadora de Corticotrofina

Dexa: Dexametasona

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium

DRF: Dieta Rica en Fructosa

ENFR: Encuesta Nacional de Factores de Riesgo

FEV: Fracción Estroma Vascular

GCs: Glucocorticoides

GH: Hormona de Crecimiento

Glu: Glucosa

GR: Receptor de Glucocorticoides Tipo 2

HHA: Eje Hipotálamo-Hipófiso-Adrenal

HSD-1: 11- $\beta$  hidroxí-esteroide deshidrogenasa 1

HSD-2: 11- $\beta$  hidroxí-esteroide deshidrogenasa 2

IBMX: 3-isobutil-1-metilxantina

I.p.: Intraperitoneal

IL-1: Interleuquina-1

IL-6: Interleuquina-6

INS: Insulina

JMAF: Jarabe de Maíz de Alta Fructosa

LDN: Lipogénesis de Novo

LEP: Leptina

LPL: Lipoprotein lipasa

MR: Receptor de Glucocorticoides Tipo 2, Receptor de Mineralocorticoides

MSG: Mono Sodio Glutamato

NA: Núcleo Arcuato

PAI-1: Inhibidor del Activador de Plasminógeno 1

PPAR $\gamma$ 2: Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- $\gamma$ 2

Pref-1: Factor de Preadipocitos-1

RIA: Radio Inmuno Análisis

SC: Síndrome de Cushing

SM: Síndrome Metabólico

TAB: Tejido Adiposo Blanco

TAE: Tejido Adiposo Epididimal

TAM: Tejido Adiposo Mesentérico

TAP: Tejido Adiposo Parametrial

TAP: Tejido Adiposo Pardo

TAPR: Tejido Adiposo Perirrenal

TARP: Tejido Adiposo Retroperitoneal

TASC: Tejido Adiposo Subcutáneo

TG: Triglicéridos

TNF- $\alpha$ : Factor de Necrosis Tumoral alfa

UCP-1: Proteína Desacoplante 1

Wnt: Wingless-type MMTV (Mouse mamary tumor virus)

Wnt10b: Wingless-type MMTV 10 b

Zfp423: Proteína tipo "zinc-finger" 423

## INTRODUCCIÓN

---

## **El surgimiento del Síndrome Metabólico como una afección epidémica.**

Si realizamos un recorrido a lo largo de la **historia** de la humanidad, podemos enumerar diversos aspectos del desarrollo socio-económico que no siempre han tenido un efecto netamente favorable sobre la salud del hombre. Si nos centramos específicamente en aquellos aspectos relacionados con el metabolismo y el gasto energético podemos observar que los cambios han sido en su mayoría desfavorables y han contribuido a establecer patologías tales como el Síndrome Metabólico (SM) y la obesidad.

Dentro de los cambios producidos por el desarrollo global, las variaciones en la disponibilidad de alimentos resultó ser uno de los más drásticamente afectados. El primer cambio que podemos mencionar es la aparición de la agricultura y posteriormente la domesticación de animales, desde hace miles de años, que conllevaron a un desplazamiento de los antiguos hábitos de caza y recolección <sup>1</sup>. Este surgimiento de nuevas costumbres, y su posterior mejoramiento, permitió a los seres humanos resolver en parte los problemas de obtención de alimentos, a la vez de disminuir la energía invertida en la búsqueda de los mismos.

Si seguimos avanzando en el tiempo, la Revolución Industrial entre los siglos XVIII y XIX, también resultó un quiebre fundamental en diversos aspectos. El desarrollo, ahora más centrado en la modernización de la industria, afectó a las actividades laborales, pasando de una economía de herramienta a una economía de máquina <sup>2</sup>. Justamente la mecanización de las actividades laborales fue el principal cambio ocurrido en esta revolución y el de mayor impacto sobre los aspectos que estamos analizando. Gran parte del consumo energético invertido hasta ese momento en las actividades laborales por el hombre, fue reemplazado por la utilización de la máquina de vapor y luego de los motores eléctricos, contribuyendo a la disminución del mismo.

Si ahora nos centramos en las **últimas décadas**, la velocidad de desarrollo de todos los aspectos mencionados, sumado a la aparición de nuevas tecnologías, ha superado sin dudas a cualquier

predicción posible. El impacto de dichas tecnologías no sólo alcanzó únicamente el ámbito laboral, sino también el ocio y las actividades cotidianas, pudiendo observarse claramente en un creciente uso de vehículos y dispositivos electrónicos que conllevan a una disminución en la actividad física, en todas las edades y estratos sociales de una sociedad cada vez más urbanizada<sup>3</sup>. Adicionalmente la calidad de la alimentación es otro aspecto que ha sufrido grandes cambios, predominando las dietas no equilibradas compuestas en su mayoría por alimentos hipercalóricos ricos en grasas y azúcares, pero pobres en vitaminas, minerales y otros micronutrientes.

En la **actualidad** la obesidad y el sobrepeso se han convertido en afecciones con características epidémicas que han alcanzado tanto a países desarrollados como en vías de desarrollo. La magnitud de este fenómeno pudo resultar predecible teniendo en cuenta los cambios ocurridos en el estilo de vida y en los hábitos de alimentación mencionados anteriormente, que llevaron al desarrollo de un nuevo término conocido como **AMBIENTE OBESOGÉNICO**. Este hace referencia a un ambiente en donde se favorece el consumo calórico y se disminuye el gasto energético, como resultado del estilo de vida actual<sup>4</sup>.

Teniendo en cuenta la importancia de este fenómeno la **Organización Mundial de la Salud (OMS)** dio a conocer en el año 2012 una serie de datos arrojados por estudios realizados a nivel mundial, que reflejan la magnitud de la situación actual con respecto a este tema:

- Desde 1980 los casos de obesidad se han más que duplicado en todo el mundo.
- En 2008, 1.400 millones de adultos mayores de 20 años tenían sobrepeso.
- El 65% de la población mundial vive en países donde el sobrepeso y la obesidad se cobran más vidas que la insuficiencia ponderal (peso por debajo del considerado saludable).
- En 2010, alrededor de 40 millones de niños menores de cinco años tenían sobrepeso.

Al referirnos a las patologías relacionadas con el aumento de tejido adiposo (TA), no se puede dejar de lado su naturaleza multifactorial, donde la alimentación, la edad, el nivel de actividad física, el género y el componente genético, entre otros, juegan un papel importante en el desarrollo de la obesidad. Con respecto a este último, es importante notar que el aumento en la



incidencia de la obesidad ocurrió principalmente en las últimas cuatro décadas, por lo que sería impensado adjudicarle al cambio en el acervo genético de la población la responsabilidad de este aumento. Sin embargo, no se puede descartar que dentro de todos los factores involucrados en la etiología de la obesidad, el *background* genético y su interacción con el ambiente es uno de los factores importantes en el establecimiento de la patología <sup>5,6</sup>. De hecho, en seres humanos han sido reportados 127 genes candidatos relacionados con la obesidad o sus alteraciones asociadas <sup>7</sup>.

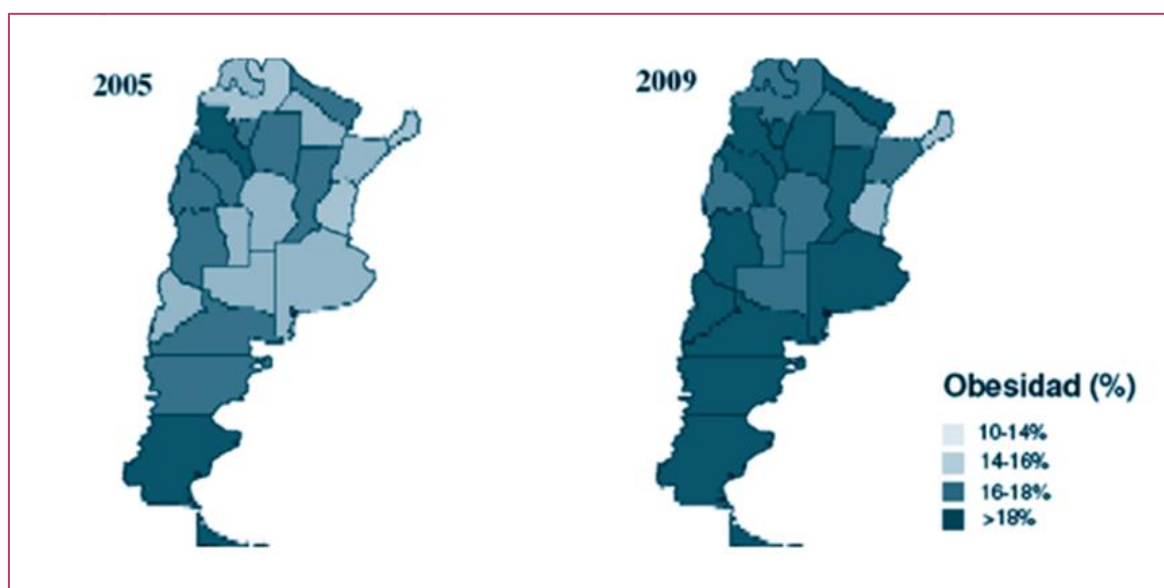
### **SM y Obesidad en América Latina y en Argentina.**

De manera similar a lo que ha ocurrido en los países desarrollados, la obesidad y el sobrepeso se han convertido en dos grandes problemáticas en los países en vías de desarrollo de América Latina. Sin embargo, la existencia de condiciones socio-económicas tan heterogéneas dentro de la población genera un escenario en donde la obesidad, la malnutrición y la pobreza coexisten. Es por esto que el origen y desarrollo de la obesidad en Latinoamérica merecieron un análisis diferencial, teniendo en cuenta que, por causa de la globalización, los cambios socio-culturales antes mencionados son similares a los ocurridos en el resto del mundo, pero el desarrollo económico y las políticas públicas implementadas en salud no son comparables.

En los últimos años se han realizado estudios comparativos que muestran que la prevalencia de obesidad de la población total es mayor al 20% en 17 de los 20 países de Latinoamérica. Un resumen de los datos de dichos estudios en Sudamérica muestra que, en todos los países sudamericanos, excepto Brasil, Colombia y Bolivia, más del 50% de la población presenta sobrepeso. De igual manera en el resto de los países, exceptuando Brasil, Ecuador y Colombia, más del 15% de la población es obesa <sup>8</sup>.

Si nos centramos específicamente en nuestro país, los datos obtenidos en la Segunda Encuesta Nacional de Factores de Riesgo (ENFR) para Enfermedades no Transmisibles del año 2009, muestran que más de la mitad de la población adulta (53,4%) presenta exceso de peso (sobrepeso u obesidad), habiendo aumentado significativamente la prevalencia de obesidad del

14,6% encontrada en la anterior ENFR 2005 al 18% encontrado en la actual. Dicho aumento estuvo presente en todas las regiones y a su vez asociado a los niveles sociales con menor educación y con menores ingresos, tanto a nivel nacional como provincial. Este resultado se condice con lo anteriormente expuesto, siendo nuestro país un claro ejemplo de coexistencia de pobreza y obesidad, tendencia común para todos los países de Latinoamérica <sup>9</sup>.



**Prevalencia de obesidad por provincia comparada ENFR 2005-2009.**

Otros datos importantes a tener en cuenta fueron el aumento en el porcentaje de inactividad física (54,9% en 2009 vs 46,2% en 2005) y el aumento en la prevalencia de diabetes (9,6% en 2009 vs 8,4% en 2005), ambos parámetros relacionados con las causas del establecimiento del SM. Esto es un reflejo de la importancia, a nivel socio-económico, de las políticas de prevención para evitar el detrimento de la salud poblacional y el gasto público asociado <sup>9</sup>.

Al observarse los datos obtenidos en la Encuesta Nacional de Nutrición y Salud 2004-2005 para la población infantil, se encuentra que el 6,6% de la población entre 6 meses y 5 años presenta obesidad, comparado con el 3,8% que presenta desnutrición. De esta manera se observa que los trastornos infantiles de aumento de peso han adquirido una magnitud mayor en los últimos años comparado con aquellas afecciones propias de la pobreza <sup>10</sup>.

Como consecuencia de los datos obtenidos en los distintos relevamientos a nivel nacional, se han desarrollado programas públicos de estimulación de la actividad física y de cuidado de la salud (Plan Nacional Argentina Saludable). Sin embargo, una de las consecuencias más importantes de estos estudios fue la sanción de la Ley Nacional de Obesidad 26.396/08, en donde se establece a la obesidad, su diagnóstico, control y prevención como temas de interés nacional <sup>11</sup>.

### **Síndrome Metabólico y su asociación con la obesidad.**

La OMS ha definido al sobrepeso y la obesidad como "una acumulación anormal o excesiva de Tejido Adiposo Blanco (TAB) que puede ser perjudicial para la salud". Dentro de los trastornos relacionados con el aumento de la masa de TAB, el SM ha sido uno de los más ampliamente estudiados, y abarca varios trastornos que podrían ser la antesala de patologías metabólicas más complejas como la Diabetes Tipo 2 y la obesidad. Con respecto a la definición de SM, en el año 1998 la OMS presentó un conjunto de criterios enfocados principalmente en la presencia de insulino-resistencia, identificada por hiperinsulinemia, tolerancia a la glucosa alterada o diagnóstico de Diabetes Tipo 2, sumado a la presencia de dislipemia e hipertensión. Unos años más tarde, el National Cholesterol Education Program's Adult Treatment Panel III (NCEP: ATPIII) acotó los criterios de diagnóstico a cinco principales: presencia de obesidad central, dislipemia (niveles elevados de triglicéridos y/o niveles bajos colesterol HDL), hipertensión y niveles de glucosa en ayunas alterados. La existencia de al menos tres de estos síntomas es suficiente para el diagnóstico de SM.

La patogénesis del SM comprende una serie de eventos cuyas causas aún no han sido completamente elucidadas. Sin embargo, actualmente la hipótesis más aceptada es la que postula al aumento de los depósitos de TA visceral (TAV) como el principal agente causal del resto de las alteraciones. Específicamente, las células hipertróficas disfuncionales del mismo serían la fuente de diversos factores responsables de la disminución de la insulino-sensibilidad de los tejidos periféricos, entre otras alteraciones. Una de las contribuciones sería el aumento de

ácidos grasos libres (AGL), generados como resultado de un aumento de la lipólisis en el TAV <sup>12</sup>. Adicionalmente, el aumento de secreción de citoquinas pro-inflamatorias (Interleuquina-6 (IL-6), Interleuquina-10 (IL-10) Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF- $\alpha$ )) <sup>13-15</sup>, un perfil de adipocinas alterado (aumento de Leptina (LEP) y disminución de Adiponectina (Adipoq)) <sup>16</sup> también contribuirían a las alteraciones encontradas. Una de las principales consecuencias de estos desbalances sería la insulino-resistencia, caracterizada por la disminución de la sensibilidad a la insulina por parte de los tejidos periféricos. Esta situación genera un incremento de la síntesis de insulina por las células  $\beta$  del páncreas que inicialmente mantiene la homeostasis de la glucosa. Después de un tiempo, la hiperinsulinemia no puede compensar la resistencia generada y surge un estado de hiperglucemia que caracteriza a la Diabetes Tipo 2 <sup>17-19</sup>. Adicionalmente, el aumento de los niveles circulantes de insulina genera, a través de diversos mecanismos, el aumento de la presión arterial <sup>20,21</sup>. De esta manera se completan los componentes característicos del SM. Cabe destacar que si bien todos estos factores son de gran relevancia en el desarrollo del SM, no pueden dejarse de lado otros factores que incluyen el perfil genético del individuo, la inactividad física, la edad y la presencia de otros desbalances hormonales <sup>22</sup>.

## **Componentes dietarios y hormonales que influyen en la generación de alteraciones metabólicas.**

### **Consumo excesivo de fructosa.**

Como se mencionara anteriormente una dieta desfavorable y un estilo de vida sedentario fueron, y continúan siendo, los mayores contribuyentes para el desarrollo del sobrepeso, la obesidad y patologías asociadas. Particularmente el aumento en el consumo de hidratos de carbono se ha convertido en uno de los principales componentes dietarios que contribuyen al aumento en el consumo calórico. Específicamente la fructosa, una cetohehexosa que se encuentra naturalmente en frutas y verduras, es ampliamente utilizada en bebidas endulzadas, así como

también en alimentos procesados. Además de su forma libre, también se puede encontrar unida a la glucosa, formando parte del disacárido sacarosa. Su uso como endulzante comenzó a ser masivo a partir del descubrimiento del Jarabe de Maíz de Alta Fructosa (JMAF), proveniente de la degradación e isomerización enzimática del almidón de maíz <sup>23</sup>. A partir de ese momento, dicho compuesto se convirtió en un producto ampliamente utilizado en la industria alimenticia, por su bajo costo y su mayor poder endulzante.

En las últimas décadas el consumo de fructosa ha aumentado notoriamente a nivel mundial, principalmente por su presencia en bebidas endulzadas. Tal es así que en el año 2007 el consumo promedio de fructosa por persona en los Estados Unidos alcanzó los 49 g/día <sup>24</sup>. Este incremento ha sido relacionado, en estudios epidemiológicos, con el aumento en la incidencia de diversas alteraciones metabólicas, como trastornos cardíacos y obesidad <sup>25</sup>, así como también con enfermedad renal. En particular el consumo de bebidas gaseosas, endulzadas a base de JMAF, ha sido asociado con hipertensión, obesidad y diabetes en adultos <sup>26,27</sup> y con la aparición de obesidad en niños <sup>28,29</sup>.

Adicionalmente, se observó que individuos sanos que consumían dietas ricas en fructosa por más de una semana, desarrollaban diversas alteraciones metabólicas, entre las que se encontraban aumento de triglicéridos plasmáticos y de colesterol total <sup>30-32</sup>, así como también disfunciones en la homeostasis de la glucosa y en la sensibilidad a insulina, presentando un aumento de la glucemia en ayunas y una resistencia al efecto de insulina en el hígado <sup>33,34</sup>. Entre estas alteraciones, los niveles de triglicéridos y la acción de insulina parecieran tener una estrecha relación, siendo los metabolitos lipídicos derivados del metabolismo hepático responsable en parte de la aparición de la resistencia a la insulina <sup>35</sup>.

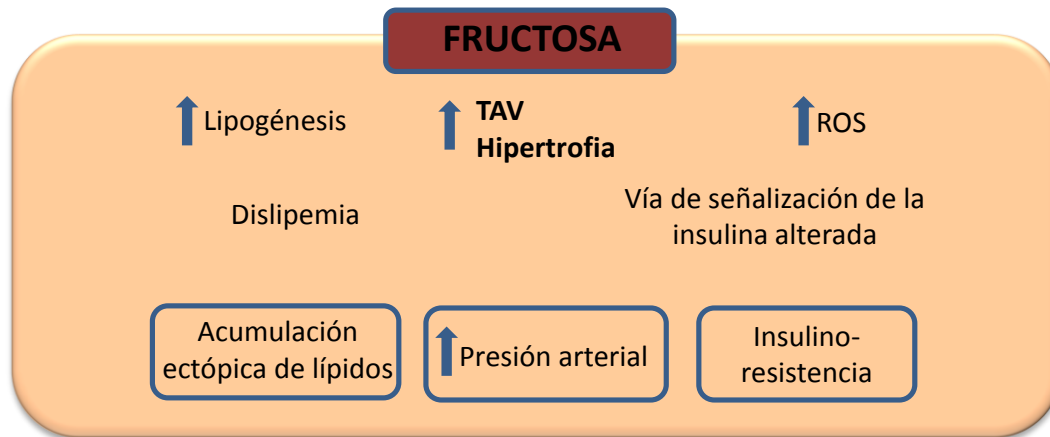
De manera similar se han estudiado los efectos del consumo de fructosa en roedores, obteniendo resultados similares a los hallados en los estudios realizados en seres humanos. Así se ha observado que, la fructosa como componente de la sacarosa o por sí sola, es responsable de la generación de un fenotipo con características similares al SM <sup>36</sup>. Al respecto se ha



observado que, en roedores la administración de una dieta rica en sacarosa por una semana, genera acumulación intrahepática de lípidos <sup>37</sup>. El tratamiento de estos animales con bebidas suplementadas con 10% de fructosa p/v (concentración similar a la utilizada en bebidas endulzadas), generaba aumento de presión arterial, alteraciones en la vasculatura renal <sup>38</sup> y cambios en la expresión de receptores involucrados en la secreción de insulina por el páncreas <sup>39</sup>. Además pareciera existir un efecto extra al suministrar la fructosa como componente del líquido de bebida, ya que se ha observado una mayor ganancia de peso en ratones cuya bebida era endulzada con fructosa en comparación con ratones alimentados con las mismas calorías suministradas en forma de pellet en el alimento <sup>40</sup>. Con respecto a los modelos animales de consumo de fructosa, previamente en nuestro laboratorio se observó que la administración de una solución de 10% de fructosa (p/v) a ratas macho adultas durante 3 semanas, generaba un aumento en los niveles de glucosa, triglicéridos y ácidos grasos libres. Específicamente, en relación al TA abdominal, se vio un aumento de la masa del mismo y del tamaño de los adipocitos, los cuáles presentaban alteraciones en la secreción de adipoquinas (aumento de leptina y adiponectina) <sup>41</sup>.

Es evidente que existe una relación entre las alteraciones generadas por el consumo de fructosa y el metabolismo de la misma. En los seres humanos la mayor parte de la fructosa ingerida se metaboliza rápidamente en el hígado, donde es degradada a triosas fosfato que pueden continuar hacia diversos destinos: ser convertidas en glucosa y/o glucógeno vía gluconeogénesis; ser convertidas a piruvato y oxidarse en el ciclo de krebs o servir como materia prima para la síntesis de ácidos grasos por lipogénesis de novo (LDN) <sup>42</sup>. Esta última es una de las características más importantes del metabolismo de la fructosa, ya que le confiere una gran capacidad lipogénica que se relaciona con sus efectos adversos. Por otra parte, la conversión de fructosa a triosas fosfato en el hígado, a diferencia de la glucosa, es independiente de la acción de insulina y de la regulación a través de ATP y citrato, por lo que este proceso se vuelve independiente del balance energético celular. Ambas características hacen que el metabolismo de la fructosa, a diferencia de otros hidratos de carbono, presente mayores efectos

nocivos para el desarrollo de alteraciones metabólicas, tales como insulino resistencia y dislipemia.

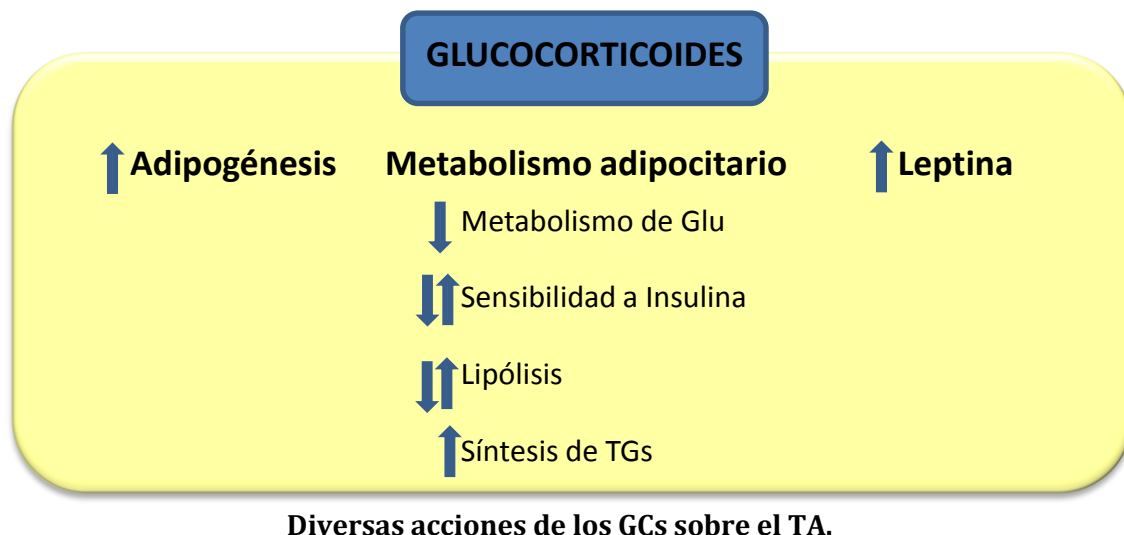


**Principales alteraciones metabólicas generadas por exceso de consumo de fructosa.**

### **Exceso de glucocorticoides.**

Los glucocorticoides (GCs, cortisol en los seres humanos y corticosterona (Cort) en roedores) son hormonas esteroideas sintetizadas en la zona fasciculata de las glándulas suprarrenales y secretadas ante la activación del eje Hipotálamo-Hipófiso-Adrenal (HHA). En respuesta a un estímulo estresor, la hormona liberadora de corticotrofina (CRH) es sintetizada en el núcleo paraventricular del hipotálamo y liberadas de las terminales nerviosas de la eminencia media para ejercer su efecto estimulador sobre la hipófisis anterior, generando la secreción de adrenocorticotrofina (ACTH). Finalmente, la unión de ACTH a sus receptores en la corteza adrenal genera la síntesis y liberación de GCs a circulación. La liberación de estas hormonas permite al organismo mantener la homeostasis en situaciones de estrés, donde la mayor parte de los tejidos aumenta su tasa metabólica y las demandas de energía se incrementan notablemente. Así, los GCs, de manera más tardía, junto con las catecolaminas, de manera inmediata, actúan sobre distintos tejidos generando la liberación de sustratos (principalmente glucosa por el hígado y ácidos grasos por el TAB) para suplir la demanda energética.

Además de los ya conocidos efectos de los GCs en el metabolismo general, también se ha estudiado a lo largo del tiempo el rol de los glucocorticoides en el desarrollo y funcionamiento del TA, encontrándose numerosas acciones de los mismos sobre las funciones del adipocito. Dentro de estas se pueden enumerar la activación de genes que intervienen en la lipogénesis y la regulación de la lipólisis <sup>43</sup>, así como también la modulación de las funciones endócrinas y de la inflamación del TA en la obesidad <sup>44</sup>. Con respecto al desarrollo del TA se conoce que los GCs son necesarios para la estimulación de la diferenciación de los precursores adipocitarios *in vitro* <sup>45</sup>, así como también para el mantenimiento del fenotipo maduro a través de la regulación de genes adipocitarios, tanto *in vitro* como *in vivo* <sup>46</sup>.



La acción de los GCs en las células blanco estaría mediada por el receptor de GCs tipo 2 (GR), miembro de la super-familia de receptores nucleares expresados en la mayoría de los tejidos. Por otra parte, los GCs se unen al receptor de mineralocorticoides (receptor de GCs tipo 1, MR) con una afinidad 10 veces mayor que la propia aldosterona. Este no es un dato menor teniendo en cuenta que los niveles circulantes de GCs son 100-1000 veces mayores que los de aldosterona, y que existe, como se mencionará más adelante, una inter-conversión local de la forma activa a la inactiva de GCs, que en el TAB está desplazada hacia la primera. Sin embargo, la contribución relativa de la acción de GCs a través de GR o a través de MR en el TAB todavía es

un tema sin esclarecerse completamente, donde todavía quedan por resolver cuestiones tales como la acción diferencial de dichos receptores en distintos depósitos de TA <sup>47</sup>.

Cabe destacar que, en el TAB como en otros tejidos, la inter-conversión local de los GCs desde la forma inactiva (cortisona) a cortisol/Cort representa un punto crucial en la acción de dichas hormonas. El pasaje entre ambas formas está regulado por dos enzimas: 11- $\beta$  hidroxisteroide deshidrogenasa 1 y 2, HSD1 y HSD2 respectivamente. La HSD1, es una enzima NADPH dependiente, que se expresa en muchos tejidos, incluido el TAB y actúa predominantemente como reductasa, generando *in vivo* la forma activa de la hormona. Por su parte, la HSD2, cuya función es la inactivación del cortisol y la Cort, es expresada en elevados niveles en el hígado y en los riñones, previniendo la activación de MR por parte de los GCs. La ausencia de HSD1, en roedores sometidos a dietas con alto contenido de lípidos <sup>48,49</sup>, ha tenido un efecto favorable al evitar el desarrollo de obesidad, hiperglucemia y dislipemias, mientras que la sobreexpresión de la enzima provocó un fenotipo de SM <sup>50</sup>. En vista de estos resultados, la inter-conversión local de GCs pareciera jugar un rol preponderante en la expansión del TAB en estados de obesidad donde los niveles de GCs circulantes son normales <sup>51-53</sup>.

Como se mencionó anteriormente, el SM se caracteriza por una serie de alteraciones metabólicas asociadas principalmente al desarrollo de obesidad central. Estas alteraciones se asemejan notoriamente con las encontradas en el Síndrome de Cushing (SC), el cual posee como característica fundamental una hipersecreción de cortisol acompañada de un aumento del TAV <sup>54</sup>, intolerancia a la glucosa e hipertensión <sup>55</sup>. En el SC los altos niveles de GCs cumplen un rol central en el desarrollo del TA y de las alteraciones metabólicas características.

También existen estudios en animales en los que se ha estudiado el efecto del aumento de GCs través de la administración exógena de Cort o Dexametasona (Dexa, un glucocorticoide sintético). Los efectos encontrados fueron el aumento de peso y aumento en los niveles circulantes de insulina y ácidos grasos no esterificados <sup>56</sup>, así como también aumento en los depósitos de TAB <sup>57</sup>.

Dentro de los modelos animales, la administración neonatal de monosodio L-glutamato (MSG) ha sido objeto de estudio de nuestro laboratorio por muchos años, resultando atractivo su abordaje debido a la naturaleza endógena del aumento de GCs circulantes. Si bien este compuesto químico es conocido por ser utilizado en la industria alimentaria como aditivo, dada su propiedad de realzar el sabor de los alimentos (Código HS29224220, Número EE621), también ha sido ampliamente utilizado como una herramienta de estudio en roedores, ya que la administración neonatal (intra-peritoneal, ip) genera la destrucción selectiva de los cuerpos neuronales de las neuronas NPY-érgicas presentes en el núcleo arcuato (NA) del hipotálamo <sup>58</sup>. De esta manera, teniendo en cuenta la presencia de receptores de GCs en el NA, se produce una pérdida de regulación del eje HHA, con la consecuente hiperactividad del mismo y el aumento de los niveles de GCs endógenos <sup>59</sup>. Cabe destacar que existen otros mecanismos que contribuyen a este aumento de GCs en los animales MSG, entre los cuales la hiperactividad celular de la glándula adrenal y la disminución del clearance hepático de los esteroides resultan primordiales <sup>59,60</sup>.

Finalmente, los animales tratados con este neurotóxico, durante la vida adulta, desarrollan un fenotipo caracterizado principalmente por un marcado aumento de los depósitos de TAB, cuyos adipocitos son hipertróficos. Además, como consecuencia de la pérdida de regulación de la secreción de la hormona de crecimiento (GH) ejercida por el NA, estos animales presentan disturbios del crecimiento, mostrando una menor talla <sup>61</sup>. Adicionalmente a las alteraciones del TAB, la hiperleptinemia y la insulino-resistencia presentes en el fenotipo adulto <sup>62-64</sup>, completan el conjunto de características que se asemejan a las encontradas en el SM. Los antecedentes mencionados hicieron del modelo MSG una herramienta útil para el estudio del proceso de expansión del TAB en un modelo de SM con aumento de GCs endógenos.

## **Tejido Adiposo y Adipogénesis.**

En los mamíferos el tejido adiposo se clasifica en dos tipos fundamentales: el **TAB** y el **tejido adiposo pardo (TAP)**. Ambos tejidos, durante el desarrollo embrionario, derivan del



mesodermo, pero a través del proceso de diferenciación alcanzan características y funciones individuales. El TAP alcanza su extensión máxima al momento del nacimiento y su presencia en la vida adulta es dependiente de la especie analizada, así en los seres humanos representa una mínima proporción del tejido adiposo total luego de la etapa neonatal, mientras que en los roedores los depósitos de TAP continúan presentes en cantidades sustanciales aún con el transcurso de los años. La función principal del TAP es la disipación de energía a través de la termogénesis, la cual la logra gracias a la presencia de la proteína desacoplante 1 (UCP-1), que disipa el gradiente electroquímico generado en la respiración celular dentro de las mitocondrias, convirtiéndolo en calor <sup>65</sup>. Se supone que este fenómeno contribuye al mantenimiento de la temperatura corporal en edades tempranas, y que luego de desarrollados otros mecanismos de regulación térmica va perdiendo preponderancia.

Si nos centramos en el estudio del TAB encontramos que por mucho tiempo este tejido fue considerado como un tejido de reserva y sus funciones se limitaban únicamente al almacenamiento y liberación de lípidos para la oxidación por parte del resto de los tejidos del organismo. Sin embargo, con el correr del tiempo se comenzó a descubrir su verdadera naturaleza pleiotrópica. Así, en la actualidad se conoce que el TAB interviene en numerosos procesos fisiológicos y/o patológicos, regulando y participando de forma directa e indirecta. Específicamente, al reconocerse a la obesidad y sus patologías asociadas como uno de los problemas de salud más importantes a nivel mundial, el estudio y conocimiento del TAB han resultado de mucho interés y han avanzado ampliamente en los últimos años <sup>66</sup>.

Como se mencionó anteriormente el desarrollo del TAB ocurre durante las primeras etapas del desarrollo embrionario y su **origen** es mesodérmico. Las células pluripotentes mesenquimáticas (CPM) pueden dar origen a diversos linajes celulares en la medida en que expresan una batería diferencial de factores de transcripción y que responden a diversos estímulos celulares, siendo capaces de diferenciarse a adipocitos, osteoblastos, condrocitos, mioblastos y células del tejido conectivo <sup>67</sup>. Cabe destacar que hasta la fecha no se sabe con

exactitud el número de intermediarios que existen entre las CPM y los adipocitos maduros, ni tampoco se conoce un marcador que permita identificar a ciencia cierta a los precursores adipocitarios. Dentro de las familias de factores de transcripción que intervienen en este proceso, la familia de proteínas Wingless-type MMTV (Mouse mamary tumor virus, Wnt) es fundamental para la determinación osteogénica y miogénica, inhibiendo la determinación adipocitaria <sup>68</sup>. En los últimos tiempos se observó que, a diferencia de lo esperado, los precursores del TAP presentan un origen celular compartido con los miocitos y no con los adipocitos del TAB <sup>69</sup>. Recientemente se describió un nuevo linaje adipocitario, los adipocitos beige presentes en el TAB, los cuales derivan de un precursor común con los adipocitos blancos y podrían también transdiferenciarse de estos bajo un estímulo termogénico <sup>70</sup>.

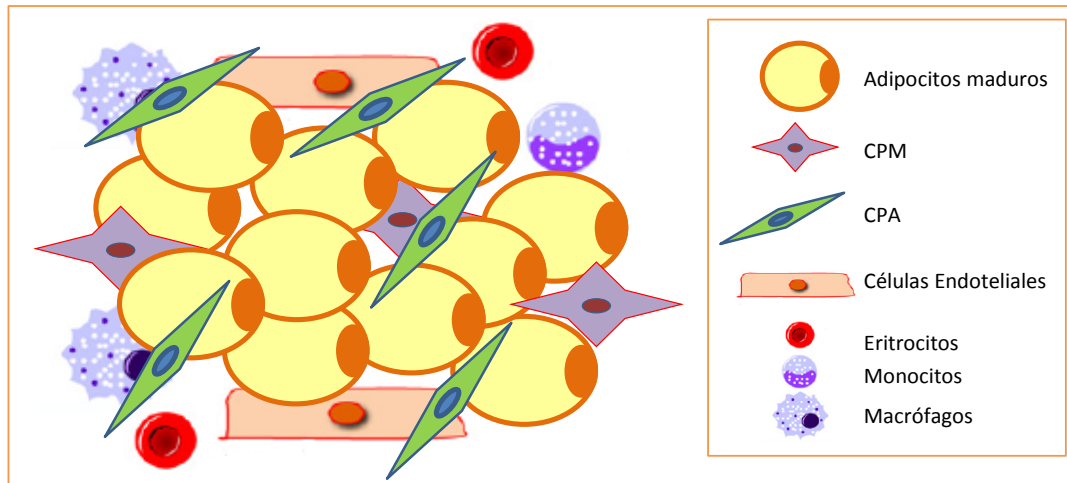
Durante la etapa embrionaria la generación de nuevos adipocitos ocurre por un proceso llamado ADIPOGÉNESIS, que se detallará más adelante. En los seres humanos esto ocurre entre las 14-16 semanas de gestación, continuando en la vida intrauterina alrededor del sexto mes de embarazo y en la etapa perinatal. Durante la vida adulta del individuo este proceso se extiende hasta la adolescencia y luego cobra importancia principalmente en el recambio celular del TAB, alcanzando un valor del 10% anual en personas mayores de 20 años <sup>71</sup>. En roedores recientemente se ha descrito que el desarrollo del TAB ocurre en períodos embrionarios y/o post-natales, y continúa por un período relativamente prolongado luego del nacimiento (más allá del mes de vida), dependiendo de la localización del mismo <sup>72</sup>. Al referirnos al desarrollo alterado del TAB, como puede ser en situaciones de balance energético positivo, la dinámica de expansión resulta distinta. Se ha observado que, tanto en seres humanos como en roedores, este proceso puede ocurrir como resultado de dos contribuciones: la hipertrofia de los adipocitos, por la cual las células maduras aumentan de tamaño como consecuencia de un mayor almacenamiento de lípidos; y la hiperplasia que consiste en la generación de nuevos adipocitos a partir de las células precursoras adipocitarias (CPAs) <sup>73,74</sup>. La cinética con la que ocurre la expansión presentaría una hipertrofia inicial, seguida de un período donde co-existen ambas contribuciones <sup>72,75,76</sup>, y finalmente se generaría una inhibición de la adipogénesis que daría

lugar exclusivamente al componente hipertrófico. El predominio de este último componente daría lugar a la expansión conocida como no saludable del TA, la cual está directamente relacionada con la aparición y desmejora de las alteraciones metabólicas de los fenotipos obesos <sup>77,78</sup>.

La **distribución** del TAB en los mamíferos es discontinua, encontrándose distintos depósitos cuyas características funcionales y de composición varían de uno a otro. A lo largo de todo el organismo de manera general pueden clasificarse dos grandes depósitos: TA subcutáneo (TASC) que representa el 80% del TA total y se localiza como una capa delgada y continua por debajo de la piel; y el TAV, que se localiza alrededor de los órganos de la cavidad abdominal y torácica. Este a su vez se subdivide en otros depósitos, que dependiendo de la proximidad a los distintos órganos adquiere su denominación, así se puede distinguir el TA Retroperitoneal (TARP), TA Perirrenal (TAPR), TA Epididimal (TAE), TA Parametrial (TAP) y TA Mesentérico (TAM). Un parámetro utilizado para identificar la distribución del TA es la relación de la circunferencia cintura-cadera (RCC). Este permite estimar el índice de riesgo de padecer patologías metabólicas asociadas al aumento de peso, teniendo en cuenta que históricamente se le ha adjudicado al TASC un efecto protector en comparación con el TAV <sup>79</sup>. Así, los individuos obesos con bajo RCC (aumento de TASC en el área de las caderas, formato de pera) poseen menor riesgo de padecer complicaciones metabólicas, mientras que aquellos que poseen alto RCC (aumento del TAV, formato de manzana) poseen alto riesgo para estas complicaciones <sup>80</sup>. Como se discutirá más adelante esta relación podría estar asociada a las características de expansión de cada depósito.

Otra de las características del TAB es su **composición celular** heterogénea, donde se pueden encontrar los adipocitos (células maduras) que representan un tercio de las células del TAB, y la **Fracción Estroma Vascular** (FEV) que completa los dos tercios restantes. Esta fracción es una mezcla de diversas poblaciones celulares: entre ellas los preadipocitos o CPAs (células de morfología fibroblástica capaces de diferenciarse a adipocitos), CPM, células endoteliales y

células inmunes, principalmente macrófagos <sup>81</sup>. Existe una estrecha comunicación entre los adipocitos y las células de la FEV a través de diversas señales celulares y hormonales, generando mecanismos que regulan con precisión los procesos de proliferación, diferenciación, inflamación, etc.



**Composición celular del TAB** (modificado de Armani et al. 2010)

Como se mencionó anteriormente, los preadipocitos o CPA son las células que están destinadas a diferenciarse únicamente a adipocitos, sin embargo en ausencia de un estímulo adipogénico, el porcentaje de diferenciación espontánea a adipocitos maduros es casi nulo. De esta manera es preciso diferenciar entre dos términos importantes al hablar del proceso adipogénico: **competencia** y **determinación**. El primero se refiere a la habilidad de las células precursoras a diferenciarse a adipocitos maduros en respuesta a un estímulo definido, mientras que el segundo hace referencia a la "decisión" del destino celular de las CPM a diferenciarse únicamente al linaje adipocitario, es decir a convertirse en preadipocitos.

La identificación de los preadipocitos ha sido un campo de intensa investigación, y el establecimiento de las características que diferencian estas células precursoras de las que no todavía representa un desafío. Sin embargo, la identificación de marcadores de superficie específicos de células multipotentes ha permitido, a través de la técnica de citometría de flujo, aislar una subpoblación presente en la FEV con alto potencial adipogénico, identificada como

las CPA <sup>82</sup>. De esta manera se pudo comprobar que aquellas células que presentaban un patrón básico de marcadores de superficie (CD34+/CD31-/CD45-) <sup>83</sup>, eran capaces de diferenciarse a adipocitos y, a través del uso de modelos murinos transgénicos, se pudo determinar además que su localización era perivascular <sup>84</sup>. De todas maneras existen numerosas estrategias de inmunomarcación utilizadas para la identificación de las CPAs, pero cabe destacar que todas coinciden en que la presencia de CD34 es fundamental para que exista la determinación al linaje adipocitario <sup>85</sup>.

La identificación de factores que definan la competencia de los precursores, ha sido muy útil para poder explicar las respuestas diferenciales de las CPA, frente a estímulos adipogénicos. De esta manera, se encontraron dos factores de transcripción que intervienen en la regulación de la capacidad adipogénica de los precursores: la proteína tipo "zinc-finger" 423 (Zfp423) y el factor de transcripción pro-adipogénico PPAR $\gamma$ 2 (del inglés Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- $\gamma$ ), del cual se hará mención más adelante. Al comparar los perfiles de expresión de diversos linajes de precursores, se pudo observar que, la expresión de Zfp423 era casi exclusiva de aquellas células con potencial adipogénico <sup>86</sup>, y que dicha proteína era necesaria para la diferenciación de la línea 3T3-L1. Adicionalmente, se observó que Zfp423 actúa amplificando los efectos pro-adipogénicos de PPAR $\gamma$ 2 <sup>86,87</sup>, lo que ha sido comprobado al ver una drástica reducción de las células PPAR-positivas luego de silenciar la expresión de Zfp423 <sup>86</sup>.

Como se mencionó anteriormente, la generación de nuevos adipocitos se denomina **ADIPOGÉNESIS**, y comprende básicamente dos pasos: la **determinación** adipocitaria, de la cual ya se hizo referencia, y la **diferenciación terminal**, en la cual las células en respuesta a un estímulo hormonal, adquieren las características de los adipocitos maduros. La regulación del proceso adipogénico involucra una cascada de factores de transcripción y reguladores tanto negativos como positivos, que actúan en diversos puntos del proceso y que responden a señales externas (señales hormonales) o propias de la célula <sup>88</sup>. Dentro de las hormonas que intervienen en este proceso se sabe que los GCs poseen un rol fundamental y, junto con la insulina son dos



de los componentes esenciales para estimular la adipogénesis *in vitro* <sup>89</sup>. Los efectos de activación que los GCs ejercen sobre las células en diferenciación son ejercidos no sólo a través de los propios receptores de GCs (GR), sino también a través de los MR presentes en las células precursoras <sup>90</sup>. La unión de los GCs a estos receptores desencadena una cascada de señalización intracelular que, tal como se describe a continuación, tiene como blanco principal los genes de factores pro o anti-adipogénicos.

Entre los factores anti-adipogénicos conocidos, dos de los más relevantes son: el Factor de Preadipocitos-1 (Pref-1) y algunos miembros de la familia de Wnt (Wnt10b). Pref-1 ha sido relacionado con el mantenimiento de fenotipos celulares indiferenciados <sup>91</sup>, como ocurre en las células precursoras adipocitarias donde su expresión es máxima y luego, con la inducción de la diferenciación, sus niveles disminuyen drásticamente llegando a ser nulos en el adipocito maduro <sup>92</sup>. Este marcado descenso, que *in vitro* es generado principalmente por la acción de los GCs <sup>93</sup>, permite que los factores pro-adipogénicos se activen y ejerzan su efecto. Por otra parte, como ya se mencionó para la vía de señalización de las CPM, la familia Wnt posee un rol trascendente en la determinación de los diversos linajes de precursores. Específicamente, Wnt10b favorece la expresión de genes osteogénicos a expensas de genes adipogénicos <sup>94</sup> y su expresión ectópica inhibe el desarrollo del TAB en ratones transgénicos sometidos a dietas con alto contenido graso <sup>95</sup>.

Luego de la determinación, y una vez que las CPA han sido alcanzadas por el estímulo adipogénico, comienza a etapa de diferenciación terminal. Si bien son muchos los factores de transcripción que intervienen en el proceso adipogénico, **PPAR $\gamma$ 2** y **C/EBP $\alpha$**  (del inglés CCAAT/ enhancer-binding proteins) son los dos factores de transcripción por excelencia, encargados de regular la batería completa de genes del adipocito maduro <sup>96-98</sup>. Ambos presentan un efecto cooperativo en la activación de dichos genes <sup>96</sup>, que estaría dada en parte por la co-localización de sitios de unión en secuencias reguladoras <sup>99</sup>. Cabe destacar que otros dos miembros de la familia de C/EBPs (C/EBP $\beta$  y C/EBP $\delta$ ) intervienen en etapas previas de la

adipogénesis, respondiendo al estímulo adipogénico *in vitro* (específicamente GCs y agonistas de AMPc) y cooperando en la posterior activación de la expresión de C/EBP $\alpha$  y PPAR $\gamma$ 2 <sup>88</sup>. El resultado final es la expresión de los genes de diferenciación terminal y la generación de los adipocitos maduros.

Una de las características fundamentales de los adipocitos es su capacidad de almacenamiento de lípidos en vacuolas intracelulares. Esta acumulación está determinada por el balance entre la síntesis (lipogénesis) y degradación (lipólisis/ $\beta$  oxidación) de triglicéridos. El primer proceso ocurre preferentemente en el TAB y para ello el adipocito expresa todas las enzimas necesarias para la lipogénesis y las proteínas que intervienen en el metabolismo de triglicéridos (Lipoprotein lipasa (LPL), Proteína estimuladora de la acilación (ASP)). Este proceso responde a cambios en la dieta <sup>100</sup>, siendo estimulado por un aumento de carbohidratos e inhibido por los ácidos poli-insaturados y en períodos de ayuno. La glucosa en sí misma puede ser utilizada como sustrato para la lipogénesis y su captación por el adipocito, en respuesta a insulina *in vitro*, está directamente regulada por C/EBP- $\alpha$  y PPAR $\gamma$ 2 <sup>101,102</sup>. Por otra parte, la lipólisis es un proceso que también ocurre en el TAB en respuesta a la demanda de energía, generando ácidos grasos libres y glicerol como resultado de la hidrólisis de los triglicéridos.

Otra característica de los adipocitos maduros es la secreción de adipoquinas, las cuales son compuestos biológicamente activos que intervienen en la integración de múltiples funciones como el balance energético, la ingesta de alimentos, el apetito, la sensibilidad a insulina, entre otros <sup>103</sup>. La leptina (LEP) es un péptido pequeño (16 kDa) producido principalmente por el TAB y codificado por el gen Ob <sup>104</sup>, que está involucrado en la regulación del apetito, la ingesta de alimento y el gasto energético, la actividad del eje HHA, entre otros procesos <sup>105</sup>. Otra adipoquina de importancia significativa es la Adiponectina (Adipoq), una proteína de 30-kDa, producida por el gen apM1 y secretada exclusivamente por los adipocitos maduros <sup>106</sup>. El aumento en la secreción de adiponectina y su acción insulino-sensibilizante son mediados por

los efectos sistémicos de la activación de PPAR $\gamma$ 2, siendo ambos componentes en conjunto los responsables de la regulación de diversas vías metabólicas en el adipocito <sup>107</sup>.

Dentro de la gran variedad de compuestos biológicos que secreta el TAB, se encuentra una amplia variedad de citoquinas (IL-1, IL-6, TNF $\alpha$ ). Si bien los adipocitos maduros aportan a esta secreción, dentro de las células del TAB no son los únicos responsables, las CPA y los macrófagos presentes en la FEV también lo hacen, siendo la principal fuente del aumento de los niveles de IL-6 y TNF- $\alpha$  circulantes en estados de obesidad <sup>14,66,108</sup>. Todos estos compuestos permiten al adipocito participar en una gran red de señalización y comunicación, generando efectos locales, tales como la regulación del metabolismo del TAB y la diferenciación celular <sup>109</sup>, como así también efectos sistémicos sobre otros tejidos, modificando la sensibilidad a insulina y la respuesta inflamatoria.

Por todo lo expuesto, queda reflejada la importancia que posee el TAB en numerosos procesos fisiológicos y en la génesis de diversas alteraciones metabólicas. Es por esta razón que resulta importante poder comprender la naturaleza y temporalidad de los distintos fenómenos que forman parte de la expansión del TAB, así como también los diversos factores ambientales y endógenos que pueden alterar el normal desarrollo del mismo.

## HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

## Hipótesis

Si bien son numerosos los estudios, incluyendo los de nuestro laboratorio, que han sido realizados en referencia al papel del adipocito maduro y su relación con los trastornos metabólicos en situaciones de hiperadiposidad; contrariamente poco se ha indagado acerca de las potenciales modificaciones del proceso adipogénico y de las características de las células precursoras en diferentes fenotipos con disfunciones del TA.

Por este motivo, la hipótesis de esta Tesis plantea que:

Los cambios en el número y/o la competencia de las CPAs condicionan la capacidad adipogénica y en consecuencia la naturaleza de la expansión del TARP durante el desarrollo del SM.

## Objetivo General

**Evaluar "in vitro" las potenciales modificaciones del proceso adipogénico en diferentes fenotipos de SM: inducido por una dieta rica en fructosa o dependiente de una elevada producción de glucocorticoides endógenos.**

## Objetivos específicos

Como objetivos específicos, entre otros, se proponen:

1. Estudiar el efecto de la ingesta de una DRF durante un período de 3 y 8 semanas sobre la capacidad de diferenciación *in vitro* de las células de la FEV del TARP de animales adultos;
2. Estudiar el potencial adipogénico de las células provenientes de la FEV del TARP de animales prepuberales y adultos jóvenes con obesidad central y altos niveles plasmáticos de GCs;
3. Relacionar las alteraciones de la capacidad adipogénica de las células de la FEV del TARP y su relación con la competencia y el número de CPAs provenientes de animales de ambos modelos y en diversos períodos de progresión del fenotipo;
4. Evaluar el balance de los factores pro- y anti-adipogénicos en las células de la FEV del TARP y su posible influencia en el potencial adipogénico de los diferentes grupos experimentales.
5. Establecer las distintas contribuciones de la hiperplasia e hipertrofia en el proceso de expansión del TARP, *in vitro* a través del análisis de la capacidad adipogénica de las células de la FEV e *in vivo* a través del análisis de distribución de tamaños adipocitarios.

# DISEÑO EXPERIMENTAL Y METODOLOGÍA

## 1. Animales experimentales.

En todos los experimentos realizados, se utilizaron ratas de la cepa Sprague-Dawley, generadas por el Servicio de Bioterio del I.M.B.I.C.E. Las ratas se mantuvieron en cuartos con ciclos de luz (12 hs) y oscuridad (12 hs) controlado (con el período de luz de 07:00 hs a 19:00 hs), temperatura constante ( $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ) y libre acceso a bebida y alimento balanceado comercial para rata/ratón.

Todos los protocolos experimentales fueron aprobados por la Comisión Institucional de Uso de Animales para Experimentación del I.M.B.I.C.E., y tanto la manipulación como el sacrificio de los animales se llevó a cabo de acuerdo a las normas internacionales aceptadas <sup>110</sup>.

## 2. Diseño Experimental.

### 2.1. Generación de los animales MSG.

Para este protocolo, las crías recién nacidas fueron inyectadas en los días 2, 4, 6, 8, y 10 de vida, por vía intraperitoneal (ip), con Monosodio L-Glutamato en una dosis de 4 mg/gr de peso (Sigma Chemical Co., St Louis, MO) disuelto en solución de 0,9% NaCl estéril (animales experimentales MSG). Se repitió el mismo esquema de trabajo en el grupo control (CTR) a los que se le inyectó una solución hipertónica de NaCl (10 %). Las crías se destetaron y sexaron a los 21 días de edad y las ratas macho (grupos CTR y MSG) se mantuvieron en jaulas individuales, con alimento y bebida *ad libitum* hasta ser utilizadas en las distintas edades experimentales: a los 30 días de vida (Modelo de SM a etapa prepuberal) y entre los 60 días de vida (Modelo de SM a edad adulta). Un grupo adicional de animales fue utilizado a los 39 días de vida para realizar la cirugía de Adrenalectomía (ADX) o simulación (SHAM) e implantación de pellet placebo (P) o de liberación constante de CORT (CORT), como se detallará más adelante. Estos animales se separaron en los distintos grupos experimentales según el tratamiento recibido: MSG-ADX+CORT, MSG-SHAM+P y CTR-SHAM+P.

La efectividad del tratamiento neurotóxico fue evaluada en todos los animales experimentales el día del sacrificio, a través la observación macroscópica de la degeneración del nervio óptico.

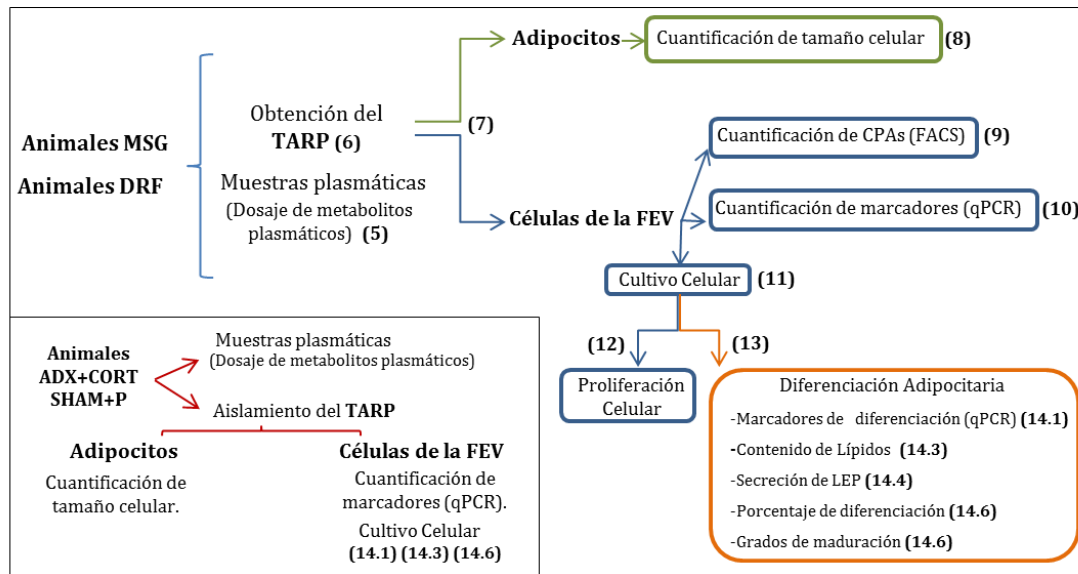


## **2.2. Generación de los animales con Síndrome Metabólico inducido por consumo de fructosa.**

Para este protocolo se utilizaron ratas macho las cuales a los 21 días de vida fueron destetadas y fueron alojadas en jaulas grupales hasta el día 60 de vida, momento en el cual se separaron en jaulas individuales y se dividieron en dos grupos: que recibió comida estándar y bebida ad libitum (grupo CTR) y otro que recibió comida estándar y una solución de fructosa 10% (p/v) en el agua de bebida ad libitum (grupo DRF) durante un período de tres u ocho semanas. Todos los animales se mantuvieron en jaulas individuales hasta el día experimental y se registró el peso corporal, el consumo de alimento y de bebida.

## **2.3. Diseño experimental general.**

Para los animales de todos los grupos y edades se procedió de igual manera (ver esquema). En el día experimental se recolectó la sangre corporal para las posteriores cuantificaciones de metabolitos en circulación como se explica en los distintos Items del Punto 5. También se disecó y pesó el TARP, del cual se aislaron, como se detallará posteriormente (Punto 7), los adipocitos maduros para el análisis de tamaños adipocitarios (Punto 8) y las células de la FEV para la realización de los distintos protocolos *in vitro*. En este último caso, se estudió por un lado la composición celular de la FEV por citometría de flujo (Punto 9) y la expresión de diversos factores en dichas células por PCR Tiempo Real (Punto 10). Por otra parte se procedió al cultivo de las células de la FEV (Punto 11) y en distintos experimentos se determinó la capacidad de proliferación (Punto 12) y la capacidad de diferenciación *in vitro* (Punto 13). Para lo último se procesaron las células de acuerdo a los requerimientos de cada técnica, en los distintos días de cultivo, y se cuantificaron diversos parámetros detallados más adelante (Punto 14).



Esquema del Diseño Experimental General

### 3. Técnicas Quirúrgicas utilizadas en el Modelo MSG: Adrenalectomía

Las cirugías se realizaron en el cuarto de cirugía del bioterio del IMBICE en condiciones de asepsia. Se utilizó como anestesia una mezcla de Ketamina (50 mg/mL, 250 µL/100 grs. de peso, i.p.) y Xilacina (20 mg/mL, 10 µL/150 grs. de peso, i.p.). Luego de la intervención los animales fueron alojados en jaulas individuales y se trataron con cicatrizante externo (Farm-X).

Para la ADX de los animales MSG se procedió a la realización de un corte de la piel en la zona dorsal del animal, a la altura de los riñones. Luego de ubicarlos manualmente se realizaron dos cortes en la pared abdominal posterior, por donde pudo ser extraído cada uno de ellos y en el polo superior de los mismos se localizaron las glándulas adrenales, rodeadas de tejido adiposo perirrenal. Estas fueron extirpadas totalmente. Finalmente se introdujeron los riñones y se suturó la pared abdominal y la piel. Los animales MSG-ADX fueron implantados con pastillas de CORT durante la misma operación que otorgó a los animales una concentración plasmática constante de CORT de aproximadamente 5 µg/dl durante 21 días (MSG-ADX+CORT). Esta sustitución se realizó con pastillas comerciales (75 mg/pellet, Innovative Research of América) de liberación lenta que se ubicaron subcutáneamente a la altura de las extremidades traseras. De manera similar se trataron los animales CTR y MSG con los cuales se simulaban las cirugías y se implantaron pastillas placebo (CTR-SHAM+P y MSG-SHAM+P, respectivamente).

#### **4. Obtención de las muestras de Plasma.**

A partir de los animales sacrificados se recolectó la sangre del tronco corporal en tubos plásticos cónicos de centrifuga conteniendo 0,5 mL de EDTA 10% (p/v). El plasma se obtuvo por centrifugación durante 15 min a 3.000 rpm, a 4°C. Posterior e inmediatamente a la centrifugación, los plasmas se alicuotaron y se almacenaron a -20°C hasta las determinaciones posteriores de los distintos metabolitos.

#### **5. Medida de diferentes metabolitos en circulación.**

##### **5.1. Determinación de Glu.**

Se utilizó un reactivo comercial del laboratorio Wiener Argentina. Este es un ensayo enzimático para la determinación de glucosa que utiliza dos reacciones acopladas, dando lugar a la formación final de un cromógeno con absorbancia máxima a 505 nm. Esta absorbancia resulta directamente proporcional a la concentración de glucosa en la muestra.

##### **5.2. Determinación de TG.**

Se utilizó también un reactivo del Laboratorio Wiener. En forma similar a la determinación de glucosa, se trata de un ensayo enzimático, que utiliza cuatro reacciones acopladas, dando lugar a la formación de un cromógeno con absorbancia máxima a 505 nm. Esta absorbancia es directamente proporcional a la concentración de TG en la muestra.

##### **5.3. Determinación de LEP.**

La medida de LEP en las muestras se realizó por un Radioinmunoanálisis (RIA) específico desarrollado en el I.M.B.I.C.E. El buffer utilizado consiste en EDTA 0,025 M, NaCl 0,9 % (p/v), Tritón (100x) 0,05 % (v/v) y Albúmina Sérica Bovina (BSA) 0,5 % (p/v), disuelto en buffer fosfato (PBS) 0,05 M, pH = 7,4. El anticuerpo utilizado en este ensayo fue desarrollado en el I.M.B.I.C.E. y consiste en un antisuero anti-leptina de ratón obtenido en conejo. La reacción cruzada del mismo es de 100% con LEP de rata y ratón y menos de 1% con LEP humana <sup>111</sup>.

La hormona con marca radiactiva, utilizada como trazador, se generó en el laboratorio. Para ello se utilizó el método de Cloramina T que permite la iodinación de residuos tirosina de la hormona peptídica. Esta reacción implica un primer paso de activación del <sup>125</sup>INa (1 mCi, Amersham Biosciences) con 10 µg/10 µL de cloramina T durante 15 segundos, luego se contacta con 5 µg/5 µL de LEP (Pre Pro Tech, Inc.) por 30 segundos. La reacción se detiene con el agregado de 80 µg/10 µL de Metabisulfito de Sodio. La separación de la hormona iodinada

del yoduro radiactivo no incorporado se realiza en una columna de 75 cm de Sephacryl S-300, utilizando un buffer: 0,5% BSA; 0,025 M EDTA; 0,1% Azida sódica; 0,05 M PBS; 0,9 % NaCl.

Para el protocolo específico del RIA se realiza una primera mezcla de reacción con muestras o estándares (200 µL) y 50 µL de anti-suero anti-leptina de ratón, que se incuba a temperatura ambiente durante toda la noche. Posteriormente se agrega 50 µL del trazador (aproximadamente 30.000 cpm) y se deja otras 24 hs de incubación a temperatura ambiente. La separación de la fracción de hormona libre, de la unida al anticuerpo se realiza por precipitación de los complejos hormona-anticuerpo con una solución de anticuerpo secundario (antisuero antiY-globulina de conejo obtenido en oveja) 1/50, Suero Normal de Caballo 1/10 en PBS y de PEG 6000 (10% en PBS). Se incuba 30 min. a temperatura ambiente, se centrifuga 30 min a 3.500 rpm a 4°C y se aspiran los sobrenadantes.

La radiactividad y emitida por los precipitados se registra en un contador adecuado. Las cpm de las muestras fueron convertidas en concentración utilizando una curva estándar y un programa adecuado. La curva estándar posee un rango de detección entre 0,2 y 25 ng/mL.

#### 5.4. Determinación de CORT.

La medida de CORT total se realizó por un RIA específico desarrollado en este laboratorio <sup>112</sup>. En este caso se requiere una extracción previa del analito de la muestra, que se realiza a partir de 10 µL de plasma al que se le agrega 1 mL de diclorometano, y se agita en vortex durante 1 min. Luego la fase orgánica se trasvasa a un tubo limpio donde se la evapora a 40°C. El extracto seco se resuspende en un volumen apropiado de buffer de trabajo (gelatina 0,1 % (p/v), en PBS 0,05 M, pH= 7,4).

El anticuerpo utilizado en este ensayo fue desarrollado en el I.M.B.I.C.E. y consiste en un anti-suero anti-corticosterona obtenido en conejo. La hormona utilizada como trazador es de origen comercial y está marcada con tritio (3H-Corticosterone, Perkin Elmer, LifeSciences, Inc). La curva estándar posee un límite de detección de 0,975 µg/dL. La mezcla de reacción se incuba a 4°C toda la noche y la separación de la fracción libre de la unida se realiza por agregado de una mezcla de 1% carbón – 0,1% sulfato de dextrán en buffer de trabajo. Se incuba en baño de hielo 10 min., se centrifuga a 4.000 rpm (a 4°C). Los sobrenadantes se recuperaron en tubos conteniendo líquido de centelleo (EcoLite™, ICN). Las cpm de las muestras fueron convertidas en concentración utilizando una curva estándar adecuada y un programa de computación para tal fin.

### 5.5. Determinación de INS.

Para esta determinación se utilizó un RIA específico <sup>113</sup>. El buffer utilizado está compuesto por PBS 0,05 M, pH=7,4, conteniendo 0,5% BSA. El anticuerpo utilizado en este ensayo fue de origen comercial (Sigma Chemical Co.), que consiste en un anti-suero anti-insulina obtenido en cobayo.

La hormona radiactiva utilizada como trazador se generó en este laboratorio, para ello se utilizó el método de Cloramina T, ya descripto anteriormente; utilizando como sustrato de iodinación, INS comercial obtenida de páncreas porcino (Sigma Chemical, Co.). La separación de la hormona marcada y el <sup>125</sup>Iodo no incorporado se realizó en una columna de 50 mL conteniendo un empaquetado de Sephadex G-50, utilizando un buffer de corrida adecuado: Acetato de sodio 50 mM; BSA 0,01% (p/v); Azida sódica 0,1%; pH=6,5. La mezcla de reacción del RIA se incubó a 4°C 16-24 hs, y la separación de la fracción libre de la unida se realizó por el agregado de una mezcla de carbón 2,5% y sulfato de dextrán al 0,25% disueltos en buffer RIA para INS. Se incubó 10 min. en baño de hielo, se centrifugó 10 min. a 4.000 rpm y se aspiran los sobrenadantes. La radiactividad  $\gamma$  emitida por los precipitados se mide en un contador adecuado. Las cpm de las muestras fueron convertidas en concentración utilizando una curva estándar que se realiza junto a ellas y un programa de computación para tal fin. La curva estándar posee un límite de detección de 0,18 ng/mL.

### 5.6. Determinación de Adipoq y TNF $\alpha$ .

Estas determinaciones se realizaron con kits de ELISA comerciales (kit Rat Adiponectin EIA, ALPCO Diagnostics <sup>TM</sup> y kit rat TNF $\alpha$  BD, Biosciences Pharmingen).

## 6. Obtención del TARP.

Inmediatamente después del sacrificio de los animales se disecó el TARP, ubicado en la cavidad abdominal, por detrás y debajo de los riñones. Se recogió en condiciones de asepsia en tubos estériles conteniendo medio de cultivo Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) estéril y por diferencia de peso con el tubo conteniendo el medio se calculó la masa de TARP obtenido. El tejido se mantuvo en dichas condiciones de esterilidad hasta el momento del aislamiento de la FEV.

## 7. Aislamiento de adipocitos y de las células de la FEV del TARP.

Todos los pasos de aislamiento y cultivo celular detallados de aquí en adelante fueron realizados en condiciones de esterilidad en cabinas de flujo laminar de bioseguridad II en el

Servicio de Cultivos Celulares del IMBICE. Luego de la disección del TARP, como se detallara anteriormente, se realizaron dos lavados centrifugando a 1000 rpm durante 10 minutos, descartando y reemplazando el medio que contenía el tejido en cada lavado. Luego se colocó el TARP en placas de Petri estériles, y se cortó el tejido en pequeños trozos. En tubos cónicos estériles de 50 mL se resuspendió la colagenasa tipo I (SIGMA) en medio estéril DMEM a una concentración de 1 mg/mL donde se recibió el TARP cortado. La digestión enzimática se llevó a cabo incubando los frascos a 37°C en baño termostático durante 40-50 minutos, con agitación suave y permanente. Luego de la digestión se centrifugó a 1000 rpm durante 15 minutos. De esta manera se obtuvo un pellet conteniendo la FEV, el sobrenadante y un infranadante conteniendo los adipocitos maduros (se utilizó la capacidad de flotación de los adipocitos maduros para su separación), que se reservó para su posterior utilización. El pellet obtenido se aspiró con pipeta Pasteur y se filtró a través de una malla de nylon, recibiendo el filtrado en tubos cónicos de 15 mL estériles que se centrifugaron a 1000 rpm durante 10 minutos. Se descartó el sobrenadante y el pellet obtenido, conteniendo las células de la FEV, se lavó tres veces por resuspensión en el mismo medio y centrifugación a 1.000 rpm durante 10 minutos cada vez. El pellet celular se resuspendió en medio DMEM-Hepes suplementado con 10% de SFB y los antibióticos penicilina (100 UI/mL) y estreptomycin (100 UI/mL) y se determinó el número de células viables totales por recuento en cámara de Neubauer (con tinción de azul Tripán). Las células fueron luego procesadas según los requerimientos de los distintos experimentos y determinaciones a realizar.

## 8. Cuantificación del tamaño celular adipocitario.

Los adipocitos reservados en el paso de aislamiento celular fueron utilizados para determinar el tamaño celular en suspensión, según el protocolo desarrollado por Tchoukalova y col.<sup>114</sup> con algunas modificaciones. Para ello se tomó una alícuota de 50 µL de la capa del infranadante conteniendo los adipocitos en suspensión y se adicionó 450 µL de medio DMEM-Hepes. Luego de resuspender, se tomó una alícuota de 10 µL y se colocó en cámara de Neubauer cubriendo la misma con un cubreobjetos. Se tomaron cinco fotos representativas de cada muestra de células (magnificación 10X), utilizando un microscopio Nikon Eclipse 50i, equipado con una cámara Nikon Digital Sight D5-U3. Los radios de los adipocitos fueron medidos con un programa de análisis de imágenes (Image Pro Plus 6.0), cuantificando un promedio de 500 células por muestra proveniente de cada animal. Se excluyeron del análisis aquellos valores por debajo de 12,5 µm y por encima de 125 µm, que se consideraron gotas lipídicas y agregados lipídicos provenientes de la lisis celular, respectivamente. Los valores obtenidos fueron utilizados para calcular el radio medio, el volumen celular medio aproximado al de una esfera ( $Volumen = \frac{3}{4} \pi \text{radio}^3$ ) y la desviación estándar. Adicionalmente, los valores de los volúmenes fueron

dispuestos en grupos que diferían entre sí en  $5 \times 10^3 \mu\text{M}^3$  para las células de los animales de 30 días de vida y en  $2 \times 10^4 \mu\text{M}^3$  para las células de los animales adultos. Con estos datos se graficó un histograma, el cual fue utilizado para calcular si la distribución de los valores de los volúmenes adipocitarios era normal o binomial, así como también para determinar las distintas poblaciones de adipocitos presentes en las muestras de tejido.

## **9. Análisis de la composición de la FEV por Citometría de Flujo (FACS).**

Luego del aislamiento, las células de la FEV de los distintos grupos fueron resuspendidas en buffer FACS (aproximadamente  $2 \times 10^5$  células en 500  $\mu\text{L}$  de PBS conteniendo 0.5% p/v de BSA). Inmediatamente se llevó a cabo la incubación con los anticuerpos específicos fluorescentes o con sus respectivos isotipos, en una dilución 1/50 en buffer FACS, durante 1 hora a 4°C. Posteriormente se realizó el lavado, que consistió en una centrifugación suave (500 g durante 5 minutos, 4 °C) donde se obtuvo el pellet celular que se resuspendió en 500  $\mu\text{L}$  de buffer FACS para su análisis en el citómetro de flujo FACS Calibur (Becton Dickinson Biosciences). Inicialmente, el total de las células adquiridas de la FEV fueron identificadas según el tamaño y la complejidad de las distintas poblaciones que la componen, en base a los patrones de dispersión de luz, forward scatter (FSC) y side scatter (SSC), respectivamente. Luego se analizaron los siguientes marcadores: CD34 (expresado en células madres hematopoyéticas y en las células progenitoras), CD31 (expresado en leucocitos y células endoteliales) y CD45 (expresado en células hematopoyéticas maduras) para realizar la identificación de las CPAs, según la siguiente estrategia de inmuno-marcación: CD34+/CD31-/CD45-. Los anticuerpos conjugados monoclonales utilizados fueron: anti-CD34 de rata conjugado a PE (fluoróforo conjugado Ficoeritrina (PE), longitud de onda de emisión 578 nm, Santa Cruz Biotechnology Inc.), anti-CD45 de rata conjugado a FITC (fluoróforo conjugado Isotiocianato de Fluoresceína 1 (FITC), longitud de onda de emisión 514 nm, Santa Cruz Biotechnology Inc) y anti-CD31 de rata conjugado a FITC (Santa Cruz Biotechnology Inc). Para cada muestra fueron adquiridos 50.000 eventos en la región de interés. El análisis de datos se realizó con los programas Cell Quest Pro y FlowJo. Los experimentos se realizaron en el Laboratorio de Investigaciones de Sistema Inmune de la Facultad de Ciencias Exactas, UNLP.

## **10. Análisis de marcadores específicos de las células de la FEV**

Las células de la FEV aisladas fueron procesadas para la extracción de ARNm total y se cuantificaron por PCR Tiempo Real, tal como se detallará más adelante (Punto 14.1), diversos marcadores de competencia (Zfp423, PPAR $\gamma$ 2), receptores hormonales (MR, GR, ObRb) y factores anti-adipogénicos (Pref-1, Wnt10b).

## 11. Cultivo de las células de la FEV.

Luego del aislamiento detallado en el punto 4, se procedió a la siembra de las células de la FEV. Para ello se distribuyeron en un volumen adecuado de medio DMEM-Hepes suplementado con 10% de SFB y antibióticos, según la dilución correspondiente a la placa de cultivo a utilizar ( $1,5 \times 10^5$  células/0,5 mL para placas de 24 pozos;  $3 \times 10^5$  células/1 mL para placas de 12 pozos;  $7 \times 10^5$  células/2 mL para placas de 6 pozos). El cultivo se realizó en estufa a 37°C, bajo atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> y las células se mantuvieron en el mismo medio hasta confluencia (aproximadamente 5 días) o el tiempo requerido dependiendo de las determinaciones realizadas.

## 12. Estudio de la capacidad proliferativa de las células de la FEV.

Las células de FEV aisladas de los respectivos grupos experimentales se sembraron como se detalló anteriormente en placas de 24 pozos. Luego de transcurridas las primeras 24 horas, se retiró el medio de cultivo (4 pozos por grupo), se realizaron dos lavados con buffer PBS y se adicionó a cada pozo 200 µL de una solución de Tripsina 0,25% (p/v) (Microvet). Se incubó durante 5-10 minutos en estufa a 37°C, bajo atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> y luego de observarse al microscopio para confirmar la acción de la enzima, se recolectó la suspensión celular de cada pozo individualmente. Se tomó una alícuota de 10 µL de cada suspensión y se realizaron los recuentos en cámara de Neubauer. Se repitió el mismo procedimiento cada 24 hs durante 9 días desde el día del aislamiento. (Ver esquema).

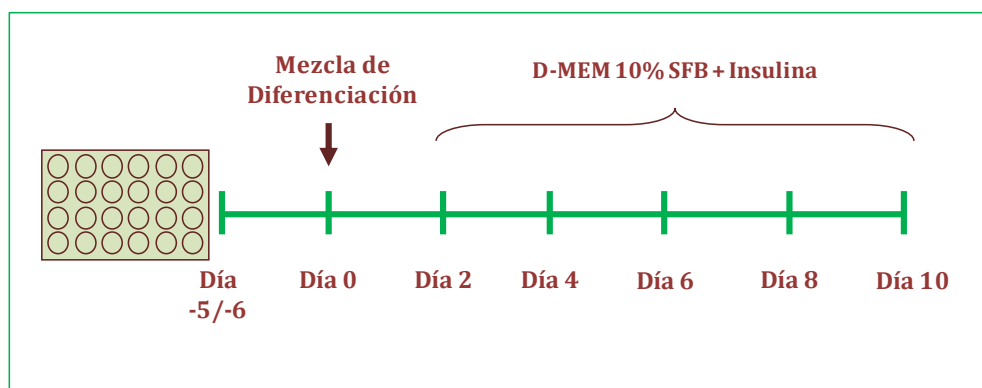


Esquema utilizado para el recuento de las células de la FEV en cultivo.



### 13. Diferenciación adipocitaria *in vitro*.

Luego de que las células de la FEV en cultivo alcanzaran confluencia (5-6 días de cultivo posterior al aislamiento) se adicionó la mezcla de diferenciación que consistió en medio conteniendo 0,5 mM de 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX), un inhibidor de la enzima fosfodiesterasa que genera el aumento de la concentración intracelular de AMP cíclico; 0,25 uM de DEXA un glucocorticoide sintético, 5 µg/mL de INS y 10 % de SFB (día 0 de cultivo). Luego de 48 hs, se reemplazó el medio por DMEM con 5 µg/mL de INS y 10 % de SFB, el cual fue reemplazado cada 48 horas por medio fresco hasta el día 10 de cultivo. Los sobrenadantes de cada día de cultivo se separaron y congelaron (-20° C) para la posterior determinación de LEP. Al finalizar los cultivos en los distintos días las células remanentes fueron procesadas de acuerdo a las determinaciones a realizar, según se detalla más adelante. A continuación se muestra un esquema general de la diferenciación.



Esquema utilizado para la diferenciación de las células de la FEV en cultivo.

### 14. Determinaciones *in vitro*

#### 14.1. Extracción de ARN total y cuantificación por PCR Tiempo Real (qPCR).

Las células aisladas de la FEV o las células en cultivo removidas a los distintos días de cultivo, se lisaron con reactivo Trizol y se mantuvieron a -80° C hasta la extracción posterior de su ARN total. Se cuantificó el ARN total por absorbancia a 260 nm. Una vez obtenido el ARN, se utilizó 1 µg de ARN total para realizar la transcripción reversa usando random primers (250 ng) y la enzima Superscript™ III Reverse Transcriptase (200 U/µL, Invitrogen, Lifetech). Una vez obtenido el producto, se utilizó 1 µL para ser amplificado con 0,5 µM de los primers específicos (**Tabla 1**) utilizando el kit para PCR tiempo real Quanti Tect Syber Green PCR kit (Quiagen); en un cicladador MJ Mini Opticon (Bio Rad), teniendo en cuenta el siguiente esquema de ciclado: un ciclo de 15 min. a 95°C, seguido por 40 ciclos de 15 seg. a 94°C, 30 seg. a 50-60°C (dependiente

del par de primers utilizado), y 30 seg. a 72°C. Todos los primers utilizados fueron diseñados con el software primer 3.

|                | <b>Primers (5'-3')</b>      | <b>GBAN</b>    | <b>pb</b> |
|----------------|-----------------------------|----------------|-----------|
| <b>ACTβ</b>    | se, AGCCATGTACGTAGCCATCC    | NM_031144      | 115       |
|                | as, ACCCTCATAGATGGGCACAG    |                |           |
| <b>ADIPOQ</b>  | se, AATCCTGCCCAGTCATGAAG    | NM_144744      | 159       |
|                | as, TCTCCAGGAGTGCCATCTCT    |                |           |
| <b>C/EBPa</b>  | se, CTGCGAGCACGAGACGTCTATAG | NM_012524      | 159       |
|                | as, TCCCGGGTAGTCAAAGTCACC   |                |           |
| <b>GR</b>      | se, TGCCCAGCATGCCGCTATCG    | NW_047512      | 170       |
|                | as, GGGGTGAGCTGTGGTAATGCTGC |                |           |
| <b>IRS-1</b>   | se, TGTGCCAAGCAACAAGAAAG    | NM_012969.1    | 176       |
|                | as, ACGGTTTCAGAGCAGAGGAA    |                |           |
| <b>IRS-2</b>   | se, CTACCCACTGAGCCCAAGAG    | NM_001168633.1 | 151       |
|                | as, CCAGGGATGAAGCAGGACTA    |                |           |
| <b>LEP</b>     | se, GAGACCTCCTCCATCTGCTG    | NM_013076      | 192       |
|                | as, CTCAGCATTCAGGGCTAAGG    |                |           |
| <b>MR</b>      | se, TCGCTCCGACCAAGGAGCCA    | NM_013131      | 193       |
|                | as, TTCGCTGCCAGGCGTTGAG     |                |           |
| <b>ob-Rb</b>   | se, TGTGGAATCTGGAGTGGTCA    | AF287268       | 115       |
|                | as, TCTGGAGCCTGAACCAGTTT    |                |           |
| <b>PPAR-γ2</b> | se, AGGGGCCTGGACCTCTGCTG    | NW_047696      | 185       |
|                | as, TCCGAAGTTGGTGGGCCAGA    |                |           |
| <b>Pref-1</b>  | se, TGCTCCTGCTGGCTTTCGGC    | NM_053744      | 113       |
|                | as, CCAGCCAGGCTCACACCTGC    |                |           |
| <b>Wnt-10b</b> | se, AGGGGCTGCACATCGCCGTTC   | NW_047784      | 175       |
|                | as, ACTGCGTGATGACACCAGCAG   |                |           |
| <b>Zfp423</b>  | se, CCGCGATCGGTGAAAGTTG     | NM_053583.2    | 121       |
|                | as, CACGGCTGGATTTCCGATCA    |                |           |

**Tabla 1.** Primers utilizados en las reacciones de PCR tiempo Real. se, sentido; as, antisentido; GBAN, Número de acceso a GenBank; pb, longitud del amplificado en pb.

La eficiencia de la PCR fue cercana a 1. Las muestras se ensayaron por duplicado, en tubos separados. La identidad y pureza del producto amplificado se chequearon por el análisis de la curva de melting realizada al final de la amplificación. Para determinar las expresiones relativas en cada grupo experimental se utilizó el método de cálculo de los delta Ct, de la siguiente manera: Ct del gen de interés – Ct del gen de referencia. En nuestro caso, el gen de referencia utilizado fue  $\beta$ -actina, dado que sus niveles de ARNm no difieren entre el grupo control y el experimental. Los cambios relativos en el nivel de expresión de un gen específico ( $\Delta\Delta Ct$ ) fueron calculados como el  $\Delta Ct$  del grupo experimental menos el  $\Delta Ct$  del grupo control, y luego presentado como  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ .

#### **14.2. Ensayo de Inmunofluorescencia (IF).**

Las células de la FEV fueron cultivadas en cubreobjetos estériles (24 mm x 24 mm) en placas de cultivo de 6 pozos, siguiendo el protocolo anteriormente mencionado. Al día 4 de cultivo se retiró el medio, se realizaron dos lavados con PBS y se realizó la fijación con una solución de formaldehído al 10% v/v durante 10-15 minutos. Una vez transcurrido ese tiempo, se procedió a dos lavados con PBS y se incubó con una solución de Tritón 0,2% v/v durante 15 minutos para lograr la permeabilización de la membrana. Luego se realizó la incubación overnight, en cámara húmeda a 4 °C, con una dilución 1:500 en PBS del anticuerpo primario para PPAR $\gamma$ 2 (2  $\mu$ g/0,1 mL, Santa Cruz). Al día siguiente se retiró el anticuerpo primario, se realizaron dos lavados con PBS y se continuó con la incubación, durante una hora a temperatura ambiente, con una dilución 1:1000 en PBS del anticuerpo secundario conjugado (Alexa-Fluor R 488 cabra/anti-rata, Invitrogen). Finalmente se realizó la tinción nuclear y el montaje del preparado (DAPI-Vectashield, BioArs). La inmuno-reactividad se visualizó en un Microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse 50i con cámara Nikon Digital Sight D5-U3 y software NIS-Elements, utilizando un aumento de 40X. Se tomaron 5 imágenes representativas al azar por muestra y el análisis de las imágenes se realizó con el programa Image Pro Plus software 6.0, contabilizando un promedio de 100 células por imagen.

#### **14.3. Contenido intracelular de lípidos.**

Como parámetro de diferenciación adipocitaria se evaluó el contenido lipídico celular, mediante la Tinción con Oil-Red O con normalización por contenido de ADN<sup>115</sup>. Para ello las células en los distintos días de cultivo (0, 2, 4, 6, 8, 10) crecidas en placas de 24 pozos, fueron fijadas con una solución de formaldehído 10 % v/v, durante 10 min. y luego se lavaron con una solución de alcohol isopropílico al 60% v/v. Inmediatamente se incubaron con solución de Oil-Red O en

isopropílico 0,3 % (p/v) durante 1 hora. La solución de colorante utilizada fue preparada, a partir de una solución madre de Oil Red O 0,5% (p/v) en alcohol isopropílico puro, en una proporción 3:2 de solución madre: agua destilada, y filtrada inmediatamente antes de ser usada, para evitar la presencia de cristales de colorante. Transcurrido el período de incubación se retiró el colorante, se realizaron dos lavados con PBS y se evaluó la tinción específica de las vacuolas lipídicas por microscopía con contraste de fase. Luego se extrajo el colorante incorporado por las células con alcohol isopropílico y se registró la absorbancia a 510 nm. Finalmente se incubaron las células por 24 hs con 200 µL de una solución de tripsina 0,25% v/v en PBS-EDTA, se recolectó el contenido de cada pozo, se centrifugó a 8000g por 1 minuto y se determinó el contenido de ADN por la medida de absorbancia a 260 nm. Este dato se utilizó para normalizar los resultados de la absorbancia del colorante previamente cuantificada.

#### 14.4. Determinación de la liberación de LEP.

Otro parámetro de diferenciación cuantificado fue la liberación de LEP al medio de cultivo por parte de los adipocitos diferenciados *in vitro*. Para ello se recolectó el medio de cultivo de las células en los días 0, 2, 4, 6, 8 y 10, el cual se almacenó a -20°C hasta el momento de la cuantificación de la secreción de LEP por RIA. El mismo se realizó siguiendo el protocolo anteriormente detallado para las muestras de plasma, con leves modificaciones.

#### 14.5. Tinción de Papanicolaou.

Las células de la FEV fueron cultivadas en cubreobjetos en placas de 6 pozos, siguiendo el protocolo de cultivo y diferenciación ya detallados. En el día 10 de diferenciación se retiró el medio de cultivo, se realizó un lavado con PBS (pH=7,4) y la fijación con formaldehído 10% (v/v) durante una hora. Luego de realizar 3 lavados con PBS, se procedió a la tinción de Papanicolaou (hematoxilina/orange G/eosina) como se detalla en la **Tabla 2**.

| Paso | Reactivo       | Tiempo   |
|------|----------------|----------|
| 1    | Alcohol 96°    | 2.30 min |
| 2    | Alcohol 70°    | 2.30 min |
| 3    | Agua destilada | 30 seg   |
| 4    | Hematoxilina   | 5 min    |
| 5    | Agua corriente | 1.15 min |
| 6    | Alcohol 70°    | 30 seg   |
| 7    | Orange G       | 2.30 min |
| 8    | Alcohol 96°    | 15 seg   |
| 9    | Alcohol 96°    | 15 seg   |
| 10   | EA 36          | 5 min    |
| 11   | Alcohol 96°    | 2 min    |
| 12   | Alcohol 96°    | 2 min    |
| 13   | Alcohol 100°   | 30 seg   |
| 14   | Alcohol 100°   | 30 seg   |

|    |         |        |
|----|---------|--------|
| 15 | Xilol   | 15 seg |
| 16 | Xilol   | 15 seg |
| 17 | Montaje |        |

**Tabla 2:** Protocolo de tinción de Papanicolaou.

El montaje se llevó a cabo con Bálsamo de Canadá y secado en estufa a 60-70°C durante toda la noche.

#### **14.6. Determinación de porcentaje de diferenciación y grados de maduración.**

Luego de la tinción de Papanicolaou, los preparados fueron analizados con un Microscopio Nikon Eclipse 50i con cámara Nikon Digital Sight D5-U3 y programa NIS-Elements, tomando al azar 5 imágenes por muestra con un aumento de 40X. Luego, con el programa de análisis de imágenes Image Pro Plus 6.0, se determinó en cada imagen el número total de células (por recuento de los núcleos celulares) y el número de células diferenciadas, usando como criterio de diferenciación la presencia de vacuolas lipídicas. Con ambos resultados se calculó el porcentaje de diferenciación. Luego, en estas células con presencia de vacuolas lipídicas se evaluó el estadio de maduración adipocitario, utilizando como parámetro la ubicación celular del núcleo y determinando así 3 grados de maduración: Grado I donde la posición del núcleo fue central; Grado II en el cual el núcleo fue desplazado de la posición central, por la presencia de vacuolas de mayor tamaño, hacia la periferia de la célula; y Grado III donde el núcleo se presentó completamente adyacente a la membrana plasmática <sup>116</sup>. Con estos resultados se calculó el porcentaje de células diferenciadas en cada estadio de maduración.

### **15. Análisis estadístico.**

En los protocolos *in vitro* se utilizaron, aproximadamente 6-12 réplicas por grupo experimental y se realizaron entre 3 y 5 experimentos diferentes para cada protocolo. Para los experimentos *in vivo*, cada grupo de estudio estuvo constituido por un n=15-25 animales. Los resultados obtenidos, se expresaron como la media  $\pm$  EEM y se analizaron estadísticamente mediante una prueba T de Student para determinar las diferencias significativas entre las medias obtenidas en cada grupo (controles vs. tratados). Para el análisis de datos provenientes de experimentos de cuantificación de expresión génica, se utilizó un test no paramétrico. Para el análisis de los datos provenientes de la cuantificación de diámetro adipocitario se utilizó el test no paramétrico de Mann-Whitney para la comparación entre grupos, y para la determinación de distribuciones se utilizó el Test de Kruskal-Wallis seguido del Test de Mann-Whitney, para determinar diferencias significativas en el caso en que se encontraron distribuciones binomiales en el mismo grupo. Para las comparaciones realizadas para el mismo tratamiento a dos edades distintas (teniendo en cuenta más de dos variables y su interacción) se realizó un ANOVA de dos vías con post-test de Bonferroni. Para el procesamiento estadístico de los datos se utilizó el

programa estadístico GraphPad Prism 5.0. En todos los casos se consideraron diferencias significativas aquellas que arrojaron un valor  $p < 0,05$  o menor.

## RESULTADOS

## Modelo de SM con aumento de GCs endógenos

### Modelo MSG en ratas macho de 30 días de edad.

#### Características generales

El modelo MSG fue previamente caracterizado en nuestro laboratorio, por lo tanto las determinaciones plasmáticas y las medidas antropométricas se realizaron para corroborar el fenotipo ya descrito. De esta manera, como puede observarse en la **Tabla 1** los animales MSG presentaron un menor peso corporal comparado con los animales CTR, diferencia que se debe a la menor talla y a la hipofagia que poseen los animales MSG. Al observar los valores hormonales obtenidos se confirmó la presencia de hiperleptinemia e hipercorticosteronemia en los animales tratados, sin encontrar diferencias en los niveles plasmáticos de INS, Glu y TG (**Tabla 1**). Estos resultados fueron coincidentes con los valores encontrados previamente en nuestro laboratorio.

|                           | CTR          | MSG            |
|---------------------------|--------------|----------------|
| <b>Peso corporal (gr)</b> | 78,84 ± 1,78 | 71,23 ± 1,56 * |
| <b>LEP (ng/mL)</b>        | 4,27 ± 0,35  | 6,07 ± 0,59*   |
| <b>CORT (µg/dL)</b>       | 1,98± 0,18   | 4,53 ± 0,94*   |
| <b>INS (ng/mL)</b>        | 0,25±0,02    | 0,31±0,04      |
| <b>Glu (g/L)</b>          | 1,26± 0,03   | 1,27± 0,03     |
| <b>TG (g/L)</b>           | 0,82± 0,06   | 1,19± 0,11     |

**Tabla 1:** Peso corporal y valores plasmáticos medidos en animales CTR y MSG de 30 días de vida. n=20 animales por grupo experimental. Valores ± EEM. \*p<0,05 vs CTR.

#### Características del TARP.

Dentro de los parámetros analizados se le prestó especial importancia al TARP, que representa uno de los depósitos de mayor contribución al TA de la cavidad abdominal en estos animales. De esta manera se encontró que los animales MSG presentaban una mayor masa de TARP que resultó significativa aun cuando se normalizó por el peso corporal de los animales (**Tabla 2**). También se determinó el número total de células de la FEV presentes en el TARP de ambos grupos de animales y se pudo observar un aumento en dicho valor para el TARP de los animales



MSG respecto al CTR. Sin embargo no se encontraron diferencias significativas cuando este valor fue corregido por la masa de TARP (**Tabla 2**).

|                                   | CTR            | MSG             |
|-----------------------------------|----------------|-----------------|
| <b>Masa de TARP (gr)</b>          | 0,16 ± 0,009   | 0,22 ± 0,016*   |
| <b>TARP/ gr de peso corporal</b>  | 0,20 ± 0,011   | 0,30 ± 0,019*   |
| <b>Recuento celular total FEV</b> | 93363 ± 6830   | 144194 ± 16247* |
| <b>Cel/ gr TARP</b>               | 655740 ± 64110 | 763100 ± 103335 |

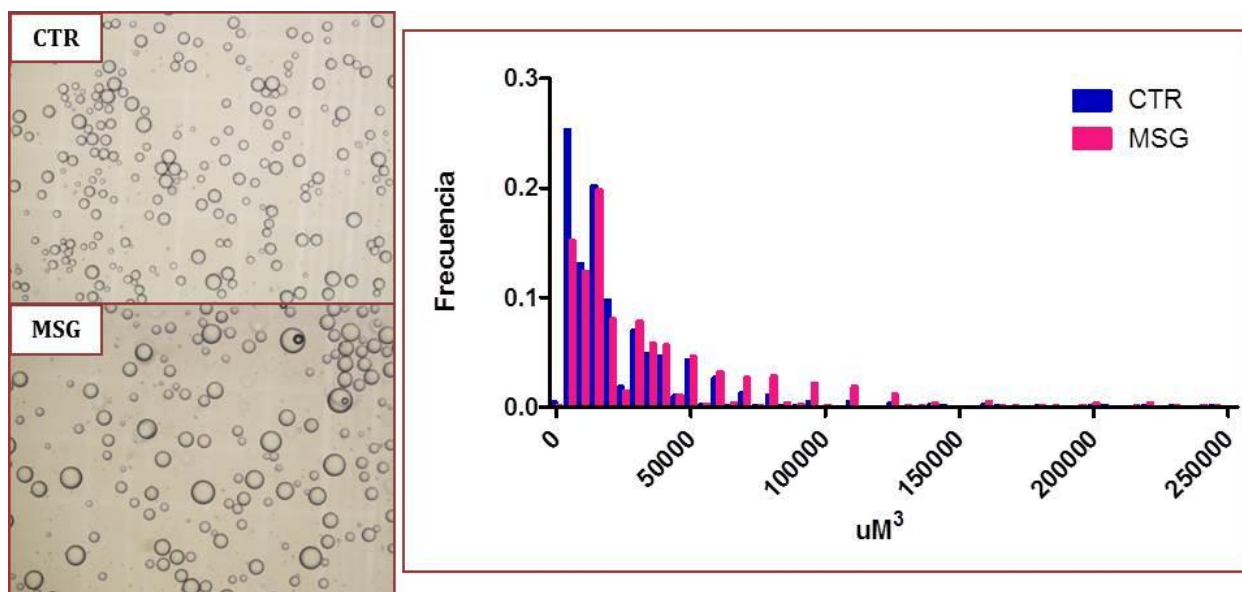
**Tabla 2:** Parámetros de caracterización del TARP de animales CTR y MSG de 30 días de vida. n=20 animales por grupo experimental. Valores ± EEM. \*p<0,05 vs CTR.

En experimentos adicionales se cuantificó el tamaño celular de los adipocitos maduros en suspensión aislados del TARP, determinándose el radio y el volumen de los mismos. Los resultados mostraron un aumento significativo en el tamaño de los adipocitos de los animales MSG (**Tabla 3**), indicando que la expansión del TARP encontrada en estos animales podría deberse principalmente a una contribución de naturaleza hipertrófica.

|   | CTR          | MSG             |
|---|--------------|-----------------|
| <b>Radio de adipocitos (µm)</b>               | 19,86 ± 0,12 | 22,28 ± 0,18**  |
| <b>Volumen de adipocitos (µm<sup>3</sup>)</b> | 24.198 ± 733 | 34.711 ± 1112** |

**Tabla 3:** Valores de radios y volúmenes de adipocitos en suspensión de animales CTR y MSG. n=3 experimentos por grupo. Valores ± EEM. \*\*p<0,01 vs CTR.

Al analizar la distribución de tamaños de los adipocitos se pudo observar una única población de mayor tamaño comparada con el CTR, indicando un patrón característico de hipertrofia celular (**Figura 1**).



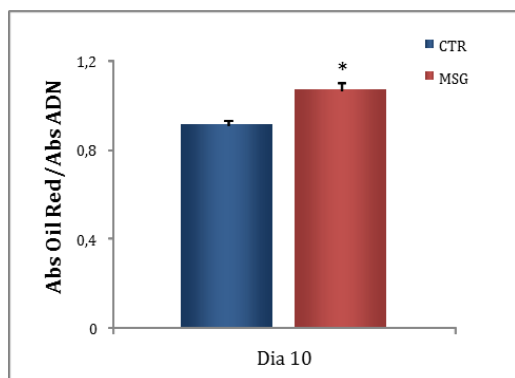
**Figura 1:** Imágenes representativas de adipocitos en suspensión de ratas macho CTR (arriba) y MSG (abajo) de 30 días vida. En el panel de la derecha se muestra la distribución de adipocitos según su volumen.

### Parámetros de diferenciación adipocitaria *in vitro*.

Luego de corroborar las alteraciones presentes en los animales *in vivo* a edad prepuberal, el siguiente paso fue estudiar el proceso adipogénico *in vitro* de las células de la FEV provenientes de ambos grupos de animales. En este punto cabe destacar que el proceso de diferenciación *in vitro* fue estudiado inicialmente en los animales MSG a edad adulta, y dados los resultados obtenidos se decidió posteriormente estudiar el mismo a edad prepuberal. Por este motivo, los datos obtenidos para las cinéticas de distintos marcadores en el primer modelo fueron utilizadas para seleccionar aquellos días más significativos en el análisis *in vitro* del resto de la tesis. De esta manera, y observando que la información aportada en algunos casos era redundante, se decidió enfocar el análisis al día final de los cultivos. En primer lugar se midió la acumulación intracelular de lípidos, característica fundamental de los adipocitos maduros. Se pudo observar que las células provenientes de los animales MSG acumulaban una mayor cantidad de lípidos en comparación con las células de los animales CTR (**Figura 2**).

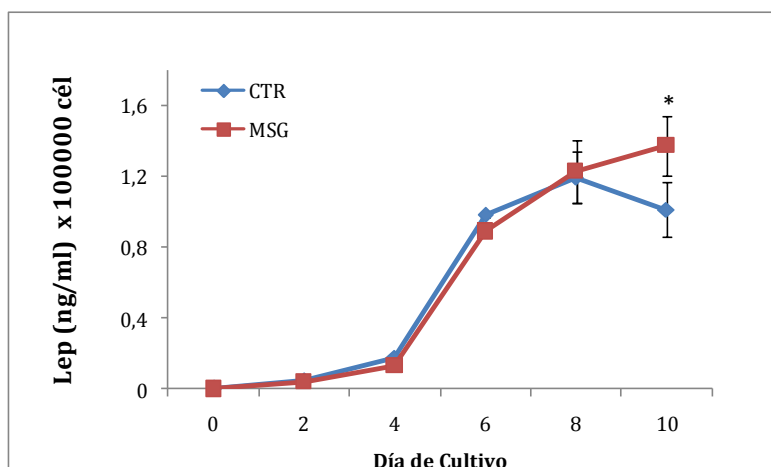
El siguiente parámetro determinado fue la liberación de LEP al medio de cultivo por parte de los adipocitos en diferenciación. La secreción de esta adipocina es otra característica fundamental

de los adipocitos maduros. Como puede apreciarse en la **Figura 3**, el monitoreo de este parámetro se realizó desde el momento del agregado de la mezcla de diferenciación (d0) y hasta la finalización del cultivo (d10).



**Figura 2:** Contenido intracelular de lípidos de adipocitos diferenciados *in vitro* de los animales CTR y MSG. n=4 experimentos por grupo. Valores  $\pm$  EEM. \* $p < 0,05$  vs CTR.

Los niveles comenzaron a ser detectables al día 4 de cultivo para ambos grupos de células y mostraron un patrón creciente hasta finalizar el cultivo. No se encontraron diferencias entre ambos grupos de células hasta el día 8 de cultivo, sin embargo en el día final de cultivo las células MSG presentaron una mayor liberación de LEP al medio comparadas con las células CTR.

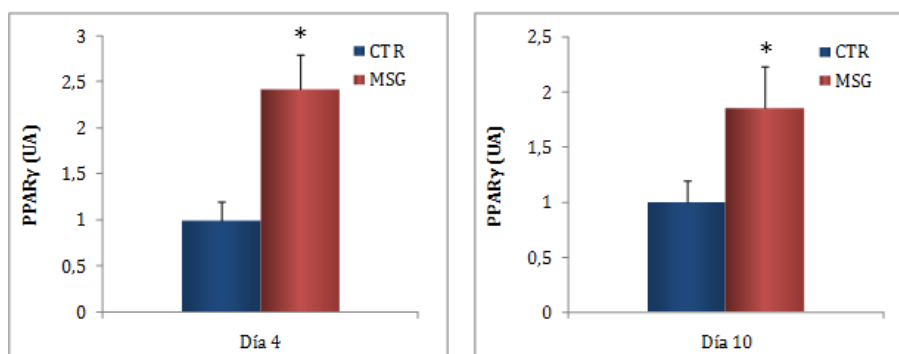


**Figura 3:** Liberación de LEP al medio de cultivo por parte de los adipocitos CTR y MSG. n=4 experimentos por grupo. Valores  $\pm$  EEM \* $p < 0,05$  vs CTR.

### Análisis de marcadores adipogénicos *in vitro*.

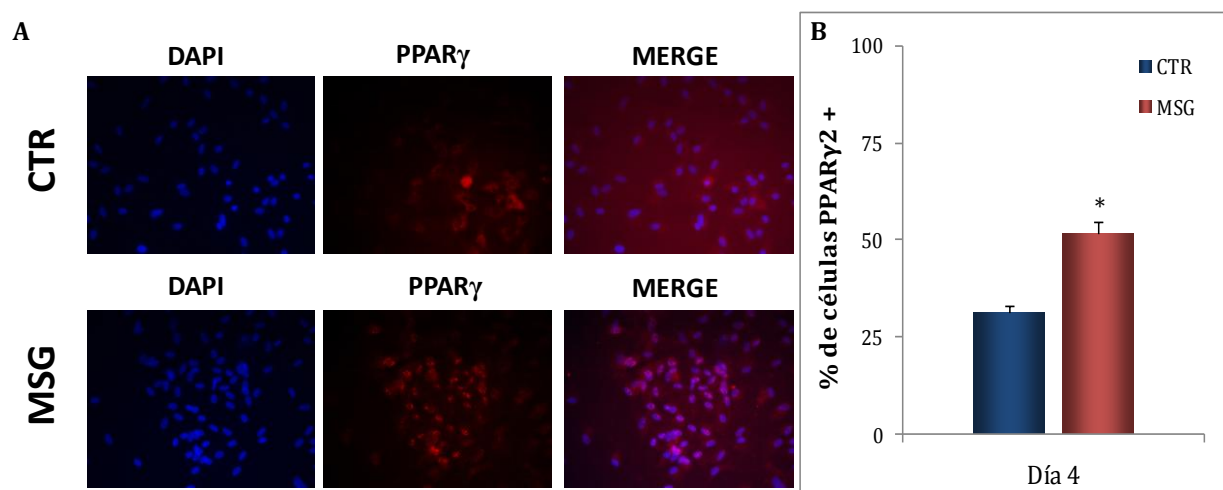
Dado que el proceso de diferenciación está regulado por diversos factores de transcripción que modulan la expresión de los genes del fenotipo maduro, se continuó analizando la expresión de algunos de estos factores, siendo PPAR $\gamma$ 2 uno de los que dirige la expresión de la batería de

genes adipocitarios. Por este motivo se analizó la expresión de PPAR $\gamma$ 2 al día 4 de cultivo, donde se encontró el pico de expresión máxima (ver resultados de animales adultos), y al día terminal. Como puede apreciarse en la **Figura 4**, las células del grupo MSG presentaron un mayor nivel de ARNm en ambos días estudiados en comparación con las células CTR.



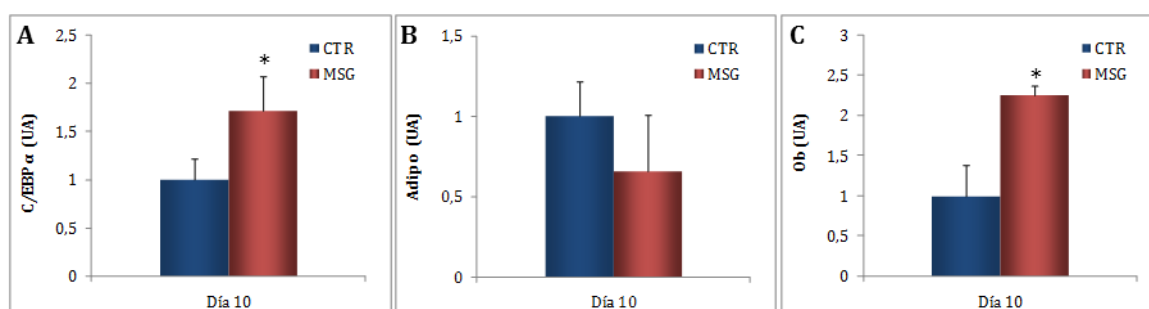
**Figura 4:** Niveles de ARN mensajero de PPAR  $\gamma$ 2 en células del grupo CTR y MSG al día 4 y al día 10 post-diferenciación. Valores expresados en Unidades Arbitrarias (UA). n=4 experimentos. Valores  $\pm$  EEM. \*p<0,05 vs CTR del mismo día.

Además, evaluamos por inmunomarcación el porcentaje de células PPAR $\gamma$ 2 positivas al día 4 de cultivo, momento en el cuál se había encontrado el pico de expresión máxima en las células en diferenciación *in vitro*. De esta manera pudo determinarse que dentro de las células de la FEV el porcentaje de células positivas para dicho marcador era mayor en el grupo MSG con respecto al grupo CTR (**Figura 5**).



**Figura 5: A)** Imágenes representativas de células CTR (superior) y MSG (inferior) con tinción nuclear (DAPI, paneles izquierdos), PPAR $\gamma$ 2+ (rojo, paneles centrales) y la superposición de ambas (paneles derecha). **B)** Porcentaje de células PPAR $\gamma$ 2+ al día 4 de cultivo. Los valores representan la media  $\pm$  EEM (n = 4 experimentos). \*,  $p < 0,05$  vs. valores CTR.

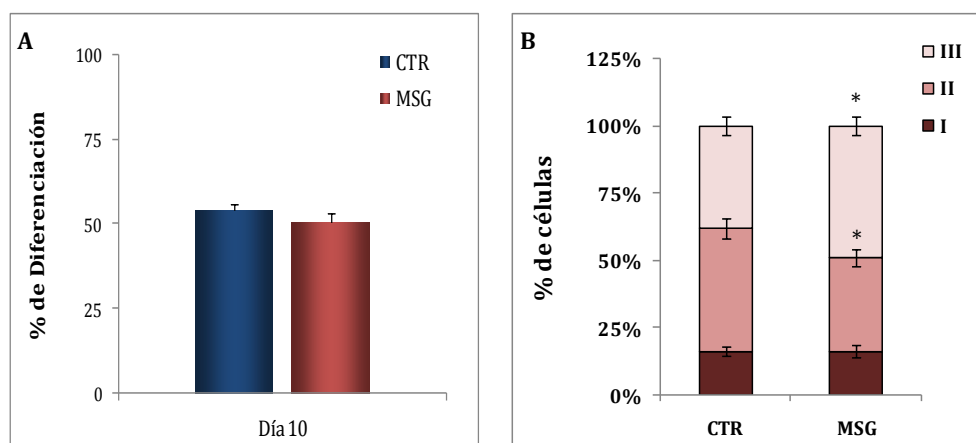
Continuando con el análisis de los factores de transcripción que intervienen en el proceso adipogénico, el siguiente factor analizado fue C/EBP $\alpha$ , quién actúa en conjunto con PPAR $\gamma$ 2. La expresión de este factor fue analizada únicamente en el día final de cultivo (día 10), al igual que el resto de los marcadores adipogénicos analizados de aquí en adelante. De esta manera las células del grupo MSG presentaron un mayor nivel de expresión al compararse con las células del grupo CTR (**Figura 6, Panel A**). De la misma manera se analizaron los niveles de ARNm de dos de las adipoquinas más representativas del fenotipo adipocitario maduro, como son Lep y Adipoq. Como puede observarse en las células del grupo MSG la expresión del gen Ob (LEP) fue mayor que en las células CTR, sin encontrarse diferencias al analizar los valores de expresión de Adipoq (**Figura 6, paneles B y C**).



**Figura 6:** Niveles de ARN mensajero de C/EBPα (Panel A), Adipoq (Panel B) y Ob (Panel C) en células CTR y MSG expresados en Unidades Arbitrarias (UA) al día 10 de cultivo. n=4 experimentos. Valores  $\pm$  EEM. \*p<0,05 vs CTR.

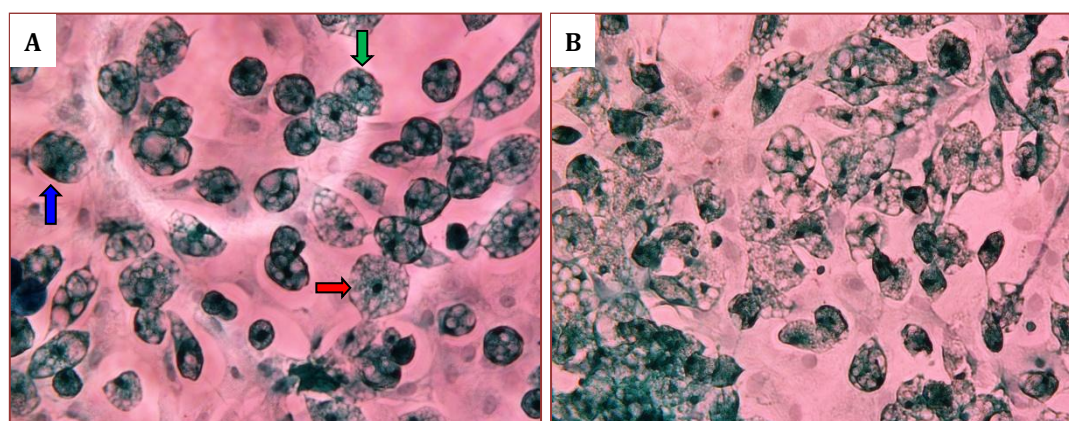
### **Análisis del grado de avance del proceso de diferenciación *in vitro***

Luego de evidenciar las alteraciones presentes en los parámetros de diferenciación estudiados, el próximo objetivo fue evaluar el porcentaje de diferenciación que presentaban las células de la FEV de ambos grupos en la etapa terminal del proceso (día 10 de cultivo). Al cuantificar este porcentaje no se observó una diferencia significativa entre ambos grupos (**Figura 7, Panel A**). Sin embargo cuando se determinó el porcentaje de células presentes en los distintos grados de maduración (determinado por la posición nuclear, como se detalló anteriormente), el resultado mostró un patrón diferencial entre las células MSG y las células CTR. Como se muestra en la **Figura 7 (Panel B)**, los adipocitos MSG diferenciados *in vitro* presentaron un mayor porcentaje de células en el estadio de maduración más avanzado (grado III) comparadas con los adipocitos CTR. De manera contraria la cantidad de células en el estadio intermedio (grado II) fue menor para las células MSG y no se encontraron diferencias en el estadio menos diferenciado (grado I). Se muestran imágenes representativas de los mismos en la **Figura 8**.



**Figura 7: A)** Porcentaje de diferenciación al día 10, en cultivos CTR y MSG. **B)** Grados de maduración de células diferenciadas CTR y MSG al día 10 de cultivo. I, II y III corresponden a los grados de maduración desde el de menor diferenciación al de mayor, respectivamente.  $n=4$  experimentos. Valores  $\pm$  EEM. \* $p<0,05$  vs CTR.

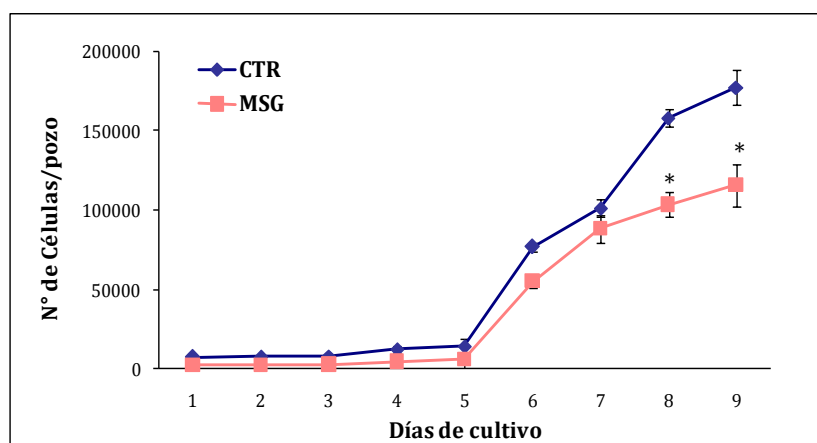
Tomando en conjunto estos resultados se podría suponer que si bien las células MSG no presentaron un mayor porcentaje de diferenciación en etapas terminales de la diferenciación, su capacidad adipogénica se vería alterada en la velocidad con que ésta ocurre, es decir que las células de los animales MSG poseen una mayor velocidad de maduración.



**Figura 8:** Fotos representativas de los distintos grados de maduración en células CTR (Panel A) y células MSG (Panel B). Las flechas indican células en los tres grados de maduración analizados según la posición del núcleo: Grado I: núcleo central (rojo); Grado II: núcleo parcialmente desplazado (verde); Grado III: núcleo completamente periférico, adyacente a la membrana (azul). Amplificación 40X.

### Caracterización de las células de la FEV.

Luego de comprobar que existía un aumento en la capacidad adipogénica, se decidió analizar diversas características de las células de la FEV que nos permitirían confirmar si el cambio encontrado respondería a posibles alteraciones en las mismas. Para ello se comenzó por evaluar la capacidad de proliferación en ambos grupos experimentales para construir la curva de proliferación (**Figura 9**). Como puede observarse, durante los primeros días de cultivo las células de ambos grupos mostraron un comportamiento similar, presentando un aumento paulatino en el número de células (día 1 a día 5). Luego, el incremento en el recuento celular fue más marcado (día 6 y día 7), notándose una diferencia en el patrón de proliferación hacia los últimos días del ensayo, donde las células MSG presentaron un aumento menor comparadas con las células CTR (día 8 y día 9).

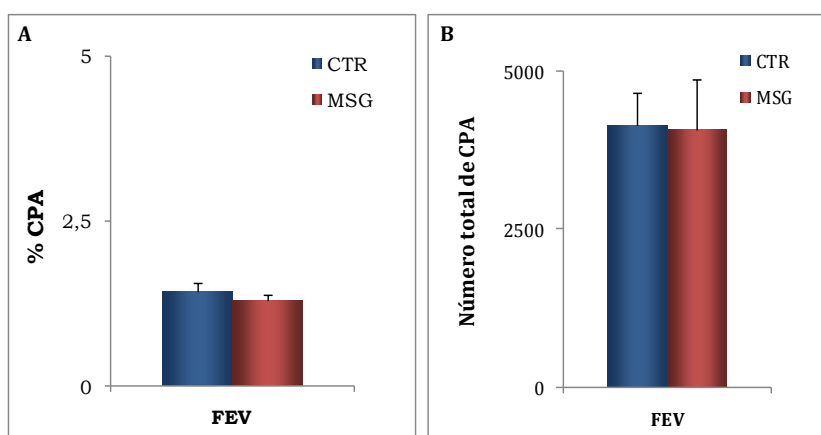


**Figura 9:** Curva de proliferación de las células de FEV de los grupos CTR y MSG. n=4 experimentos por grupo. Valores  $\pm$  EEM. \* $p < 0,05$  vs CTR.

Como se detalló anteriormente la FEV está formada por un conjunto de poblaciones celulares, entre las cuales se encuentran las CPAs. Resultó particularmente interesante poder determinar el número de estas células, para poder identificar si los cambios encontrados en la capacidad adipogénica se debían a un aumento en el número de CPA o a alguna característica diferencial entre los precursores de ambos grupos. De esta manera se realizó un análisis por citometría de flujo, utilizando el patrón: CD34+CD31-CD45- para identificar las CPAs. Así se pudo observar

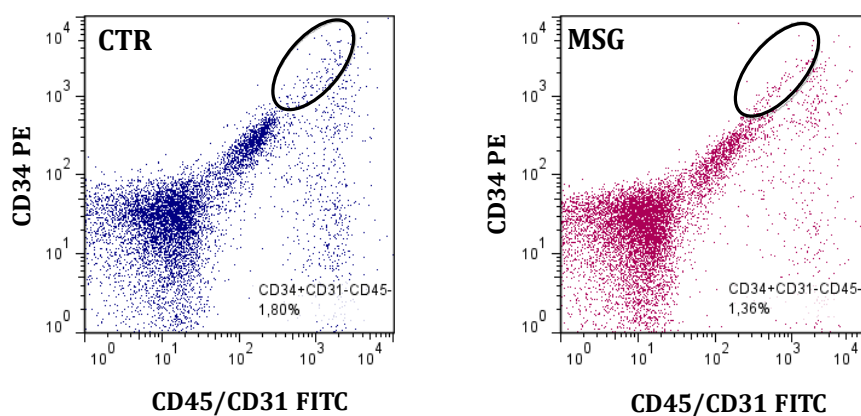


que dentro de la FEV de ambos grupos experimentales, tanto el porcentaje como el número total de CPA no presentaron diferencias, lo que podría estar indicando que las diferencias encontradas en el proceso adipogénico analizado anteriormente respondían a otro fenómeno (Figura 10).



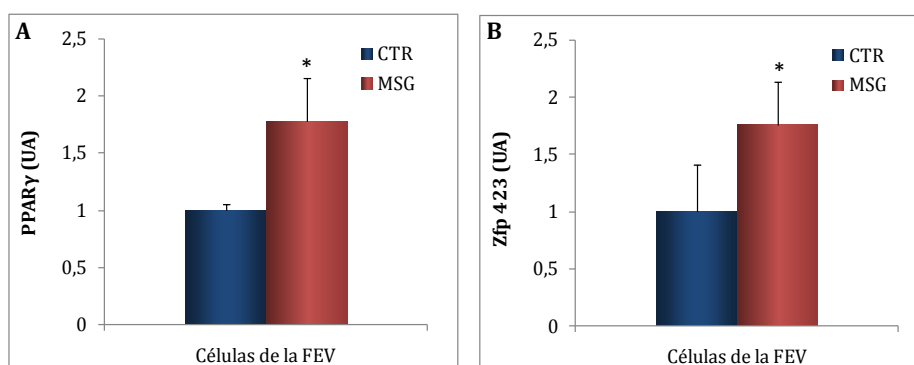
**Figura 10: A)** porcentaje de CPA en la FEV de los grupos CTR y MSG; **B)** número total de CPA presente en la FEV del TARP de ambos grupos experimentales. n= 3 experimentos por grupo. Valores  $\pm$  EEM.

De manera representativa se muestran los gráficos obtenidos para cada uno de los grupos celulares al ser analizados por citometría de flujo, mostrándose en el eje vertical la marcación para CD34 (fluorocromo PE) y en el eje horizontal la doble marcación para CD31/CD45 (ambos con fluorocromo FITC) (Figura 11).



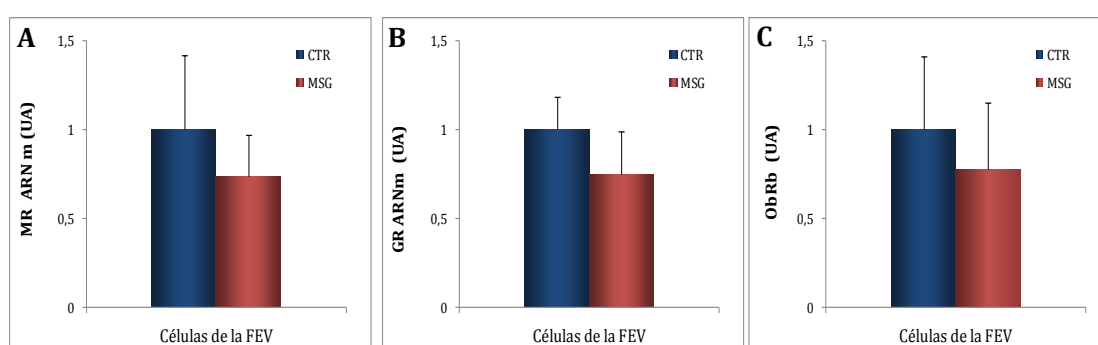
**Figura 11:** Gráficos representativos del grupo CTR y MSG (izquierda y derecha, respectivamente) del análisis realizado por citometría de flujo. En negro (elipse) se indica la población de CPAs identificada según el patrón de marcación CD34+CD31-CD45-.

Luego de observar que no hubo diferencias en el número de CPAs de los animales MSG, se continuó evaluando los niveles de expresión de PPAR $\gamma$ 2 y Zfp423, dos factores que indican el grado de competencia de las CPAs hacia el linaje adipocitario. De esta manera, al cuantificar los niveles de ARNm de ambos factores se pudo observar un aumento de los mismos en las células del grupo MSG con respecto a las células CTR (**Figura 12**).



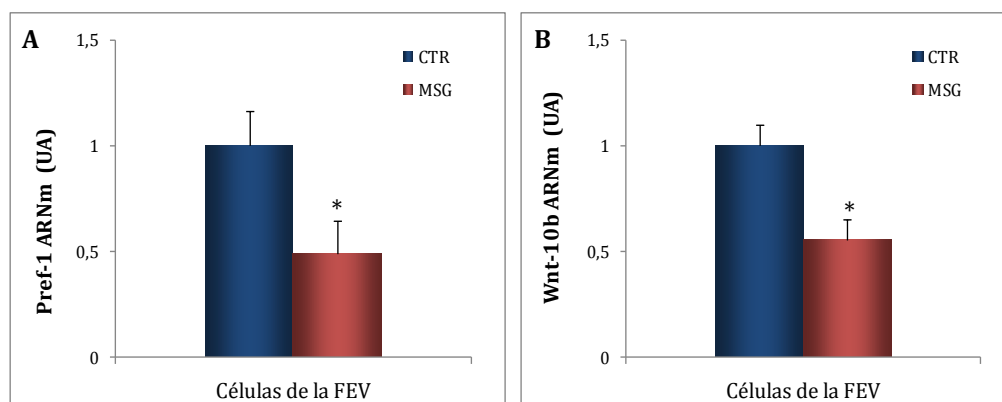
**Figura 12:** Niveles de expresión de los ARNm de PPAR $\gamma$ 2 (**A**) y Zfp423 (**B**) en células de la FEV de ratas macho CTR y MSG. Valores expresados en Unidades Arbitrarias (UA). n=4 experimentos. Valores  $\pm$  EEM. \*p<0,05 vs CTR.

Para completar la caracterización de las células de la FEV se evaluaron los niveles de expresión de diversos factores que intervienen en el proceso adipogénico, modulando de manera positiva o negativa el pasaje de los precursores hacia el fenotipo adipocitario. En primer lugar, teniendo en cuenta los elevados valores de CORT y LEP en los animales MSG, se determinaron los niveles de expresión de los receptores para estas hormonas (MR, GR y ObRb). Así, como puede observarse en la **Figura 13** ninguno de los tres factores presentó diferencias en los niveles de transcripto entre ambos grupos de células.



**Figura 13:** Niveles de expresión de los ARNm de MR (A), GR (B) y ObRb (C) en células de la FEV de ratas macho CTR y MSG. Valores expresados en Unidades Arbitrarias (UA). n=4 experimentos. Valores  $\pm$  EEM.

Sin embargo cuando se analizaron los niveles de expresión de dos factores anti-adipogénicos, como son Pref-1 y Wnt10b, los niveles encontrados en las células del grupo MSG fueron sustancialmente menores a los encontrados en las células CTR (**Figura 14**). Este resultado podría explicar, en parte, las variaciones encontradas en los diversos parámetros de diferenciación analizados anteriormente, y representaría una posible explicación para el aumento en la capacidad adipogénica encontrada en las células precursoras de los animales tratados. Es decir, en conjunto estos resultados indicarían que los cambios encontrados en el proceso de diferenciación *in vitro* de las células MSG radicarían en las características diferenciales de los precursores, generadas por el impacto de las alteraciones *in vivo*.



**Figura 14:** Niveles de expresión de los ARNm de Pref-1 **(A)** y Wnt-10b **(B)** en células de la FEV de ratas macho CTR y DRF. Valores expresados en Unidades Arbitrarias (UA). n=4 experimentos. Valores  $\pm$  EEM. \* $p < 0,05$  vs CTR.

## Modelo MSG en ratas macho de 60 días de edad.

### Características generales.

Como se mencionó anteriormente, la caracterización del modelo MSG a distintas edades fue llevada a cabo previamente en nuestro laboratorio, por lo tanto se realizaron las determinaciones correspondientes para verificar que los efectos del neurotóxico correspondieran a los ya descritos. Como se puede observar en la **Tabla 1** los animales MSG mostraron un menor peso corporal, acorde a la menor talla característica. Como anteriormente se describió los niveles circulantes de LEP y CORT fueron mayores en los animales MSG, sin encontrarse diferencia en los niveles de INS, TG y Glu. De la misma manera los valores de Adipoq fueron mayores, mientras que los de PAI-1 permanecieron sin cambios.

|                           | CTR           | MSG            |
|---------------------------|---------------|----------------|
| <b>Peso corporal (gr)</b> | 302,07 ± 9,41 | 235,41 ± 6,88* |
| <b>LEP (ng/mL)</b>        | 5,97 ± 0,67   | 12,98 ± 1,48*  |
| <b>CORT (ug/dL)</b>       | 6,45 ± 1,14   | 12,99 ± 2,51*  |
| <b>INS (ng/mL)</b>        | 2,01 ± 0,05   | 2,42 ± 0,35    |
| <b>TG (g/L)</b>           | 1,16± 0,14    | 1,24± 0,22     |
| <b>Glu (g/L)</b>          | 1,17± 0,03    | 1,14± 0,06     |
| <b>ADIPO (µg/mL)</b>      | 11,82 ± 0,71  | 22,53 ± 1,25*  |
| <b>PAI-1 (ng/mL)</b>      | 1,05 ± 0,16   | 2,75 ± 1,37    |

**Tabla 1:** Peso corporal y valores plasmáticos medidos en animales CTR y MSG de 60 días de vida. n=20 animales por grupo experimental. Valores ± EEM. \*p<0,05 vs CTR.

### Características del TARP.

Otro de los parámetros cuantificados fue el TARP, que como ya se mencionó representa un importante porcentaje del TA de la cavidad abdominal. De esta manera se encontró un aumento en la masa de TARP en los animales MSG, diferencia que fue aún mayor al ser corregida por el peso corporal individual de los animales (**Tabla 2**). Adicionalmente, se realizó el recuento de células de la FEV de este depósito, sin encontrar diferencias entre ambos grupos. Cabe destacar que al normalizar este valor por la masa de TARP si se encontró diferencia, siendo menor el número de células por gr de TARP para los animales MSG (**Tabla 2**).

|                                      | CTR               | MSG               |
|--------------------------------------|-------------------|-------------------|
| <b>Masa de TARP (gr)</b>             | 2,25 ± 0,20       | 3,23 ± 0,37*      |
| <b>TARP/ 100 gr de peso corporal</b> | 0,76 ± 0,07       | 1,35 ± 0,14*      |
| <b>Recuento celular total FEV</b>    | 861.000 ± 117.291 | 759.565 ± 142.204 |
| <b>Cél/ gr TARP</b>                  | 377.692 ± 27.957  | 240.914 ± 34.682* |

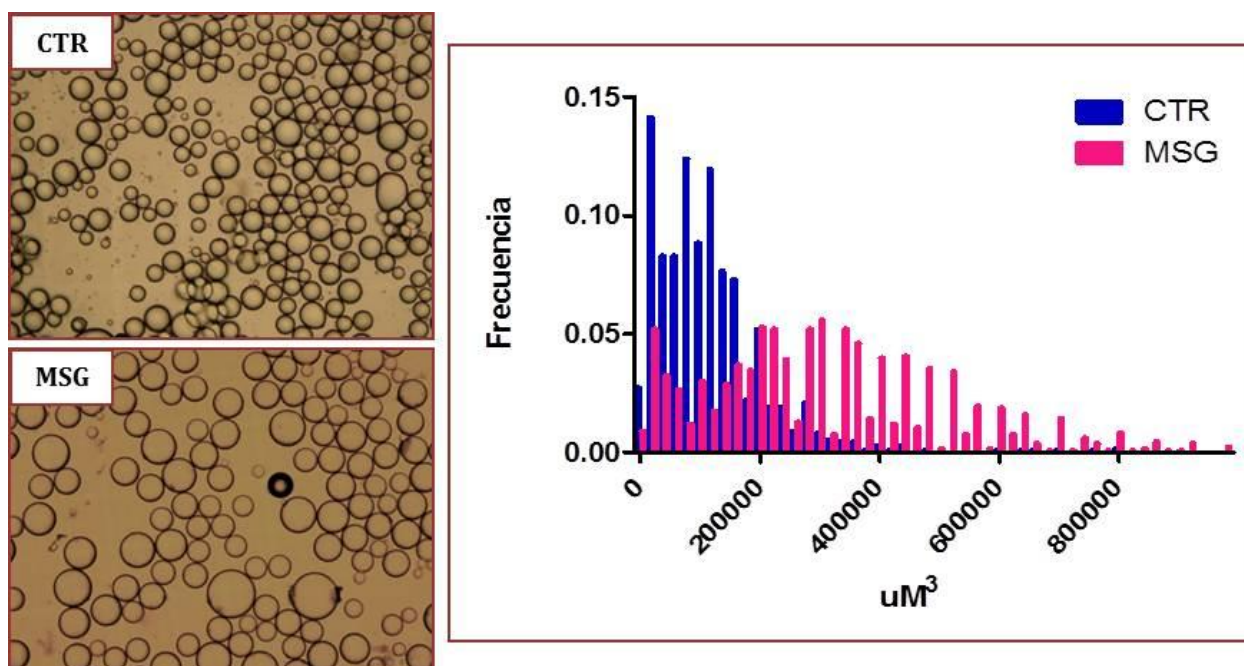
**Tabla 2:** Parámetros de caracterización del TARP de animales CTR y MSG de 60 días de vida. n=20 animales por grupo experimental. Valores ± EEM. \*p<0,05 vs CTR.

Luego de corroborar la existencia de una expansión en la masa del TARP de los animales MSG, analizamos la posible contribución de la hipertrofia de las células adiposas del TARP de estos animales. Para ello cuantificamos el tamaño celular de los adipocitos en suspensión (**Tabla 3**) y observamos que los adipocitos del grupo MSG presentaron valores de radio y volumen mayores que las células CTR.

|                                    | CTR             | MSG                |
|------------------------------------|-----------------|--------------------|
| <b>Radio de adipocitos (µm)</b>    | 34,65 ± 0,05    | 49,37 ± 0,46**     |
| <b>Volumen de adipocitos (µm³)</b> | 123.393 ± 5.210 | 371.643 ± 12.197** |

**Tabla 3:** Valores de radio y volumen de adipocitos en suspensión de animales CTR y MSG. n=3 experimentos por grupo. Valores ± EEM. \*\*p<0,01.

Por otro lado, se analizó la distribución de tamaños de los adipocitos de los animales MSG y se pudo observar la presencia de dos poblaciones definidas, una de menor tamaño y otra desplazada hacia valores mayores con respecto a las células CTR. Este patrón estaría indicando una contribución hiperplásica (nuevos adipocitos de menor tamaño) y un fuerte componente hipertrófico. De manera representativa se presentan dos imágenes de los adipocitos en suspensión de ambos grupos experimentales, donde puede apreciarse la diferencia de tamaños (**Figura 1**).

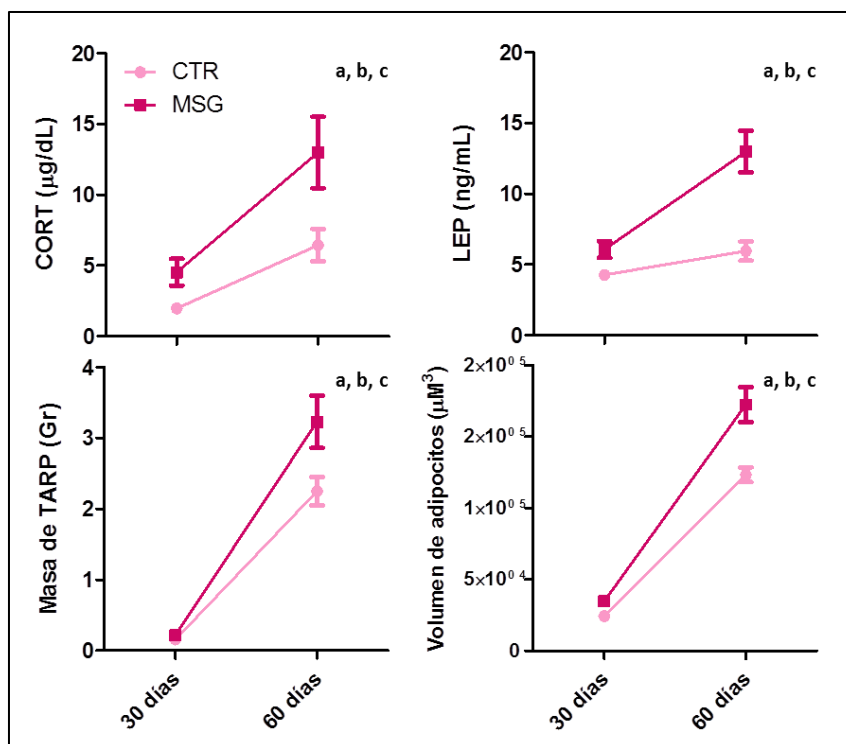


**Figura 1:** Imágenes representativas de adipocitos en suspensión de ratas macho CTR (arriba) y MSG (abajo) de 60 días vida. En el panel de la derecha se muestra un histograma de la distribución de adipocitos según su volumen.

### Comparación de parámetros metabólicos de las ratas MSG.

Luego de analizar los diferentes parámetros metabólicos en ambas edades por separado, nos pareció relevante evaluar globalmente el efecto de la edad y del tratamiento con MSG y su posible interacción, en cada una de ellos (ANOVA de dos vías). Esto nos permitiría evaluar si hubo un agravamiento de dichos parámetros en los animales adultos, entendiendo por tal un efecto sobre los parámetros medidos mayor a la suma del aporte individual de cada variable. Con respecto a esto pudimos encontrar que ambas variables, de manera independiente, afectaban la mayor parte de los parámetros medidos, sin encontrar efectos únicamente sobre los valores de TG y Glu. De este mismo análisis pudimos determinar que tanto la masa del TARP y la hipertrofia adipocitaria, así como también los niveles de LEP y CORT circulantes reflejaron un efecto sinérgico de la edad y del

tratamiento. Este último resultado nos estaría indicando que los animales MSG adultos presentaron un empeoramiento de la función adipocitaria y adrenal entre los dos períodos estudiados (**Figura 2**).

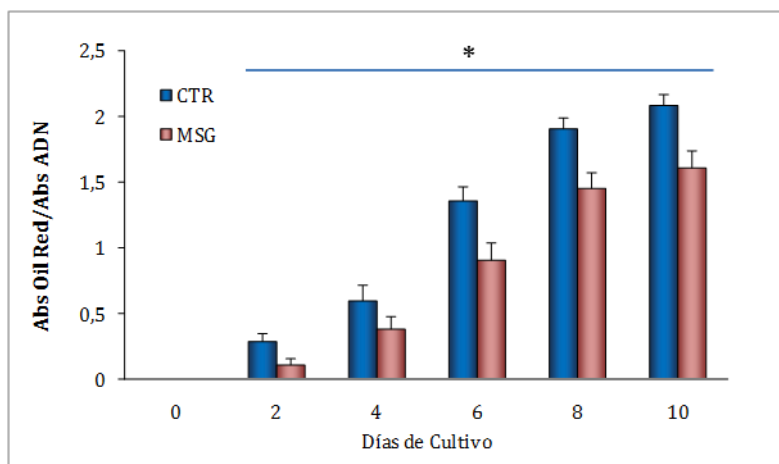


**Figura 2:** Comparación de los parámetros metabólicos, masa del TARP y volumen de adipocitos de las ratas CTR y MSG a 30 y 60 días. Resultados del análisis estadístico ANOVA (dos vías), donde **a**, representa aquellos parámetros afectados por la edad, **b**, aquellos afectados por el tratamiento y **c**, los afectados por la interacción entre ambos.

### Parámetros de diferenciación adipocitaria *in vitro*.

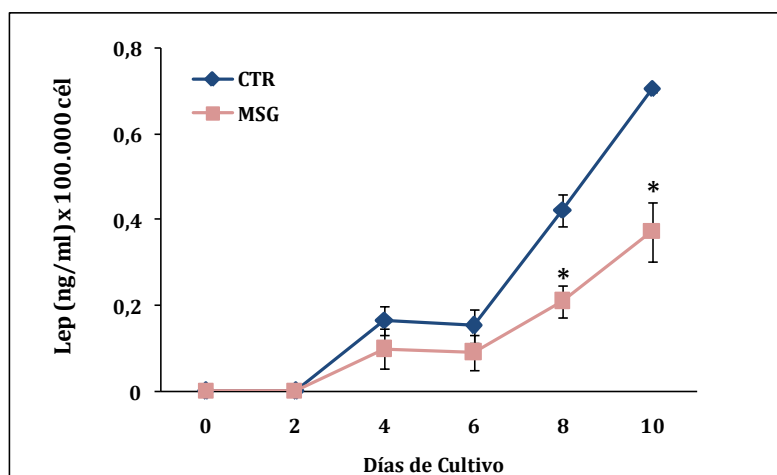
Luego de corroborar que existía un aumento en la expansión del TARP, el siguiente paso fue caracterizar el proceso adipogénico de los precursores contenidos en la FEV de los animales MSG, con el objetivo de determinar si existían alteraciones en dicho proceso. Durante el proceso se monitorearon diversos parámetros de diferenciación que fueron utilizados para establecer si existían diferencias en el proceso adipogénico.





**Figura 3:** Contenido intracelular de lípidos de adipocitos diferenciados *in vitro* de los animales CTR y MSG. n=4 experimentos por grupo. Valores  $\pm$  EEM. \* $p < 0,05$  vs CTR.

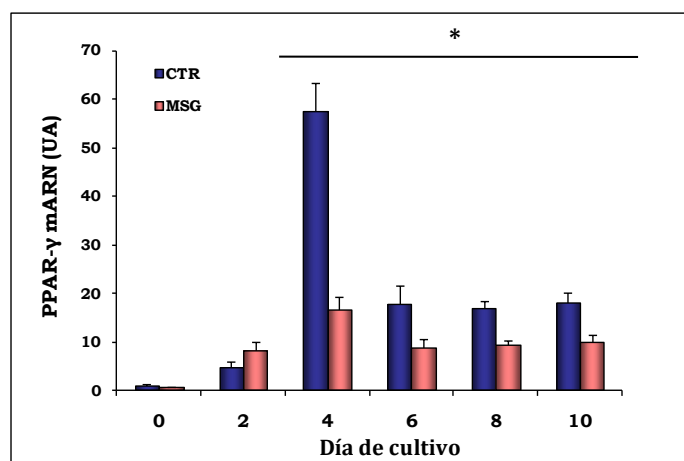
Como se explicó anteriormente, el proceso adipogénico de los animales de 60 días fue el primero que se analizó, por esta razón se realizaron las cinéticas de diversos marcadores, que se utilizaron para seleccionar los días de estudio en el resto de los grupos experimentales. Como primer parámetro se cuantificó el almacenamiento de lípidos intracelulares cada 48 horas, desde el día de agregado de la mezcla de diferenciación (d0) hasta el día final del cultivo (d10). Como se puede observar en la **Figura 3** la acumulación comenzó a ser evidente al día 2 de cultivo para ambos grupos celulares. Desde ese momento y hasta el día 10 de cultivo las células del grupo MSG presentaron una disminución significativa en el contenido lipídico. Otro de los parámetros utilizados para determinar la capacidad de diferenciación de los células *in vitro* fue la liberación de leptina al medio de cultivo. Nuestros resultados mostraron que detección comenzó a ser significativa desde el día 4 de cultivo para ambos grupos, sin embargo se encontró una menor secreción por parte de las células del grupo MSG desde el día 8 de cultivo, manteniéndose esta tendencia hasta finalizar el cultivo (**Figura 4**).



**Figura 4:** Liberación de leptina al medio de cultivo por parte de los adipocitos CTR y MSG. n=4 experimentos por grupo. Valores  $\pm$  EEM. \* $p < 0,05$  vs CTR.

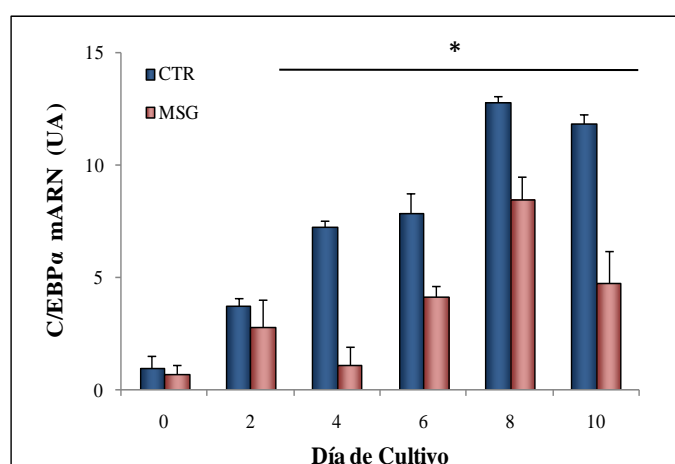
### Análisis de marcadores adipogénicos *in vitro*.

Continuando con el estudio de la adipogénesis *in vitro* analizamos el patrón de expresión de diversos marcadores de diferenciación a lo largo del proceso adipogénico por PCR Tiempo Real. Para ello comenzamos estudiando los niveles de ARN mensajero, desde el día 0 al día 10 post-diferenciación, de PPAR $\gamma$ 2 y C/EBP $\alpha$ , dos de los principales factores de transcripción involucrados en la regulación de este proceso y de los cuales depende la expresión de los restantes genes del fenotipo adipocitario maduro. Como se puede ver en la **Figura 5**, la expresión de PPAR $\gamma$ 2 comenzó a ser detectable desde el día 0, aumentando en los días subsiguientes, hasta alcanzar su pico máximo al día 4 post-diferenciación. Durante el resto de los días de cultivo la expresión fue menor que al día 4, y se mantuvo constante hasta la finalización. Este patrón en la cinética de expresión fue similar en ambos grupos, sin embargo desde el día 4 y hasta el día 10 las células en diferenciación del grupo MSG presentaron niveles de expresión menores que las células CTR. De la misma manera se evaluaron los niveles de otros marcadores de diferenciación como C/EBP $\alpha$ , el cual está regulado directamente por PPAR $\gamma$ 2 y es otro de los factores de transcripción involucrados en el desarrollo del fenotipo maduro.



**Figura 5:** Niveles de ARN mensajero de PPAR $\gamma$ 2 en células del grupo CTR y MSG expresados en Unidades Arbitrarias (UA). n=4 experimentos. Valores  $\pm$  EEM. \* $p < 0,05$  vs CTR.

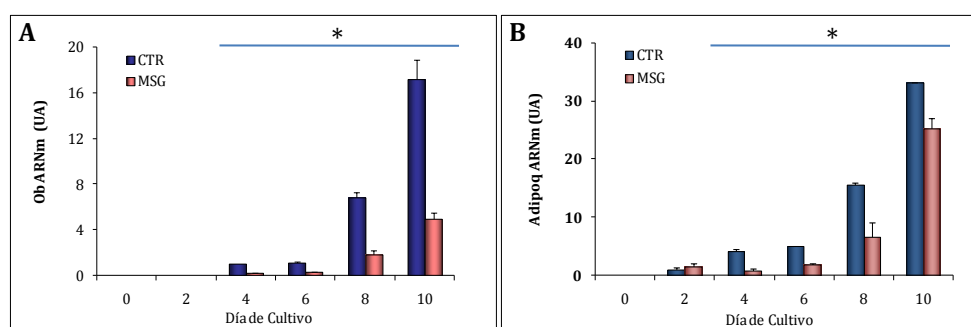
De manera similar a lo que encontramos en el patrón de expresión de PPAR $\gamma$ 2, C/EBP $\alpha$  presentó un máximo de expresión a lo largo del período de monitoreo, sin embargo, y como era de esperar, fue tardío con respecto al encontrado para PPAR $\gamma$ 2. Así su máximo valor fue encontrado al día 8 para ambos grupos, siendo la expresión significativamente menor desde el día 4 en adelante para el grupo MSG con respecto al CTR.



**Figura 6:** Niveles de ARNm de C/EBP $\alpha$  en células CTR y MSG expresados en Unidades Arbitrarias (UA). n=4 experimentos. Valores  $\pm$  EEM. \* $p < 0,05$  vs CTR.

Continuando con el análisis de marcadores adipocitarios se evaluó también la expresión de los genes pertenecientes a distintas adipoquinas secretadas específicamente por los adipocitos maduros, como son LEP (Ob) y Adipoq. De la misma manera que los factores de transcripción

previamente analizados, cuantificamos la expresión de estas adipoquinas a lo largo del proceso de diferenciación *in vitro*. Con respecto a LEP pudimos observar un nivel de expresión detectable a partir del día 4 de cultivo para ambos grupos de células (**Figura 7, panel A**). Este resultado fue coincidente con la aparición de LEP en el medio de cultivo al día 4 post-diferenciación mostrada en la **Figura 3**. Sin embargo, a diferencia de la liberación al medio extracelular, la expresión del ARNm de LEP fue significativamente menor en el grupo MSG en el día de cultivo mencionado. En los días posteriores de cultivo continuó disminuida, llegando a reducirse a menos de la mitad del valor de las células CTR en los días terminales de la diferenciación (día 8 y día 10). De manera similar, los niveles de Adipoq fueron menores en las células MSG desde el día 4 post-diferenciación y permanecieron por debajo de los valores de las células CTR hasta el día final de cultivo, siendo su disminución significativa con respecto al CTR (**Figura 7, panel B**).

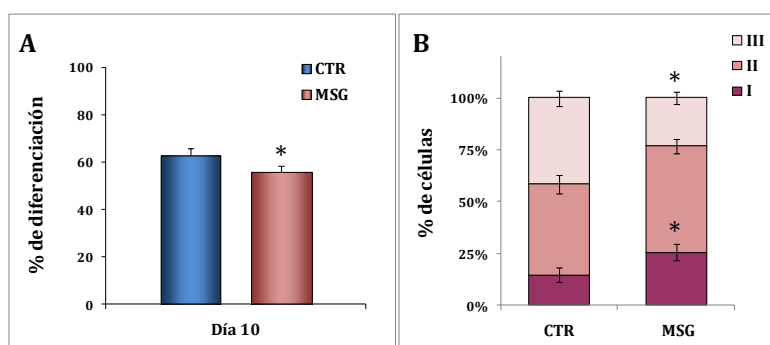


**Figura 7:** Niveles de expresión de Ob (A) y Adipoq (B) en células en diferenciación de animales CTR y MSG. n=4 experimentos. Valores  $\pm$  EEM. \* $p < 0,05$  vs CTR.

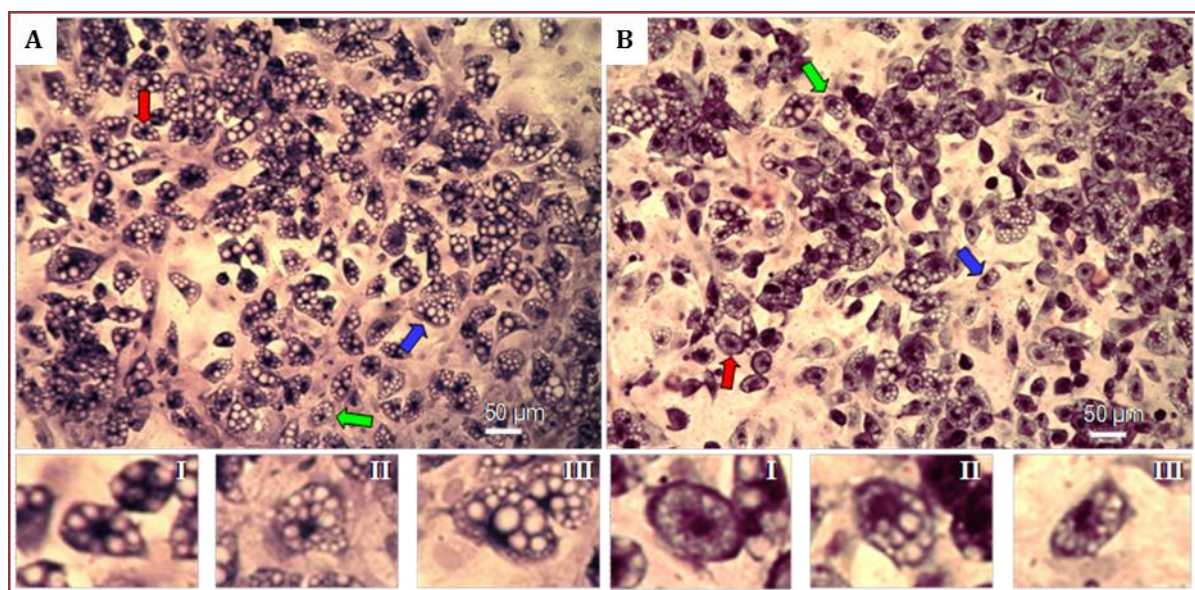
### **Análisis del grado de avance del proceso de diferenciación *in vitro*.**

Luego de haber evaluado diversos parámetros indicativos del estado de diferenciación *in vitro*, analizamos específicamente el porcentaje de células diferenciadas en la etapa terminal del cultivo. Para ello se consideraron como diferenciadas aquellas células que presentaban vacuolas lipídicas al día 10 post-diferenciación. De esta manera encontramos que los cultivos de células MSG presentaban un menor porcentaje de diferenciación con respecto a los cultivos CTR

**(Figura 8, Panel A).** Para profundizar en este análisis evaluamos los diversos grados de maduración de las células diferenciadas, estableciendo tres grados según el desplazamiento del núcleo. Los resultados mostraron que las células MSG presentaban un mayor porcentaje de células en el estadio I de maduración en comparación con las células CTR **(Figura 8, Panel B)**. Por el contrario el porcentaje disminuyó en el grupo MSG cuando se cuantificó el estadio III de maduración con respecto al CTR. En el estadio II no se encontraron diferencias significativas entre ambos grupos. Estos datos indicarían que no solamente las células MSG se diferencian menos con respecto a las células CTR, sino que también aquellas que se diferencian lo hacen más lentamente, llegando a alcanzar grados de maduración menores que las células CTR en el período terminal de la diferenciación *in vitro*.



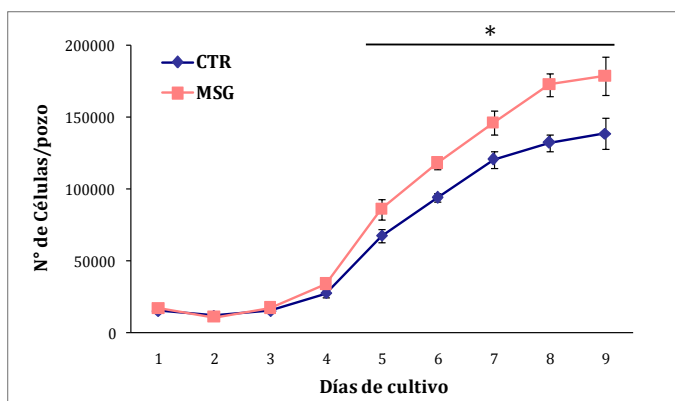
**Figura 8: A)** Porcentaje de diferenciación al día 10, en cultivos CTR y MSG **B)** Grados de maduración de células diferenciadas CTR y MSG al día 10 de cultivo. I, II y III corresponden a los grados de maduración desde el de menor diferenciación al de mayor, respectivamente. . n=4 experimentos. Valores  $\pm$  EEM. \* $p < 0,05$  vs CTR



**Figura 9:** Fotos representativas de los distintos grados de maduración en células CTR (Panel A) y células MSG (Panel B). Las flechas indican células en los tres grados de maduración analizados según la posición del núcleo. Amplificación 10X. Grado I: núcleo central (rojo); Grado II: núcleo parcialmente desplazado (verde); Grado III: núcleo completamente periférico, adyacente a la membrana (azul), (amplificados en los recuadros I, II y III).

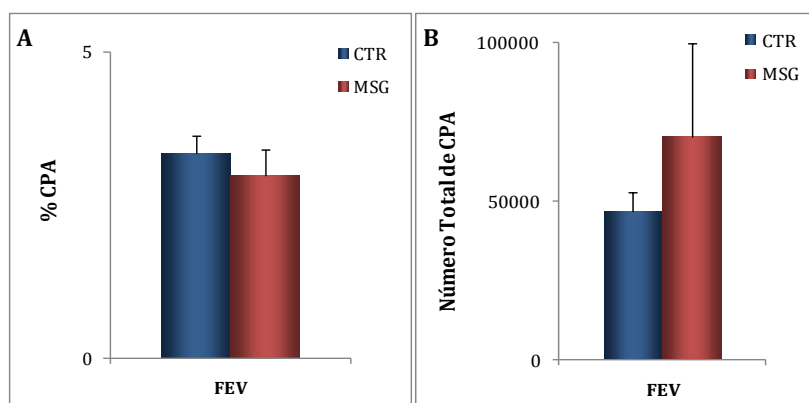
### Caracterización de las células de la FEV.

Teniendo en cuenta las alteraciones encontradas en la capacidad adipogénica *in vitro* de las células MSG, el siguiente paso fue estudiar el estado de los precursores adipocitarios contenidos en la FEV. Como primer parámetro se determinó la capacidad de proliferación de las células presentes en la FEV de los animales CTR y MSG, registrándose los recuentos celulares cada 24 horas. De esta manera se construyó una curva de proliferación para ambos grupos en la que se puede observar que las células MSG presentaron una mayor capacidad de proliferación que fue significativamente mayor desde el día 6 de cultivo hasta el día 9 con respecto a las células CTR (Figura 10).

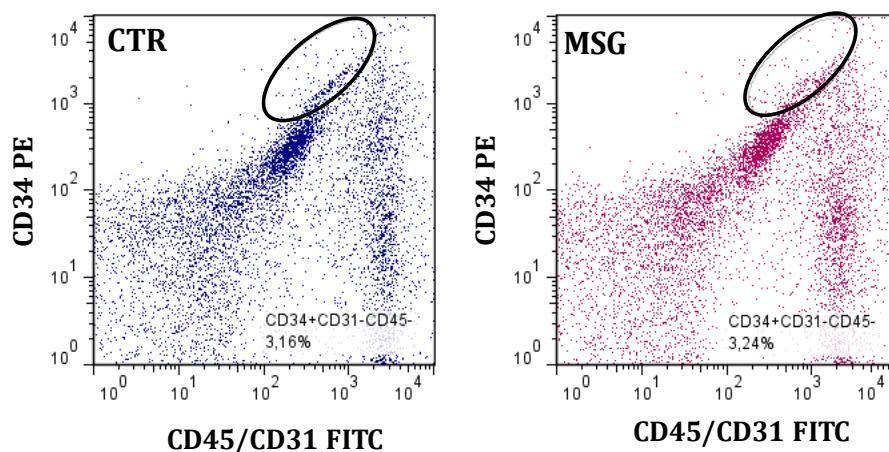


**Figura 10:** Curva de proliferación de las células de FEV de los grupos CTR y MSG. n=4 experimentos. Valores  $\pm$  EEM. \* $p < 0,05$  vs CTR.

Continuando con el análisis de la FEV se estudió la proporción de CPAs para poder determinar si la disminución encontrada en la adipogénesis podría ser producto de una menor cantidad de dichos precursores, definidos según la presencia o ausencia de los siguientes marcadores de membrana: CD34+CD31-CD45-. Así se pudo observar que, tanto el porcentaje como el número total de CPA en la FEV de ambos grupos experimentales no presentaron diferencias (**Figura 11, Paneles A y B**, respectivamente). Esto estaría indicando que las diferencias encontradas en los parámetros de diferenciación *in vitro* responderían a cambios en el estado de los precursores y no en el número de los mismos presente en la FEV. De manera representativa se muestran los gráficos obtenidos para cada uno de los grupos celulares al ser analizados por citometría de flujo. (**Figura 12**).



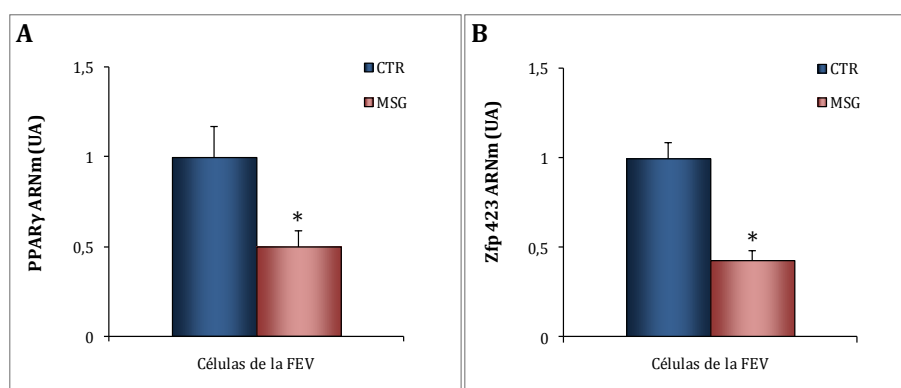
**Figura 11:** A) porcentaje de CPA en la FEV de los grupos CTR y MSG; B) número total de CPA presente en la FEV del TARP de ambos grupos experimentales. n=3 experimentos. Valores  $\pm$  EEM. \* $p < 0,05$  vs CTR.



**Figura 12:** Gráficos representativos del grupo CTR y MSG (izquierda y derecha, respectivamente) del análisis realizado por citometría de flujo. En negro (elipse) se indica la población CPA identificada según el patrón de marcación CD34+CD31-CD45-.

De manera adicional se cuantificaron los niveles de expresión de dos marcadores de competencia adipocitaria: PPAR $\gamma$ 2 y Zfp423, que marcan la sensibilidad de las células precursoras a diferenciarse al linaje adipocitario. Así se pudo observar que las células de la FEV de los animales MSG presentaron mayores niveles de expresión de ambos marcadores en comparación con las células CTR (**Figura 13**). Teniendo en cuenta el resultado obtenido en el análisis por citometría de flujo se podría afirmar que, si bien no existen diferencias en la cantidad de CPAs presentes en la FEV del grupo MSG, estas células expresan un menor nivel de marcadores de competencia, que las haría menos sensibles al momento de la diferenciación adipocitaria. Esto explicaría en parte la menor capacidad de diferenciación encontrada en el grupo MSG.



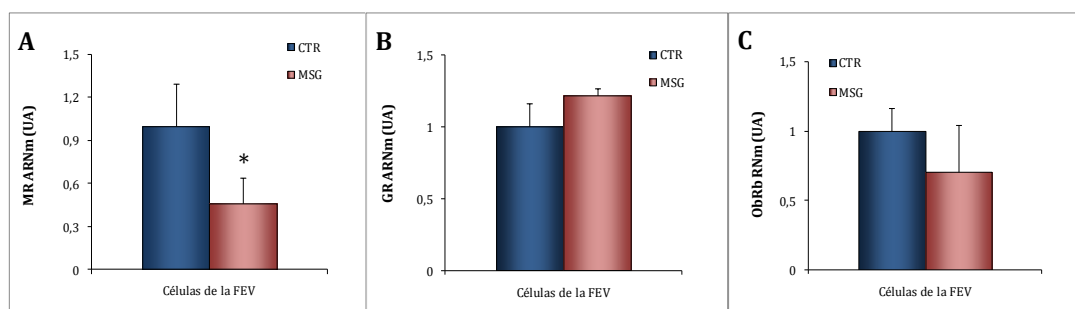


**Figura 13:** Niveles de expresión de los ARNm de PPAR $\gamma$ 2 **(A)** y Zfp423 **(B)** en células de la FEV de ratas macho CTR y MSG. Valores expresados en Unidades Arbitrarias (UA). n=4 experimentos. Valores  $\pm$  EEM. \*p<0,05 vs CTR.

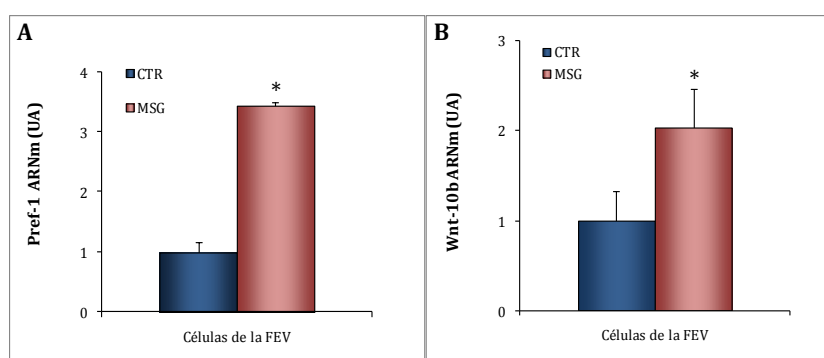
Continuando con el análisis de las células de la FEV, evaluamos los niveles de expresión de distintos receptores hormonales que podrían intervenir en el proceso adipogénico como son MR, GR y ObRb. Como puede observarse en la **Figura 14 (Paneles A, B y C)** los niveles de expresión de las células de la FEV de los animales MSG presentaron un valor menor en el caso de MR y no presentaron diferencias en el caso de GR ni de ObRb. Considerando el rol predominante que cumple MR frente al estímulo con glucocorticoides durante la adipogénesis *in vitro*, esta diferencia podría explicar en parte la menor capacidad de diferenciación que poseen las células de los animales MSG. Por otra parte, al no haber encontrado diferencias en la expresión de ObRb se podría suponer que los elevados niveles *in vivo* de esta adipoquina no habrían afectado la sensibilidad a la misma.

Por último también se analizaron los niveles de expresión de dos factores antiadipogénicos como son Pref-1 y Wnt-10b. Teniendo en cuenta el rol de ambos en la determinación del destino de las células precursoras adipocitarias, decidimos estudiar si existía una alteración en su expresión que pudiera relacionarse con los efectos observados en la diferenciación. Así pudimos observar que las células del grupo MSG mostraban mayores niveles de expresión de Pref-1 y de Wnt-10b en comparación con las células CTR **(Figura 15, Paneles A y B)**. Esto contribuiría a

explicar la menor diferenciación encontrada en las células del grupo MSG durante el proceso *in vitro*.



**Figura 14:** Niveles de expresión de los ARNm de MR (A), GR (B) y ObRb (C) en células de la FEV de ratas macho CTR y MSG. Valores expresados en Unidades Arbitrarias (UA). n=4 experimentos. Valores  $\pm$  EEM. \* $p < 0,05$  vs CTR.



**Figura 15:** Niveles de expresión de los ARNm de Pref-1 (A) y Wnt-10b (B) en células de la FEV de ratas macho CTR y MSG. Valores expresados en Unidades Arbitrarias (UA). n=4 experimentos. Valores  $\pm$  EEM. \* $p < 0,05$  vs CTR.

### Modelo MSG con normalización de corticosteronemia

Luego de observar las alteraciones encontradas en el proceso adipogénico y en las características de las células de la FEV de los animales MSG, se decidió analizar el posible efecto del aumento de GCs circulantes sobre dichos parámetros. Para ello se realizaron experimentos adicionales con animales tratados con el neurotóxico MSG y a los cuales se les normalizaron los valores de CORT durante 21 días (MSG ADX+CORT) mediante una cirugía de adrenalectomía bilateral y sustitución de CORT por pellet subcutáneo, tal y como se detalló anteriormente en la sección de Materiales y Métodos. Se utilizaron para la comparación los controles de simulación necesarios (CTR SHAM+P y MSG SHAM+P).

|                                      | CTR SHAM+P        | MSG SHAM+P       | MSG ADX+CORT    |
|--------------------------------------|-------------------|------------------|-----------------|
| <b>Peso corporal (gr)</b>            | 278,61 ± 13,93    | 211,79 ± 11,78 * | 216,57 ± 8,66*  |
| <b>LEP (ng/mL)</b>                   | 4,82 ± 0,61       | 13,28 ± 2,03 *   | 3,88 ± 0,45 +   |
| <b>CORT (µg/dL)</b>                  | 6,89 ± 1,09       | 13,37 ± 2,86 *   | 6,21 ± 2,14 +   |
| <b>Masa de TARP (gr)</b>             | 2,29 ± 0,10       | 3,32 ± 0,41*     | 2,45 ± 0,04+    |
| <b>TARP/ 100 gr de peso corporal</b> | 0,82±0,11         | 1,57±0,41*       | 1,13±0,12+      |
| <b>Recuento celular total FEV</b>    | 761.000 ± 127.200 | 801.000± 211.929 | 754.000±154.841 |
| <b>Cél/ gr TARP</b>                  | 332.314±25.677    | 241.265±13.840   | 284.528±31.796  |

**Tabla 4:** Parámetros metabólicos de ratas macho de 81 días de vida de los distintos grupos experimentales: CTR SHAM+P, MSG SHAM+P y MSG ADX+CORT. n=6 animales por grupo experimental. Valores ± EEM. \*p < 0,05 vs. valores de CTR SHAM+P; +p < 0,05 vs. valores de MSG-SHAM+P.

De esta manera y para constatar la efectividad de la intervención, se analizaron algunos parámetros plasmáticos y metabólicos. Como puede observarse en la **Tabla 4** los animales del grupo MSG ADX+CORT presentaron un menor peso corporal comparado con los animales CTR SHAM+P y similar a los animales MSG SHAM+P, esto se debe a la menor talla característica que confiere el tratamiento con MSG. Los niveles plasmáticos de LEP y CORT de los animales con el suplemento de CORT revirtieron a los niveles normales, y lo mismo ocurrió con los valores de masa de TARP y al corregirla por el peso corporal. Los parámetros de las células de la FEV no presentaron diferencias entre ninguno de los grupos. Estos resultados indican que el

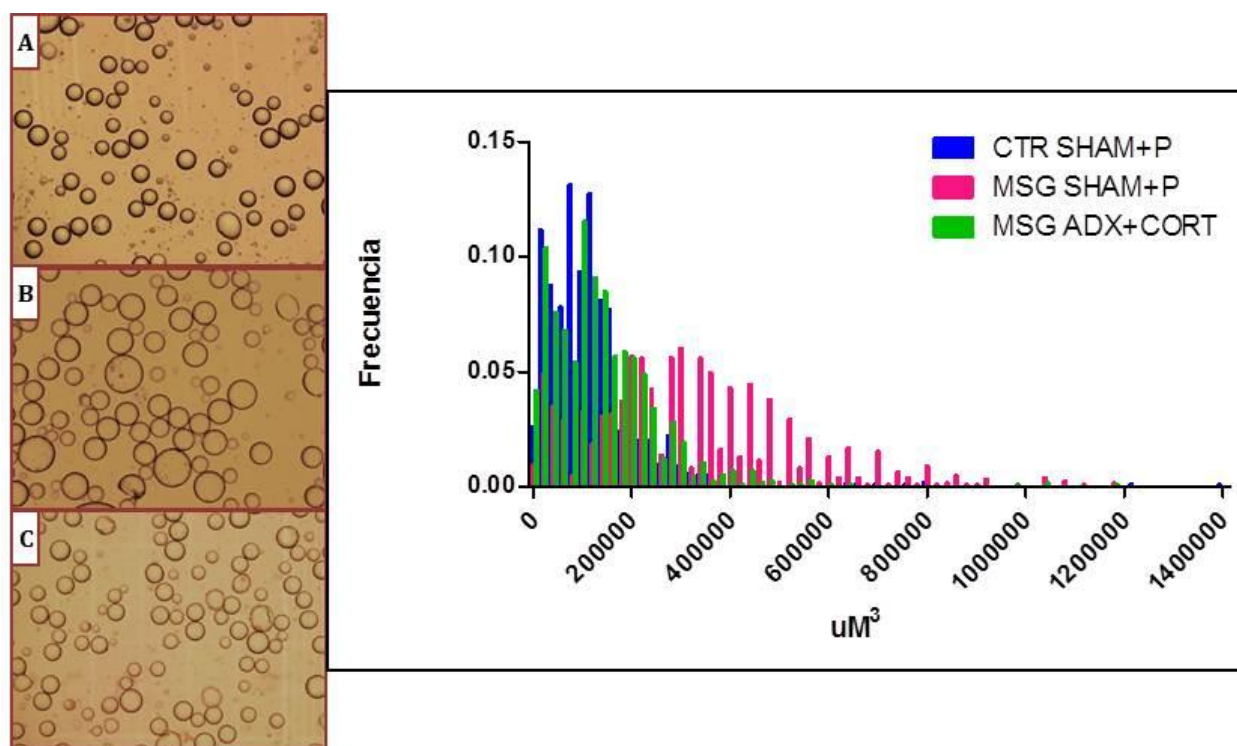
tratamiento de sustitución y normalización de CORT fue efectivo y confirió a los animales un fenotipo similar al de los animales CTR SHAM+P.

Otro parámetro analizado fue el tamaño de los adipocitos en suspensión de los distintos grupos experimentales. Estos resultados muestran que luego de la corrección de los niveles circulantes de CORT, los adipocitos de los animales MSG ADX+CORT revierten la hipertrofia, recuperando valores de tamaño similares a los de los adipocitos CTR SHAM+P (**Tabla 5**). También se puede observar, teniendo en cuenta los valores anteriormente encontrados para los animales CTR y MSG, que no existen diferencias con las poblaciones encontradas en los respectivos grupos SHAM+P.

|   | CTR SHAM+P                | MSG SHAM+P                  | MSG ADX+CORT                |
|---|---------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| <b>Radio de adipocitos (<math>\mu\text{m}</math>)</b>     | 35,60 $\pm$ 0,55          | 50,07 $\pm$ 0,50*           | 36,38 $\pm$ 0,71+           |
| <b>Volumen de adipocitos (<math>\mu\text{m}^3</math>)</b> | 139.641,93 $\pm$ 9.389,30 | 368.698,57 $\pm$ 35.474,95* | 143.458,59 $\pm$ 14.789,48+ |

**Tabla 5:** Valores de radios y volúmenes de adipocitos en suspensión de animales CTR SHAM+P, MSG SHAM+P y MSG ADX+CORT. n=4 experimentos por grupo. Valores  $\pm$  EEM. \*p<0,05 vs CTR SHAM+P, + p<0,05 vs MSG SHAM+P.

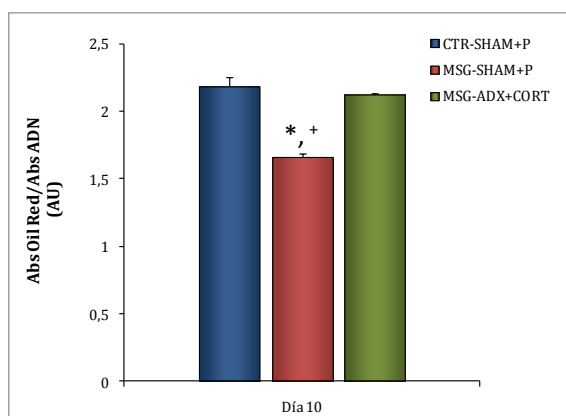
De manera representativa se muestran las imágenes (**Figura 16**) de los adipocitos en suspensión de los distintos grupos, donde puede observarse la reversión de la hipertrofia luego de la corrección de los niveles de CORT. De la misma manera, en el histograma de distribución de tamaños, se puede observar las diferencias de tamaño que presentan los adipocitos hipertróficos de los animales MSG SHAM+P, como ocurría con los animales MSG; y la normalización conseguida luego de la intervención y corrección de los niveles de CORT en los animales MSG ADX+CORT al ser comparados con el grupo CTR SHAM+P.



**Figura 16:** Imágenes representativas de adipocitos en suspensión de ratas macho CTR SHAM+P (A), MSG SHAM+P (B) y MSG ADX+CORT (C) de 81 días vida. En el panel de la derecha se muestra la distribución de adipocitos según su volumen.

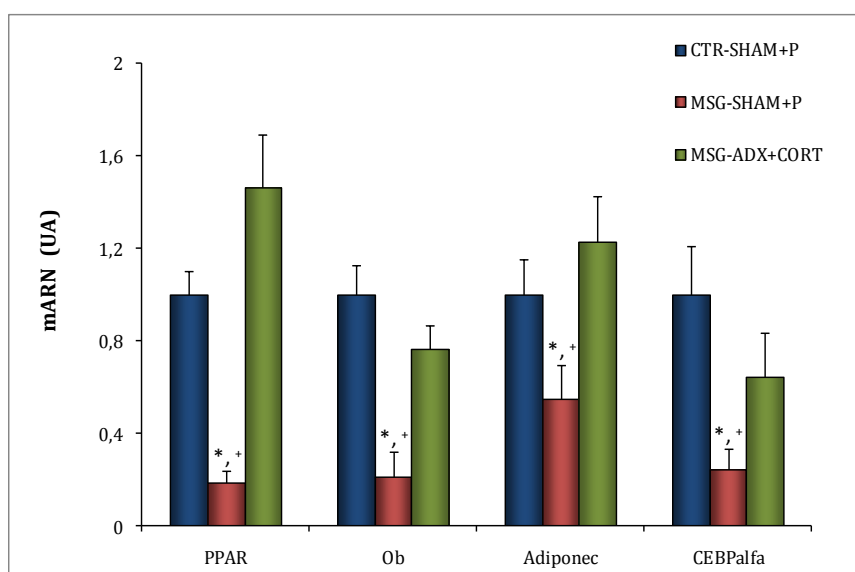
### Parámetros de diferenciación adipocitaria *in vitro*.

De la misma manera en que se evaluó el proceso de diferenciación de los precursores de la FEV para los animales MSG, y luego de comprobar la reversión de las alteraciones en el grupo MSG ADX+CORT, se procedió a evaluar la capacidad adipogénica *in vitro* en las células de los distintos grupos experimentales. El primer parámetro analizado fue la capacidad de almacenamiento de lípidos al día 10 de cultivo (**Figura 17**). Respecto a este parámetro las células del grupo MSG ADX+CORT mostraron valores similares a los valores del grupo CTR SHAM+P, siendo significativamente mayores a los encontrados para las células MSG SHAM+P.



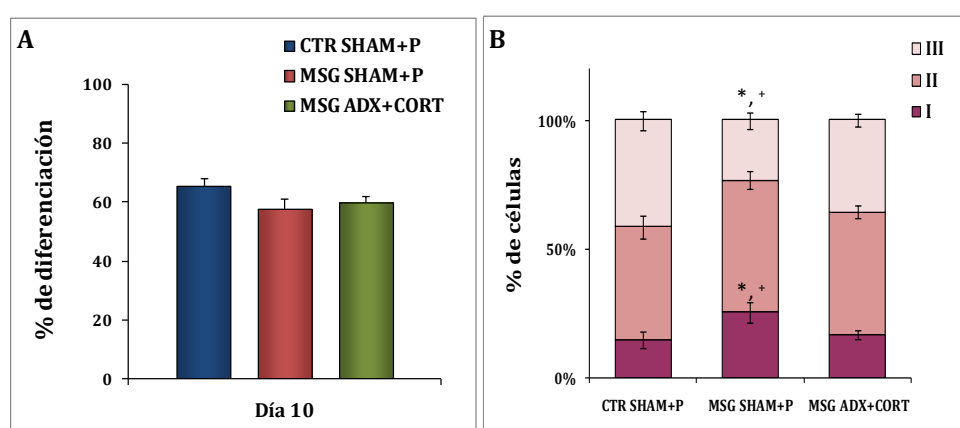
**Figura 17:** Contenido intracelular de lípidos de adipocitos diferenciados *in vitro* de los animales CTR SHAM+P, MSG SHAM+P y MSG ADX+CORT. n=4 experimentos por grupo. Valores  $\pm$  EEM. \* $p < 0,05$  vs CTR SHAM+P, +  $p < 0,05$  vs MSG ADX+CORT.

La siguiente determinación realizada fue la expresión de diversos marcadores de diferenciación (PPAR $\gamma$ 2, Ob, Adipoq y C/EBP $\alpha$ ) al día 10 de cultivo. Al evaluar estos parámetros en la etapa terminal de diferenciación se encontraron niveles de expresión similares para todos los marcadores analizados entre los grupos CTR SHAM+P y MSG ADX+CORT, siendo a su vez significativamente mayores que los encontrados para el grupo MSG SHAM+P (**Figura 18**).



**Figura 18:** Niveles de expresión de PPAR $\gamma$ 2, Ob, Adipoq y C/EBP $\alpha$  en adipocitos diferenciados *in vitro* al día 10 de cultivo para los distintos grupos experimentales. n=4 experimentos. Valores  $\pm$  EEM. \* $p < 0,05$  vs CTR SHAM+P, +  $p < 0,05$  vs MSG ADX+CORT.

Siguiendo con el estudio de la capacidad de diferenciación en etapas terminales del proceso adipogénico *in vitro*, se analizó el porcentaje de células diferenciadas al día 10 de cultivo para los tres grupos experimentales. Como puede observarse no se encontraron diferencias entre los tres grupos estudiados, alcanzando todos ellos valores similares, que rondaron el 60 % (**Figura 19, A**). Sin embargo, al realizar un análisis más profundo de las células diferenciadas se discriminó entre los distintos estadios en que podían encontrarse dichas células, de acuerdo a la posición nuclear, y se observó que tanto las células del grupo CTR SHAM+P y del grupo MSG ADX+CORT presentaron un patrón de grados de maduración similar, en donde el estadio más avanzado de maduración (Grado III) presentaba valores mayores comparados con el grupo MSG SHAM+P y ocurría lo contrario con el estadio de menor maduración (Grado I).

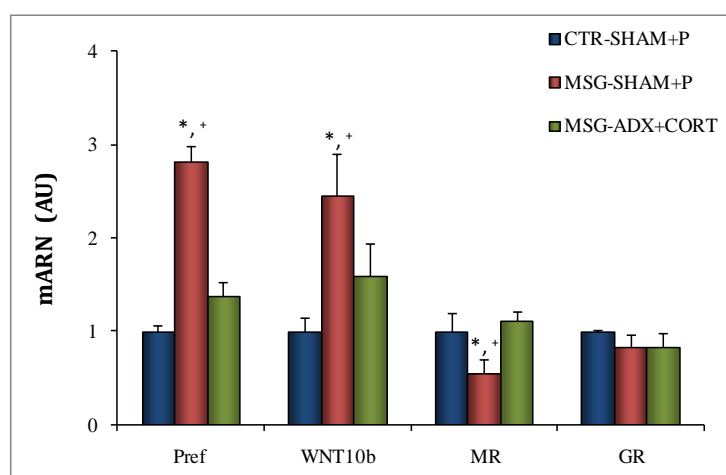


**Figura 19: A)** Porcentaje de diferenciación al día 10, en cultivos CTR SHAM+P, MSG SHAM+P y MSG ADX+CORT. **B)** Grados de maduración de células diferenciadas de los mismos grupos al día 10 de cultivo. I, II y III corresponden a los grados de maduración desde el de menor diferenciación al de mayor, respectivamente. n=4 experimentos. Valores  $\pm$  EEM. \*p<0,05 vs CTR SHAM+P, + p<0,05 vs MSG ADX+CORT.

No se encontraron diferencias significativas para los grupos en los valores medidos del Grado II (**Figura 19, B**). Estos datos estarían indicando que las células provenientes de los animales MSG ADX+CORT habrían recuperado su potencial de diferenciación, normalizando los porcentajes de maduración medidos a los valores del grupo CTR SHAM+P, y revirtiendo el retraso observado en las células MSG SHAM+P.

### Estudio de diversos marcadores en las células de la FEV

Luego de corroborar la recuperación de la capacidad adipogénica en estadios terminales de diferenciación de las células del grupo MSG ADX+CORT, se continuó con el estudio de las células provenientes de la FEV de dichos animales. Para ello se analizó la expresión de diversos marcadores pro- y anti-adipogénicos en las células contenidas en FEV. Las determinaciones realizadas mostraron que los factores anti-adipogénicos estudiados (Pref-1 y Wnt10b) disminuyeron sus niveles a los valores encontrados para las células del grupo CTR SHAM+P, siendo significativamente menores que los encontrados para el grupo MSG SHAM+P.

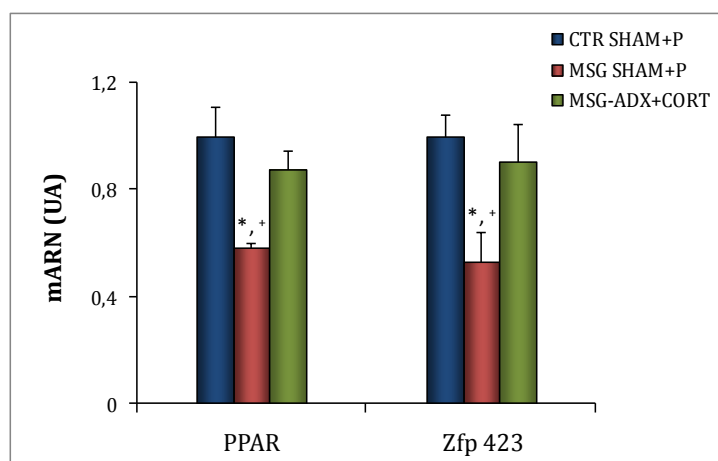


**Figura 20:** Niveles de expresión de los ARNm de Pref-1, Wnt-10b, MR y GR en células de la FEV de ratas macho de los distintos grupos experimentales. Valores expresados en Unidades Arbitrarias (UA). n=4 experimentos. Valores  $\pm$  EEM. \* $p < 0,05$  vs CTR SHAM+P, +  $p < 0,05$  vs MSG ADX+CORT.

Al analizar los niveles de ARNm de los factores pro-adipogénicos (MR y GR) se encontró el mismo perfil de expresión para los grupos CTR SHAM+P y MSG ADX+CORT. Al compararlos con el grupo MSG SHAM+P, este último presentó un menor nivel en el valor para MR y no se encontraron diferencias en el valor de GR (**Figura 20**).



Finalmente, y para completar el análisis de expresión de los marcadores de la FEV, se estudió la expresión de PPAR $\gamma$ 2 y Zfp423. Los resultados mostraron niveles similares de expresión para ambos parámetros en los grupos CTR SHAM+P y MSG ADX+CORT, siendo ambos mayores a los encontrados para el grupo MSG SHAM+P (**Figura 21**). Estos resultados indicarían que las células de la FEV de los animales con niveles de CORT normalizados recuperaron el potencial de diferenciación adipocitaria que había sido disminuido por los efectos del tratamiento con MSG.



**Figura 21:** Niveles de expresión de los ARNm de PPAR $\gamma$ 2 y Zfp423 en células de la FEV de ratas macho de los distintos grupos experimentales. Valores expresados en Unidades Arbitrarias (UA). n=4 experimentos. Valores  $\pm$  EEM. \*p<0,05 vs CTR SHAM+P, + p<0,05 vs MSG ADX+CORT

## Modelo de SM por consumo de una DRF.

### Modelo DRF a 3 semanas.

#### Características generales.

El modelo de administración de fructosa en el agua de bebida (10 % p/v durante 3 semanas) fue previamente utilizado en nuestro laboratorio como un modelo de SM. Por esta razón se realizaron medidas plasmáticas y medidas antropométricas para corroborar el establecimiento del fenotipo ya descrito. Como se puede observar en la **Tabla 1**, los animales DRF presentaron mayores niveles circulantes de LEP e INS, sin mostrar cambios en el peso corporal y en las otras hormonas determinadas. Los niveles circulantes de Glu fueron normales, sin embargo se encontraron valores de TG plasmáticos elevados.

|                           | CTR            | DRF            |
|---------------------------|----------------|----------------|
| <b>Peso corporal (gr)</b> | 308,03 ± 15,08 | 326,32 ± 12,41 |
| <b>LEP (ng/mL)</b>        | 2,48 ± 0,18    | 3,98 ± 0,48*   |
| <b>CORT (µg/dL)</b>       | 8,56 ± 1,72    | 9,69 ± 1,39    |
| <b>INS (ng/mL)</b>        | 1,57 ± 0,18    | 2,29 ± 0,15*   |
| <b>Glu (g/L)</b>          | 0,89 ± 0,05    | 0,92 ± 0,06    |
| <b>TG (g/L)</b>           | 1,05 ± 0,14    | 1,67 ± 0,15 *  |

**Tabla 1:** Peso corporal y valores plasmáticos medidos en animales CTR y DRF de 81 días de vida. n=15 animales por grupo experimental. Valores ± EEM. \*p<0,05 vs CTR.

#### Características del TARP.

Como se puede observar en la **Tabla 2**, la ingesta de una DRF durante 3 semanas indujo un aumento en la masa de TARP, que fue significativo aún al ser corregido por el peso corporal de los animales. Con respecto al recuento celular de la FEV no se encontraron diferencias, así como tampoco al corregir este valor por la masa del TARP.

|                                      | CTR               | DRF                |
|--------------------------------------|-------------------|--------------------|
| <b>Masa de TARP (gr)</b>             | 3,27 ± 0,28       | 4,28 ± 0,21**      |
| <b>TARP/ 100 gr de peso corporal</b> | 0,86 ± 0,06       | 1,10 ± 0,04**      |
| <b>Recuento celular total FEV</b>    | 892.000 ± 129.866 | 1.092.353 ± 93.419 |
| <b>Cél/ gr TARP</b>                  | 294.646 ± 39.781  | 258.804 ± 23.219   |

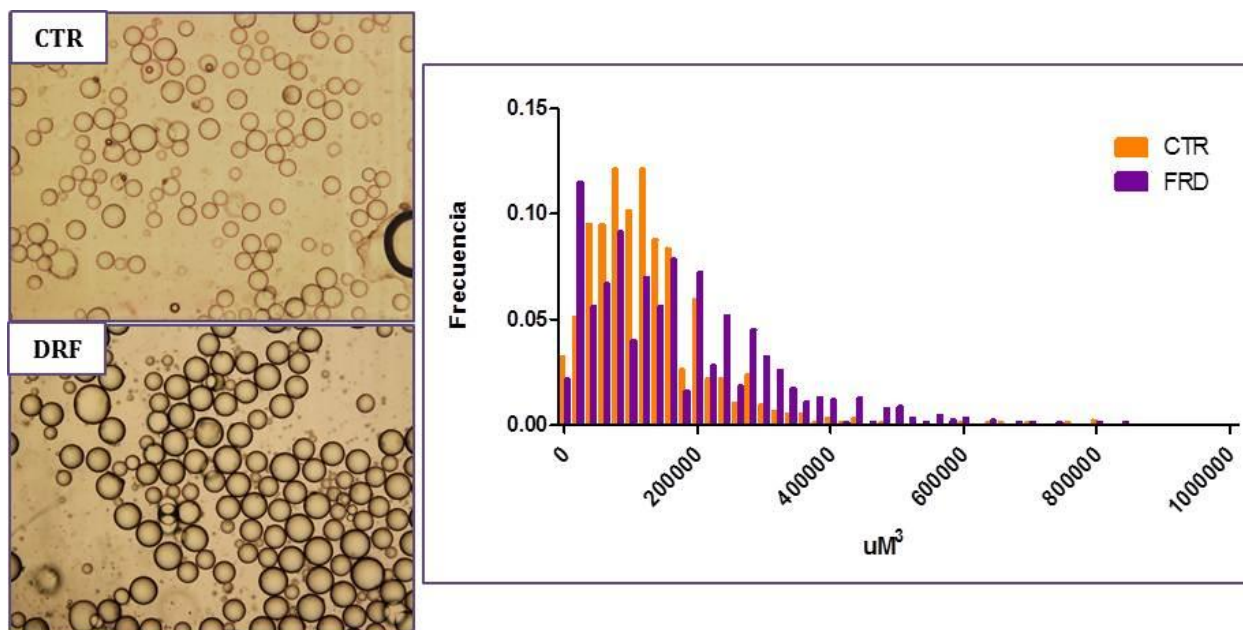
**Tabla 2:** Parámetros de caracterización del TARP de animales CTR y DRF de 81 días de vida. n=15 animales por grupo experimental. Valores ± EEM. \*\*p<0,01 vs CTR.

Luego de corroborar que el consumo de fructosa por 3 semanas generaba un aumento en la masa de TARP, el siguiente paso fue evaluar la posible contribución de la hipertrofia celular a dicho aumento. Para ello se cuantificaron el radio y el volumen de las células adiposas en suspensión (**Tabla 3**), pudiendo corroborarse un aumento en el tamaño celular en el grupo DRF.

|                                    | CTR                   | DRF                      |
|------------------------------------|-----------------------|--------------------------|
| <b>Radio de adipocitos (µm)</b>    | 34,28 ± 0,31          | 38,94 ± 0,41*            |
| <b>Volumen de adipocitos (µm³)</b> | 132.681,33 ± 9.389,31 | 185.883,779 ± 13.412,72* |

**Tabla 3:** Valores de radios y volúmenes de adipocitos en suspensión de animales CTR y DRF. n=4 experimentos por grupo. Valores ± EEM. \*p<0,01 vs CTR.

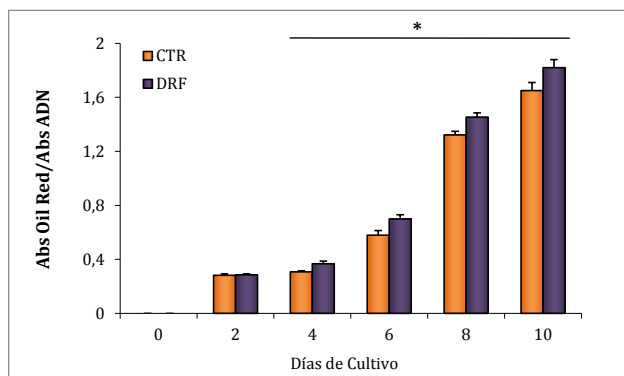
Al analizarse la distribución de tamaños de los adipocitos se pudo observar un corrimiento del valor de volumen celular hacia mayores tamaños en los adipocitos DRF con respecto a los adipocitos CTR (**Figura1**, derecha), indicando la presencia de hipertrofia adipocitaria en el TARP de los animales DRF.



**Figura 1:** Imágenes representativas de adipocitos en suspensión de ratas macho CTR (arriba) y DRF (abajo) de 81 días vida. En el panel de la derecha se muestra la distribución de adipocitos según su volumen.

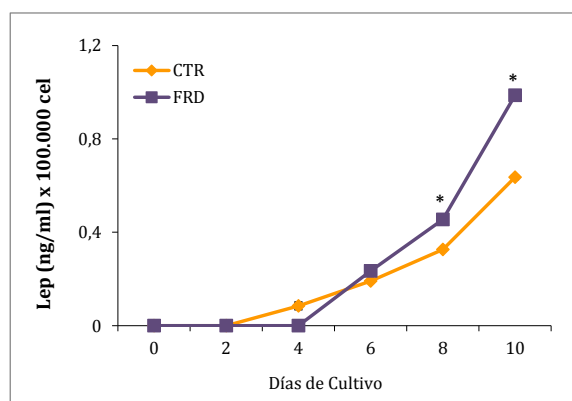
### Parámetros de diferenciación adipocitaria *in vitro*.

Posteriormente al análisis *in vivo* realizado para corroborar el establecimiento del fenotipo, el siguiente paso fue analizar la capacidad adipogénica de las células de la FEV proveniente del TARP. Como primer parámetro de diferenciación se evaluó el contenido intracelular de lípidos, cuantificándose cada 48 hs desde el día 0 y hasta el día 10 post-diferenciación. Como puede observarse en la **Figura 2**, el almacenamiento de lípidos comenzó a ser evidente, en ambos grupos de células, después de las 48 hs del agregado de la mezcla de diferenciación (día 2). Las células provenientes de los animales DRF presentaron una mayor acumulación de lípidos intracelulares desde el día 4 y hasta el día 10 de cultivo, siendo este aumento significativo durante todo el período.



**Figura 2:** Contenido intracelular de lípidos de adipocitos diferenciados *in vitro* de los animales CTR y DRF. n=4 experimentos por grupo. Valores  $\pm$  EEM. \* $p < 0,05$  vs CTR.

Continuando con el análisis del proceso de diferenciación *in vitro*, el siguiente parámetro que se cuantificó fue la liberación de LEP al medio cultivo por los adipocitos en diferenciación. Para ello se monitoreó la secreción de dicha hormona desde el día de agregado de la mezcla de diferenciación (día 0) hasta el día 10 de cultivo. De esta manera, la secreción comenzó a ser detectable al día 4 de cultivo para las células CTR y al día 6 para las células DRF (**Figura 3**). A pesar de esta diferencia inicial, durante los días posteriores de cultivo las células DRF presentaron una mayor liberación de LEP al medio, siendo significativamente diferente en los días terminales del mismo, con respecto a las células CTR.

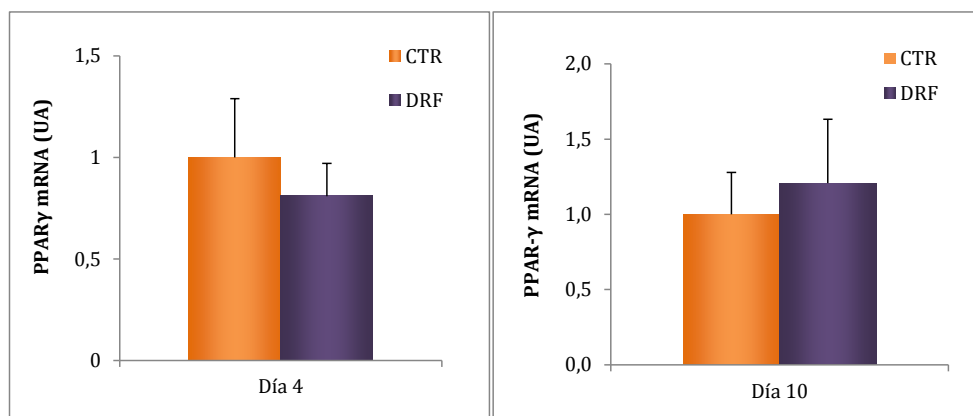


**Figura 3:** Liberación de LEP al medio de cultivo por parte de los adipocitos CTR y DRF. n=4 experimentos por grupo. Valores  $\pm$  EEM. \* $p < 0,05$  vs CTR.

### Análisis de marcadores adipogénicos *in vitro*.

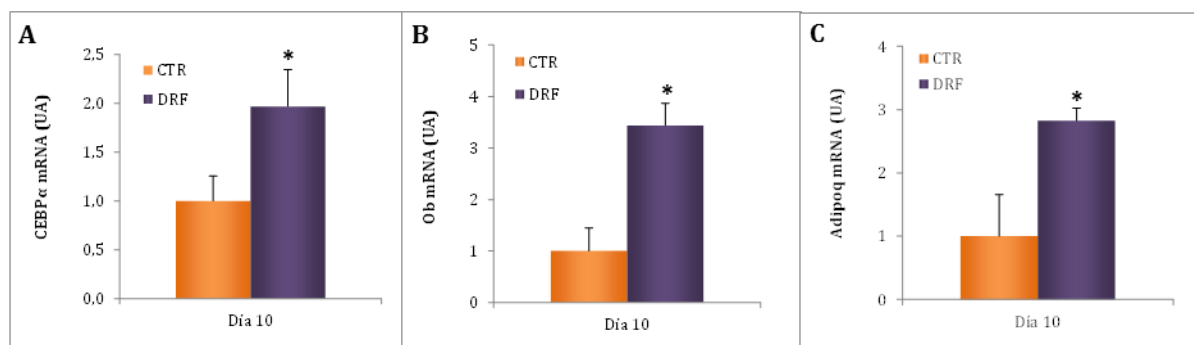
Continuando con el estudio de la capacidad adipogénica *in vitro*, se analizó el patrón de expresión de diversos marcadores de diferenciación en distintos días de cultivo. El primer marcador cuantificado fue PPAR  $\gamma 2$  por su rol regulador en el proceso de diferenciación. A diferencia de los días elegidos para la cuantificación de este marcador en el modelo MSG 60 días,

sólo se realizó la cuantificación en un día intermedio de cultivo (d4), donde se encontró el pico de expresión, y en el día de finalización del cultivo (d10). De esta manera, como se puede observar en la **Figura 4** los niveles de este factor no presentaron diferencias significativas entre las células DRF y CTR en ninguno de los días analizados.

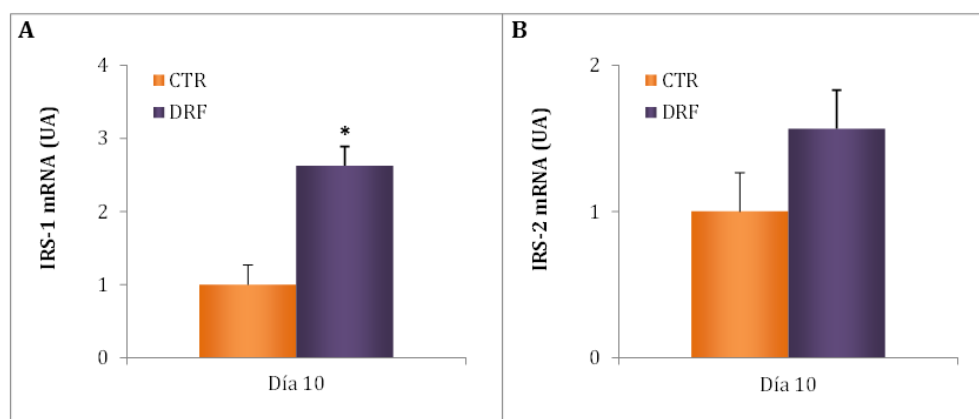


**Figura 4:** Niveles de ARN mensajero de PPAR $\gamma$ 2 en células CTR y DRF expresados en Unidades Arbitrarias (UA) al día 4 y 10 de cultivo. n=4 experimentos. Valores  $\pm$  EEM. \* $p < 0,05$  vs CTR del mismo día.

Continuando con el análisis de marcadores de diferenciación se determinaron también los niveles de expresión de C/EBP $\alpha$ , así como también de los genes de dos adipocinas secretadas por los adipocitos maduros. En este caso el análisis se centró en la etapa terminal del proceso de diferenciación (día 10), donde los niveles de expresión de estos marcadores nos indicaron el estado final de las células diferenciadas. Así pudo observarse que los niveles de C/EBP $\alpha$  fueron mayores en el grupo DRF (**Figura 5, Panel A**). De la misma manera, los niveles de ARNm de Ob y Adipoq en las células adiposas DRF, mostraron un aumento que fue significativo con respecto al CTR para ambos genes (**Figura 5, Panel B y C**, respectivamente).



**Figura 5:** Niveles de ARN mensajero de C/EBPα (A), Ob (B) y Adipoq (C) en células CTR y DRF expresados en Unidades Arbitrarias (UA) al día 10 de cultivo. n=4 experimentos. Valores  $\pm$  EEM. \*p<0,05 vs CTR.

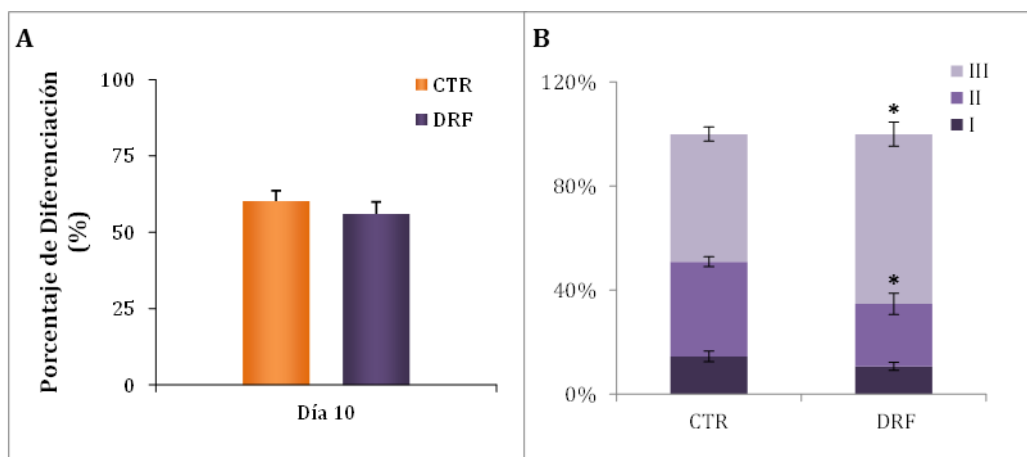


**Figura 6:** Niveles de ARN mensajero de IRS-1 (Panel A) e IRS-2 (Panel B) en células CTR y DRF expresados en Unidades Arbitrarias (UA) al día 10 de cultivo. n=4 experimentos. Valores  $\pm$  EEM. \*p<0,05 vs CTR.

Teniendo en cuenta que una de las características fundamentales de los adipocitos maduros es la captación de glucosa en respuesta a insulina, se cuantificaron los niveles de expresión de dos moléculas clave de la cascada de señalización de insulina, como son IRS-1 e IRS-2. Se observó que las células DRF presentaron un aumento en los niveles de expresión de IRS-1 con respecto a las células CTR al día 10 de cultivo (**Figura 6, Panel A**). En el caso de IRS-2 no se encontraron diferencias significativas entre ambos grupos celulares (**Figura 6, Panel B**). En vista de todos los resultados obtenidos, se podría afirmar que la ingesta de fructosa generó un aumento en la capacidad de diferenciación de las células de la FEV.

### Análisis del grado de avance del proceso de diferenciación *in vitro*.

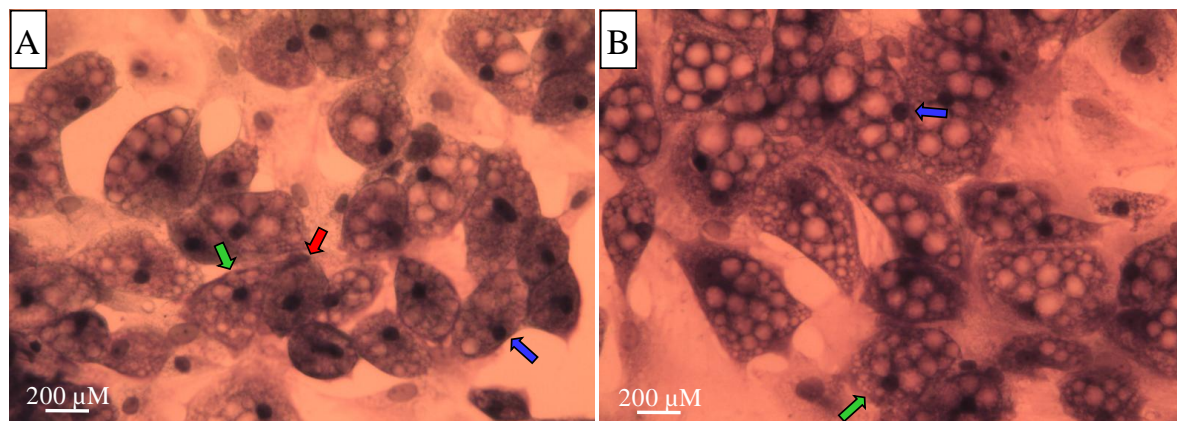
Luego del análisis realizado en distintos parámetros del proceso de diferenciación, se evaluó específicamente el porcentaje de células diferenciadas al día final de cultivo (día 10).



**Figura 7: A)** Porcentaje de diferenciación al día 10, en cultivos CTR y DRF. **B)** Grados de maduración de células diferenciadas CTR y DRF al día 10 de cultivo. I, II y III corresponden a los grados de maduración desde el de menor diferenciación al de mayor, respectivamente. n=4 experimentos. Valores  $\pm$  EEM. \*p<0,05 vs CTR.

Como puede observarse en la **Figura 7 (Panel A)**, no se encontraron diferencias significativas en dicho porcentaje entre ambos grupos de células. Sin embargo, al analizar los grados de maduración, teniendo en cuenta para esto el desplazamiento del núcleo desde su posición central en el estado indiferenciado, se pudo distinguir un aumento en el porcentaje de células en el estado de maduración más avanzado (grado III) en el grupo DRF con respecto al CTR (**Figura 7, Panel B**). Al analizar los restantes estadios de maduración pudo observarse que el grupo DRF presentaba menores porcentajes de células en los niveles de maduración menos avanzados (grado I y II), siendo significativamente diferente en el grado II y presentando una tendencia en el grado I (**Figura 7, Panel B**). Esto estaría indicando que si bien las células del grupo DRF no presentan un aumento en el número de células diferenciadas, una mayor cantidad de aquellas que lo están se encuentran en etapas más avanzadas del proceso. Este aumento estaría relacionado con los cambios observados en los parámetros de diferenciación previamente analizados.

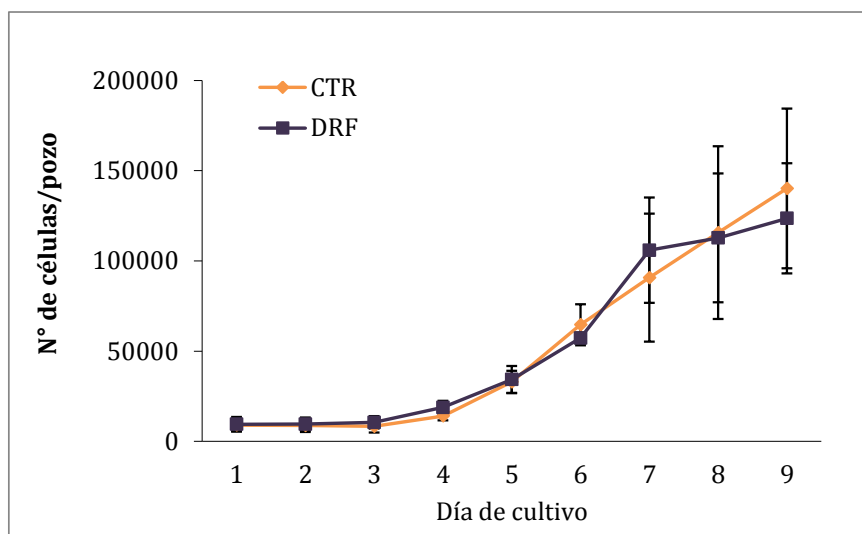




**Figura 8:** Fotos representativas de los distintos grados de maduración en células CTR (A) y células DRF (B). Las flechas indican células en los tres grados de maduración analizados según la posición del núcleo: Grado I: núcleo central (rojo); Grado II: núcleo parcialmente desplazado (verde); Grado III: núcleo completamente periférico, adyacente a la membrana (azul). Amplificación 40X.

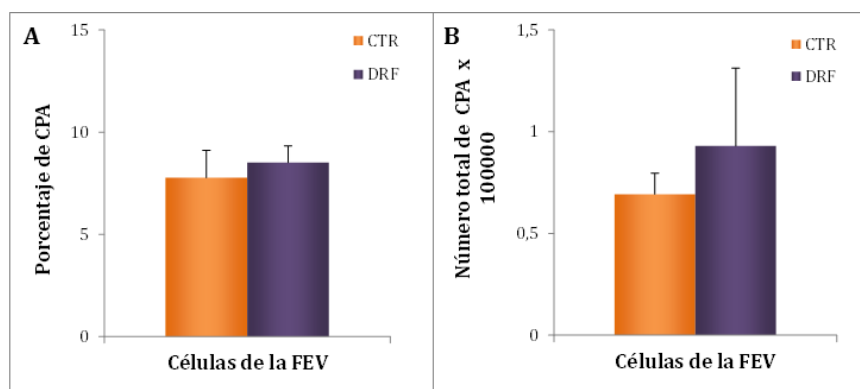
### Caracterización de las células de la FEV.

Luego de realizar el análisis de la capacidad adipogénica de las células de la FEV, y teniendo en cuenta que las células DRF presentaron una mayor capacidad de diferenciación, el siguiente paso fue estudiar el estado de las células presentes en dicha fracción. En primer lugar se evaluó la capacidad de proliferación de las células de la FEV, registrando recuentos celulares cada 24 hs de cultivo. Como puede observarse en la **Figura 9** ambos grupos de células presentaron el mismo patrón de proliferación, sin mostrar diferencias significativas en el número de células en ninguno de los días de cultivo.

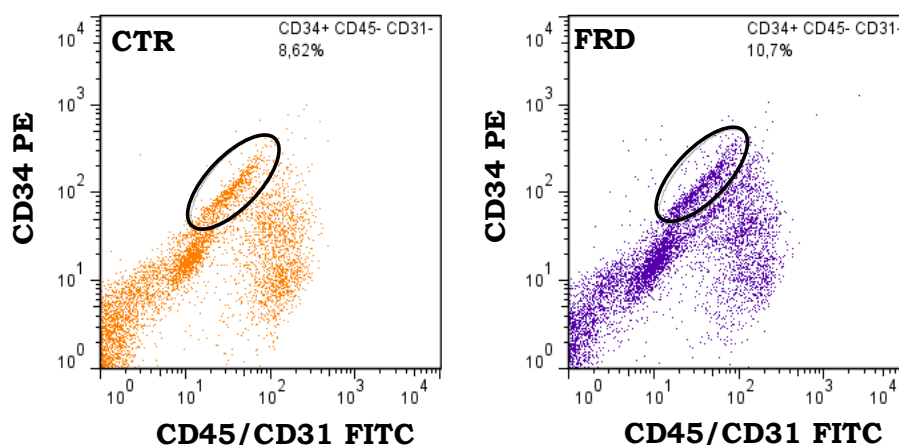


**Figura 9:** Curva de proliferación de las células de FEV de los grupos CTR y DRF. Valores  $\pm$  EEM.  $n=4$  experimentos.

Para continuar se determinó el número de CPAs presentes en la FEV de los animales DRF. Como se puede observar en la **Figura 10**, no se encontraron diferencias en el porcentaje ni en el número total de CPA presentes en la FEV. De manera representativa se muestran los gráficos obtenidos para cada uno de los grupos celulares al ser analizados por citometría de flujo (**Figura 11**). Este resultado indicaría que los cambios en la diferenciación no responderían a cambios en el número de células precursoras, por lo tanto resultó necesario evaluar el estado de competencia de dichas células.



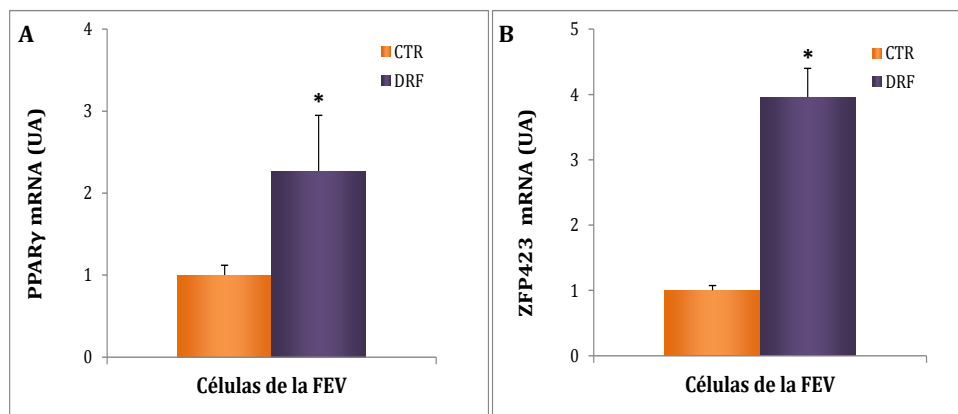
**Figura 10:** A) porcentaje de CPA en la FEV de los grupos CTR y DRF; B) número total de CPA presente en la FEV del TARP de ambos grupos experimentales. Valores  $\pm$  EEM. n= 3 experimentos por grupo.



**Figura 11:** Gráficos representativos del grupo CTR y DRF (izquierda y derecha, respectivamente) del análisis realizado por citometría de flujo. En negro (elipse) se indica la población CPA identificada según el patrón de marcación CD34+CD31-CD45-.

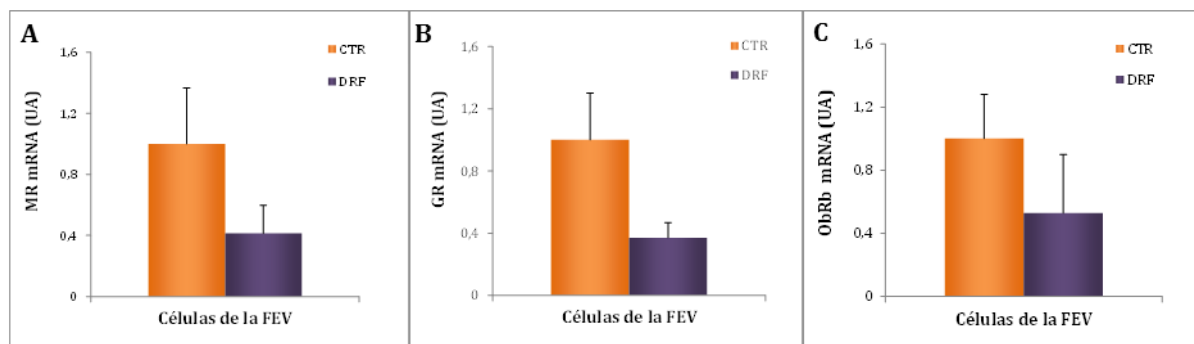
Para ello se cuantificaron los niveles de expresión de dos marcadores de competencia adipocitaria: PPAR $\gamma$ 2 y Zfp423, pudiéndose observar que las células de la FEV de los animales del grupo DRF presentaron mayores niveles de expresión de ambos marcadores en comparación con las células CTR (**Figura 12**). Teniendo en cuenta el resultado obtenido en el análisis por citometría de flujo se podría afirmar que, si bien no hay una diferencia en la cantidad de CPAs presentes en la FEV de los animales DRF, estas células expresan un mayor

nivel de marcadores de competencia, que las haría más sensibles a diferenciarse. Esto explicaría en parte el incremento encontrado en la capacidad de diferenciación en las células DRF.

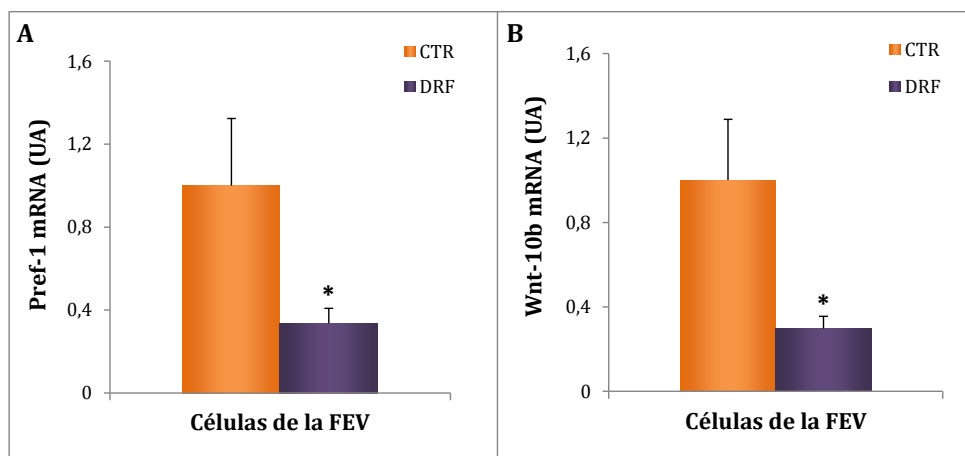


**Figura 12:** Niveles de expresión de los ARNm de PPAR $\gamma$ 2 (**A**) y Zfp423 (**B**) en células de la FEV de ratas macho CTR y DRF. Valores expresados en Unidades Arbitrarias (UA). n=4 experimentos. Valores  $\pm$  EEM. \*p<0,05 vs CTR.

Continuando con la caracterización de las células de la FEV se evaluaron los niveles de expresión de diversos factores que intervienen en el proceso adipogénico, modulando de manera positiva o negativa el pasaje de los precursores hacia el fenotipo adipocitario. Para ello se determinaron, en primer lugar los niveles de expresión de tres receptores hormonales, MR, GR y ObRb, involucrados en la acción de las respectivas hormonas en el proceso adipogénico. De esta manera se pudo observar que las células de la FEV del grupo DRF no presentaron diferencias significativas en la expresión de dichos receptores, lo que indicaría que el aumento en la capacidad adipogénica no respondería a cambios en la sensibilidad a LEP o GCs (**Figura 13**).



**Figura 13:** Niveles de expresión de los ARNm de MR (A), GR (B) y ObRb (C) en células de la FEV de ratas macho CTR y DRF. Valores expresados en Unidades Arbitrarias (UA). n=4 experimentos. Valores  $\pm$  EEM.



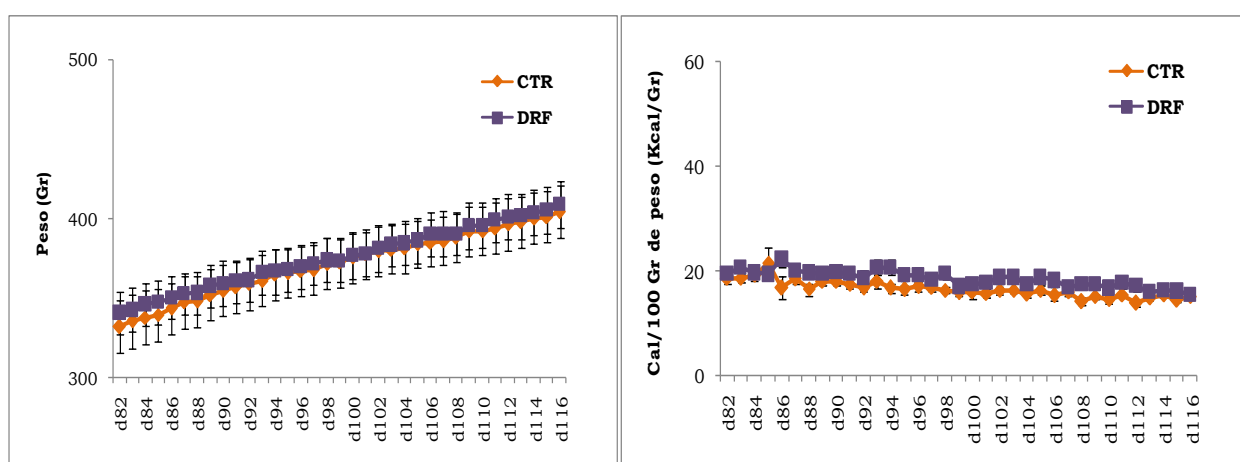
**Figura 14:** Niveles de expresión de los ARNm de Pref-1 (A) y Wnt-10b (B) en células de la FEV de ratas macho CTR y DRF. Valores expresados en Unidades Arbitrarias (UA). n=4 experimentos. Valores  $\pm$  EEM. \*p<0,05 vs CTR.

De la misma manera se determinó la expresión de Pref-1 y Wnt10b en las células de la FEV de ambos grupos de animales. Así pudo observarse que las células del grupo DRF presentaron menores niveles de ambos marcadores anti-adipogénicos (**Figura 14**). Esta disminución explicaría en parte la mayor capacidad de diferenciación que presentan las células DRF, haciendo que sean más susceptibles al estímulo de diferenciación.

## Modelo DRF de 8 semanas.

### Características generales.

Dado que el modelo de ocho semanas de consumo de fructosa no había sido anteriormente estudiado se realizó un seguimiento diario en el peso y en las calorías ingeridas durante el período de tratamiento que no había sido previamente registrado (de 3 a 8 semanas). Como puede observarse los animales de ambos grupos no presentaron diferencias en el aumento de peso, así como tampoco en las calorías consumidas (**Figura 1**).



**Figura 1:** Peso y calorías consumidas corregidas por peso corporal en animales CTR y DRF desde el día 81 al 116 días de vida. n=15 animales por grupo experimental. Valores  $\pm$  EEM.

Se cuantificaron también diversos parámetros plasmáticos, así como también el peso corporal de los animales al día experimental. Estos resultados fueron útiles para conocer el estado metabólico general de los animales y establecer si presentaban una desmejora o mantenían únicamente las alteraciones encontradas en el modelo a 3 semanas. Como puede observarse en la **Tabla 1** no hubo cambio en el peso corporal, aunque se mostró una tendencia de aumento en los animales que ingirieron fructosa. Con respecto a los valores plasmáticos, tanto LEP como INS y TG mostraron un claro aumento, sin mostrarse diferencias en CORT y Glu.

|                           | CTR            | DRF            |
|---------------------------|----------------|----------------|
| <b>Peso corporal (gr)</b> | 391,68 ± 10,54 | 405,05 ± 10,95 |
| <b>LEP (ng/mL)</b>        | 5,34 ± 0,68    | 9,39 ± 1,66*   |
| <b>CORT (µg/dL)</b>       | 11,96 ± 1,12   | 9,80 ± 0,81    |
| <b>INS (ng/mL)</b>        | 1,70 ± 0,23    | 2,71 ± 0,18*   |
| <b>Glu (g/L)</b>          | 1,25 ± 0,02    | 1,27 ± 0,04    |
| <b>TG (g/L)</b>           | 1,14 ± 0,08    | 2,22 ± 0,15*   |

**Tabla 1:** Peso corporal y valores plasmáticos medidos en animales CTR y DRF de 116 días de vida. n=15 animales por grupo experimental. Valores ± EEM. \*p<0,05 vs CTR.

### Características del TARP

En los animales DRF 8 semanas se cuantificó la masa de distintos depósitos de TA de la cavidad abdominal. También se determinó el número total de células de la FEV del TARP y se normalizó por la masa de TARP obtenida (**Tabla 2**). Como puede observarse los animales DRF presentaron un aumento en la masa de TARP y TAE, sin mostrar diferencias en el valor de TAPR con respecto a los animales CTR. Al ser normalizados estos valores cada 100 gr de peso corporal se mantuvieron las diferencias. El recuento celular total de la FEV no arrojó diferencias entre ambos grupos, así como tampoco al ser corregido por la masa de TARP.

|                                      | CTR                    | DRF                      |
|--------------------------------------|------------------------|--------------------------|
| <b>Masa de TARP (gr)</b>             | 3,92 ± 0,29            | 5,30 ± 0,51*             |
| <b>Masa de TAPR (gr)</b>             | 0,28 ± 0,03            | 0,36 ± 0,05              |
| <b>Masa de TAE (gr)</b>              | 2,62 ± 0,17            | 3,66 ± 0,32*             |
| <b>TARP/ 100 gr de peso corporal</b> | 1,02 ± 0,05            | 1,28 ± 0,09*             |
| <b>TAPR/ 100 gr de peso corporal</b> | 0,07 ± 0,01            | 0,09 ± 0,01              |
| <b>TAE/ 100 gr de peso corporal</b>  | 0,67 ± 0,03            | 0,91 ± 0,06*             |
| <b>Recuento celular total FEV</b>    | 1.163.750 ± 134.803    | 1.498.750 ± 166.506      |
| <b>Cél/ gr TARP</b>                  | 273.793,81 ± 33.144,87 | 292.476,67 ± 38.470,2598 |

**Tabla 2:** Parámetros de caracterización de los distintos depósitos de TA de animales CTR y DRF de 116 días de vida. n=15 animales por grupo experimental. Valores ± EEM. \*p<0,05 vs CTR.

Debido a que el TARP fue el depósito seleccionado para los estudios *in vitro*, se continuó con la caracterización del mismo, evaluando en primer lugar el tamaño de los adipocitos en suspensión. Este parámetro fue relevante al momento de definir si existía hipertrofia celular del

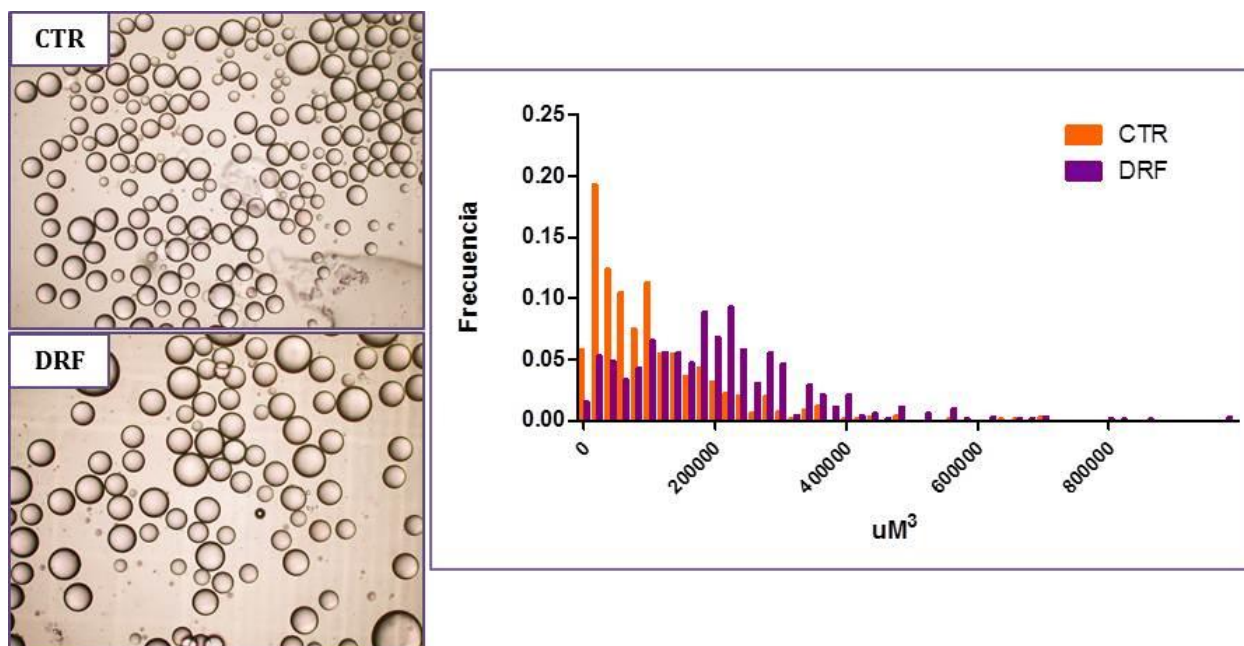
TARP, como ocurría en el modelo de DRF a las 3 semanas. De esta manera como puede observarse en la **Tabla 3**, los adipocitos del TARP del grupo DRF presentaron un mayor tamaño, reflejado en el aumento tanto del radio como del volumen celular.

|   | CTR                  | DRF                   |
|---|----------------------|-----------------------|
| <b>Radio de adipocitos (<math>\mu\text{m}</math>)</b>     | 34,62 $\pm$ 0,31     | 38,68 $\pm$ 0,34*     |
| <b>Volumen de adipocitos (<math>\mu\text{m}^3</math>)</b> | 127.395 $\pm$ 18.491 | 212.479 $\pm$ 7.135** |

**Tabla 3:** Valores de radios y volúmenes de adipocitos en suspensión de animales CTR y DRF. n=4 experimentos por grupo. Valores  $\pm$  EEM. \*p<0,05, \*\*p<0,001 vs CTR.

Por otra parte, resultó importante analizar la distribución de tamaños de los adipocitos para poder identificar que componentes de la expansión estaban presentes en esta etapa. Con respecto a esto se pudo observar la presencia de dos poblaciones celulares en el TARP de los animales DRF, una de mayor tamaño (**Figura 2**, derecha), y otra de adipocitos más pequeños, presumiblemente nuevos, generados por la activación de la hiperplasia. De manera representativa se muestran imágenes de los adipocitos de ambos grupos (**Figura 2**, izquierda).

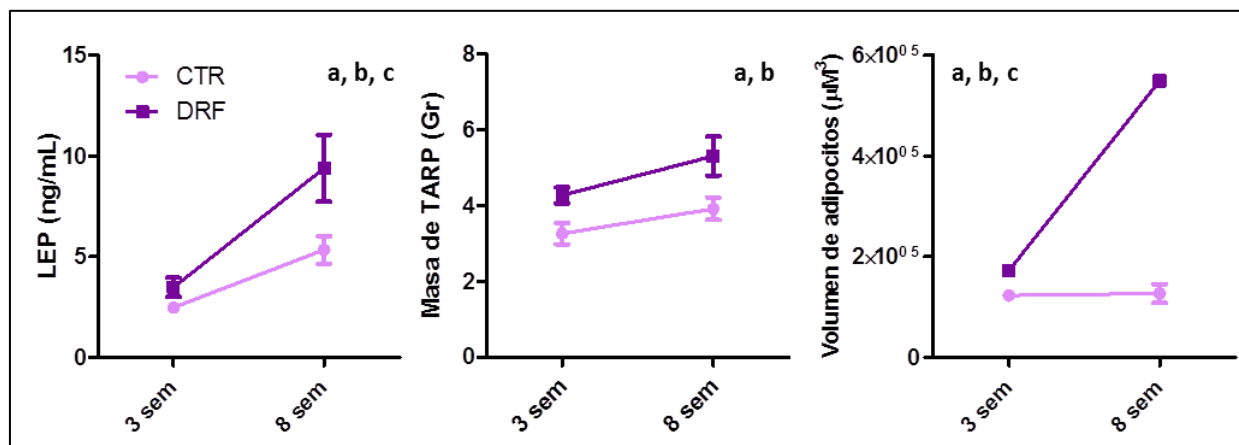




**Figura 2:** Imágenes representativas de adipocitos en suspensión de ratas macho CTR (arriba) y DRF (abajo) de 116 días vida. En el panel de la derecha se muestra la distribución de adipocitos según su volumen.

### Comparación de parámetros metabólicos de las ratas DRF.

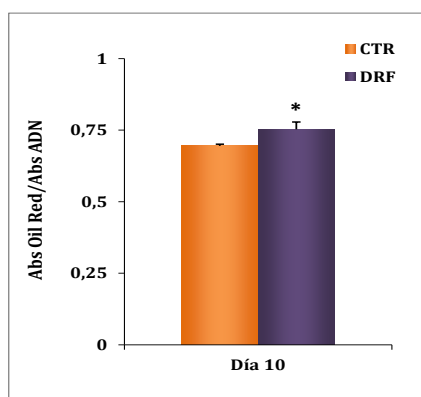
Como se realizó para los resultados de los animales MSG, luego de corroborar el efecto de la ingesta de fructosa en los dos períodos estudiados, evaluamos el efecto global de la edad, de la DRF y de su posible interacción sobre los distintos parámetros metabólicos medidos. En este caso pudimos observar que la edad afectó a la mayor parte de los parámetros, excepto los niveles de INS y CORT. Por otra parte encontramos que el consumo de fructosa afectaba todos los parámetros con excepción de los niveles de Glu y CORT, corroborando lo que ya habíamos encontrado para cada período por separado. Por último pudimos determinar que la hipertrofia adipocitaria y los niveles de LEP circulantes sufrieron un efecto sinérgico de la edad y del tratamiento. Dado que los valores de la masa de TARP no se vieron afectados por la interacción de ambas variables, se podría suponer que la desmejora de la función adipocitaria de los animales DRF de 8, estaría relacionada principalmente con el aumento del tamaño adipocitario y no con el aumento de la masa del TARP (**Figura 3**).



**Figura 3:** Comparación de los parámetros metabólicos, masa del TARP y volumen de adipocitos de las ratas CTR y DRF luego de 3 y 8 semanas de ingesta. Resultados del análisis estadístico ANOVA (dos vías), donde **a**, representa aquellos parámetros afectados por la edad, **b**, aquellos afectados por el tratamiento y **c**, los afectados por la interacción entre ambos.

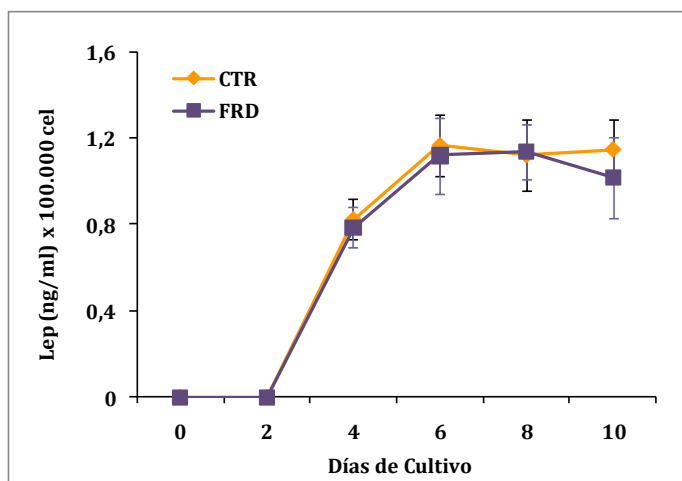
### Parámetros de diferenciación adipocitaria *in vitro*.

Luego de establecer las alteraciones impartidas por la DRF *in vivo*, lo siguiente fue evaluar el probable efecto sobre la capacidad adipogénica *in vitro* de los precursores adipocitarios. Para ello se comenzó evaluando algunos parámetros de diferenciación adipocitaria. En primer lugar se eligió el contenido intracelular de lípidos y como se puede observar en la **Figura 3** las células provenientes del TARP de los animales DRF presentaron una mayor acumulación de lípidos al día 10 post-diferenciación.



**Figura 3:** Contenido intracelular de lípidos, determinado por la técnica Oil Red O, en adipocitos diferenciados *in vitro* de los animales CTR y DRF. n=4 experimentos por grupo. Valores  $\pm$  EEM. \* $p < 0,05$  vs CTR.

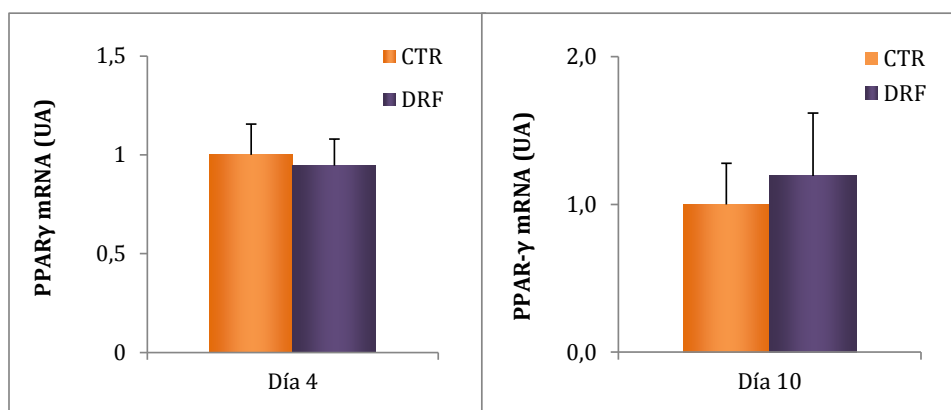
Continuando con el estudio del proceso de diferenciación se determinó la liberación de LEP, que fue monitoreada cada 48 hs durante todo el período de cultivo. Así, como se muestra en la **Figura 4**, los niveles de LEP comenzaron a ser detectables al día 4 para ambos grupos celulares, y durante todo el cultivo el perfil de secreción resultó similar para las células DRF y CTR



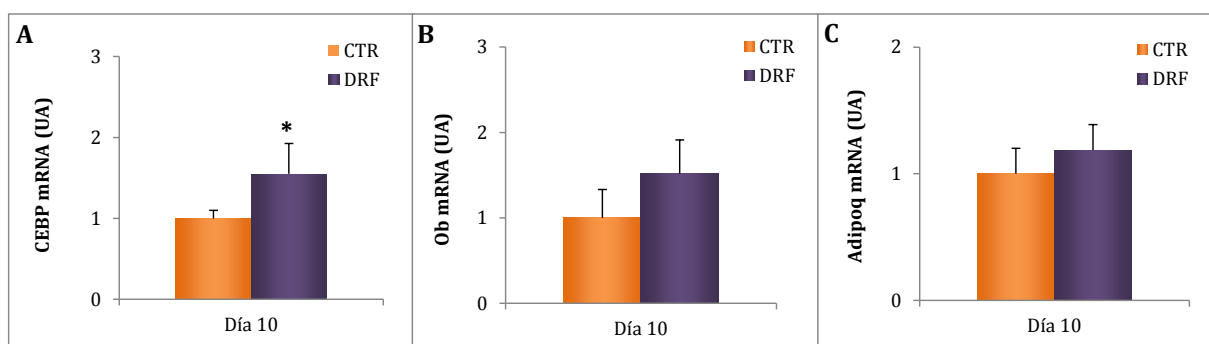
**Figura 4:** Liberación de LEP al medio de cultivo por parte de los adipocitos CTR y DRF. n=4 experimentos por grupo. Valores  $\pm$  EEM.

### Análisis de marcadores adipogénicos *in vitro*.

Luego de analizar *in vitro* dos de los parámetros más representativos a nivel funcional, el siguiente paso fue determinar los niveles de expresión de diversos factores de transcripción y de otros marcadores característicos del fenotipo adipocitario maduro. El primer marcador elegido fue PPAR $\gamma$ 2, para el cual los resultados mostraron que ambos grupos celulares presentaron niveles de expresión similares en los dos días estudiados (**Figura 5**). De la misma manera se determinaron los niveles de expresión de C/EBP $\alpha$ , Ob y Adipoq al día 10 de cultivo. Los resultados mostraron un aumento en los niveles de ARNm de C/EBP $\alpha$  en las células del grupo DRF con respecto a las células CTR (**Figura 6, Panel A**), mientras que los valores de Ob y Adipoq no presentaron diferencias (**Figura 6, Paneles B y C**, respectivamente). Estos resultados indicarían que las células DRF diferenciadas *in vitro* presentarían cambios parciales en los marcadores que intervienen en el proceso de diferenciación, algunos de ellos sustentarían la idea de un aumento en la capacidad adipogénica *in vitro*.

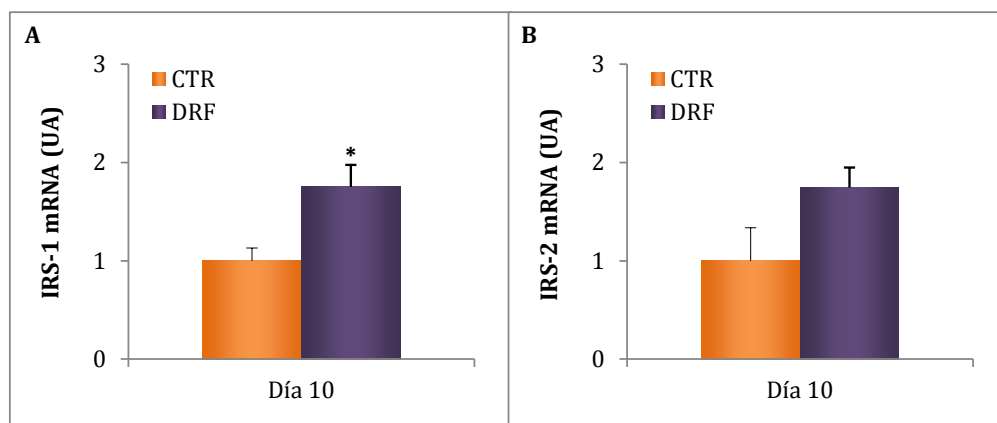


**Figura 5:** Niveles de ARN mensajero de PPAR $\gamma$ 2 en células del grupo CTR y DRF expresados en Unidades Arbitrarias (UA) al día 4 y 10 de cultivo. n=4 experimentos. Valores  $\pm$  EEM.



**Figura 6:** Niveles de ARN mensajero de C/EBP $\alpha$  (A), Ob (B) y Adipoq (C) en células CTR y DRF expresados en Unidades Arbitrarias (UA) al día 10 de cultivo. n=4 experimentos. Valores  $\pm$  EEM. \*p<0,05 vs CTR.

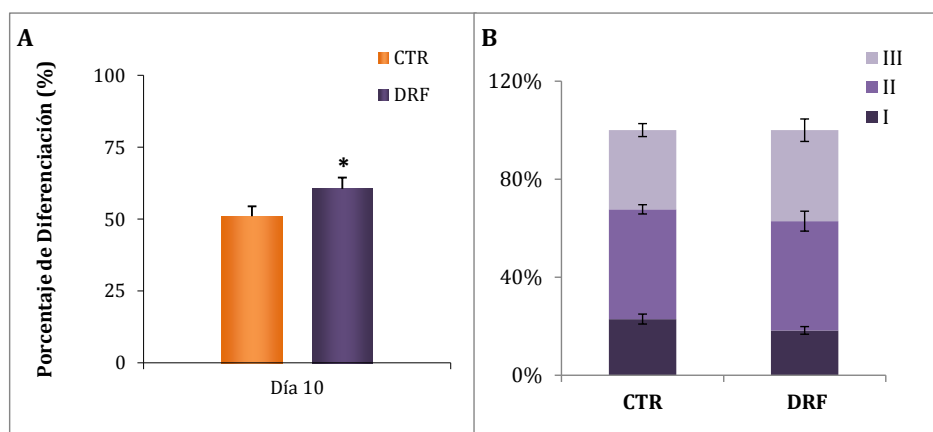
Finalizando con el análisis de expresión de marcadores a día 10 de cultivo, esta vez se determinaron los niveles de ARNm de dos componentes de la vía de señalización de INS, como son IRS-1 e IRS-2. La expresión de IRS-1 fue mayor para las células DRF, sin encontrarse diferencias para el caso de IRS-2 (**Figura 7, Paneles A y B**, respectivamente).



**Figura 7:** Niveles de ARN mensajero de IRS-1 (Panel A) e IRS-2 (Panel B) en células CTR y DRF expresados en Unidades Arbitrarias (UA) al día 10 de cultivo. n=4 experimentos. Valores  $\pm$  EEM. \* $p < 0,05$  vs CTR.

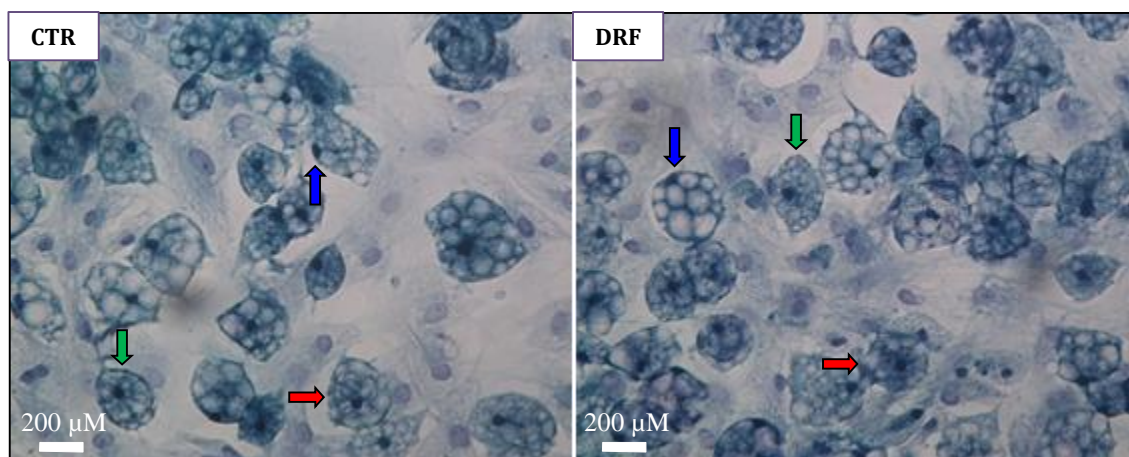
### Análisis del grado de avance del proceso de diferenciación *in vitro*.

Finalmente, como último parámetro del proceso de diferenciación, se determinó el porcentaje de células diferenciadas al día 10 de cultivo. En la **Figura 8 (Panel A)** se muestran los resultados para este parámetro, donde se puede observar que las células del grupo DRF presentaron un porcentaje de diferenciación mayor que el grupo CTR.



**Figura 8: A)** Porcentaje de diferenciación al día 10, en cultivos CTR y DRF. **B)** Grados de maduración de células diferenciadas CTR y DRF al día 10 de cultivo. I, II y III corresponden a los grados de maduración desde el de menor diferenciación al de mayor, respectivamente. n=4 experimentos. Valores  $\pm$  EEM. \* $p < 0,05$  vs CTR

Este hallazgo resultó particularmente importante, ya que permitió definir claramente que existía un aumento en la capacidad adipogénica *in vitro* de las células DRF.

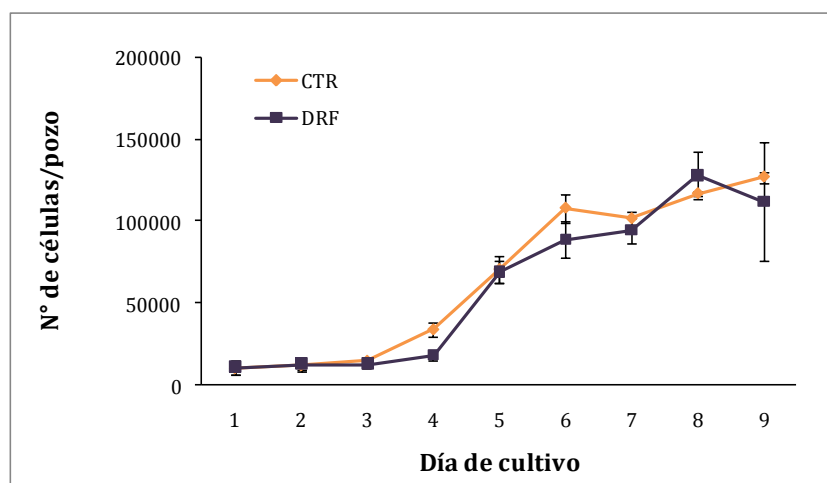


**Figura 9:** Fotos representativas de los distintos grados de maduración en células CTR (Panel A) y células DRF (Panel B). Las flechas indican células en los tres grados de maduración analizados según la posición del núcleo: Grado I: núcleo central (rojo); Grado II: núcleo parcialmente desplazado (verde); Grado III: núcleo completamente periférico, adyacente a la membrana (azul). Amplificación 40X.

Luego de establecer este aumento en el porcentaje de diferenciación, lo siguiente fue determinar el grado de maduración de las células diferenciadas de ambos grupos, para poder distinguir si la velocidad del proceso adipogénico presentaba alguna alteración. Así se pudo observar que el avance en el proceso de diferenciación era similar tanto para las células DRF como para las células CTR, presentando el mismo perfil de grados de maduración (**Figura 8, Panel B**). De esta manera se pudo determinar que, si bien existe un mayor número de las células diferenciadas en el grupo DRF, lo que indica una mayor capacidad adipogénica, estas células no presentan una mayor velocidad de maduración.

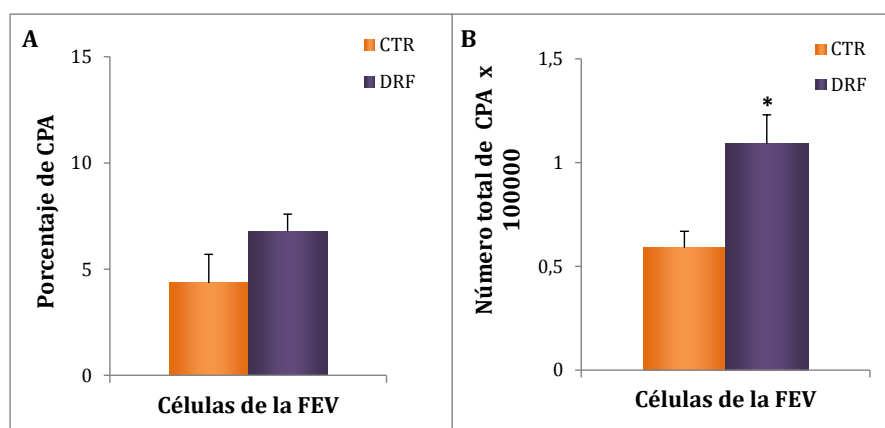
### Caracterización de las células de la FEV.

Como primer parámetro se comenzó determinando la capacidad de proliferación de las células de la FEV. Como muestra la **Figura 10** ambos grupos celulares presentaron un ritmo de crecimiento similar, sin mostrar diferencias en ninguno de los días ensayados.



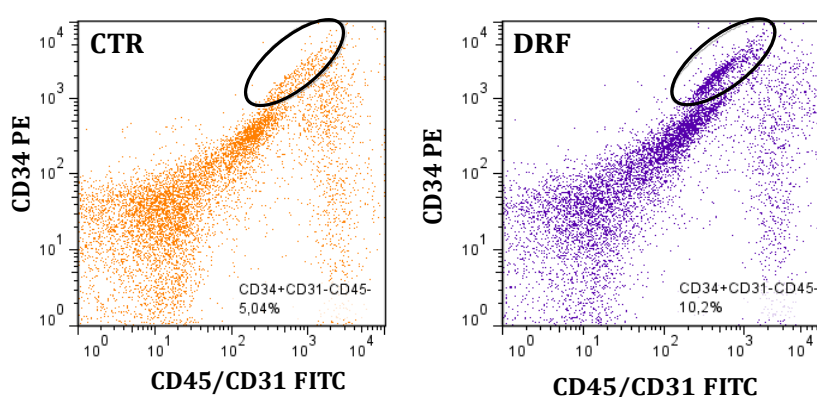
**Figura 10:** Curva de proliferación de las células de FEV de los grupos CTR y DRF. Valores  $\pm$  EEM.  $n=4$  experimentos.

La cuantificación del número de CPA presentes en la FEV de cada uno de los grupos experimentales, fue necesaria para poder establecer si las diferencias encontradas en la capacidad adipogénica se debían a un mayor número de precursores.. Para ello se realizó un análisis por citometría de flujo que permitió determinar el número total de CPA y el porcentaje de las mismas en la FEV del TARP de ambos grupos. Como puede observarse en la **Figura 11 (Panel A)** el grupo CTR y el grupo DRF presentaron porcentajes similares de CPA. Sin embargo, al calcular el número total de CPA presentes en el TARP, los animales DRF mostraron un valor mayor de células con respecto al CTR (**Figura 11, Panel B**). Esta variación en el número de precursores podría aportar una explicación al aumento del porcentaje de diferenciación encontrado *in vitro* al día 10, así como también a los otros parámetros de diferenciación que se mostraron aumentados en el grupo DRF.



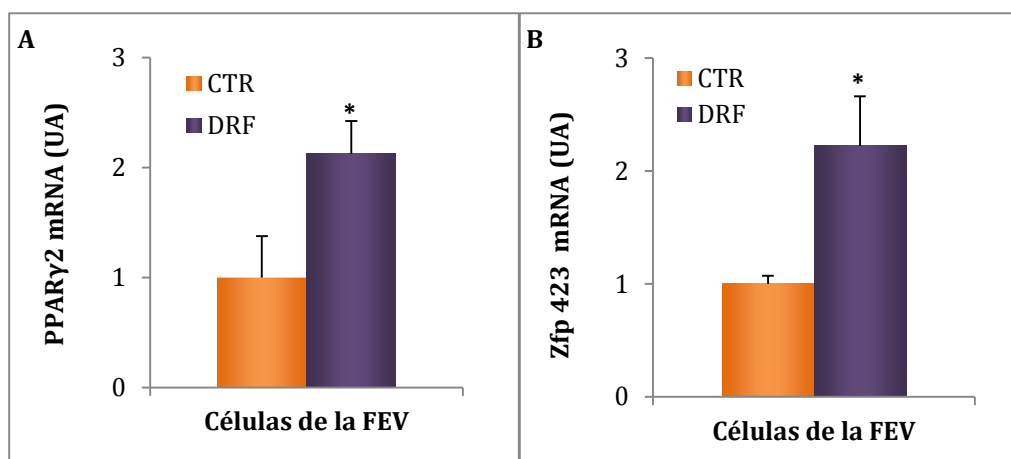
**Figura 11:** **A)** porcentaje de CPA en la FEV de los grupos CTR y DRF; **B)** número total de CPA presente en la FEV del TARP de ambos grupos experimentales. n=3 experimentos. Valores  $\pm$  EEM. \*p<0,05 vs CTR.

Luego de determinar que existía una diferencia en el número de CPA, el siguiente paso fue establecer si las células de la FEV presentaban diferencias en la expresión PPAR $\gamma$ 2 y de Zfp423. De esta manera, como puede observarse, las células del grupo DRF presentaron mayores niveles de expresión de PPAR  $\gamma$ 2 y Zfp423 que las células CTR (**Figura 13, Paneles A y B**, respectivamente). Esto indicaría que, el tratamiento con fructosa generaría un aumento en la competencia de las células precursoras que las haría más susceptibles a la diferenciación adipocitaria.



**Figura 12:** Gráficos representativos del grupo CTR y DRF (izquierda y derecha, respectivamente) del análisis realizado por citometría de flujo. En negro (elipse) se indica la población CPA identificada según el patrón de marcación CD34+CD31-CD45-.

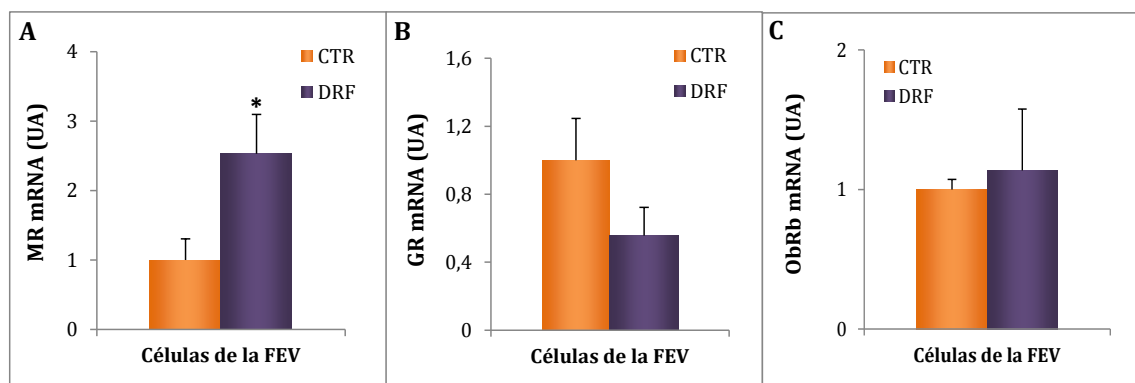




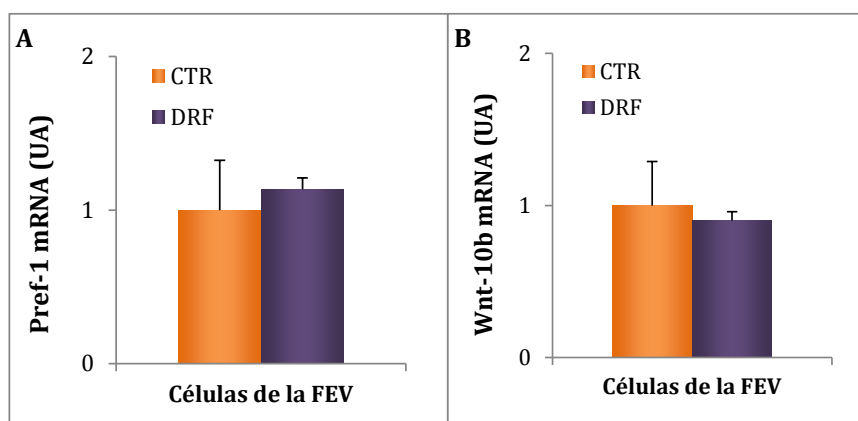
**Figura 13:** Niveles de expresión de los ARNm de PPAR  $\gamma$ 2 (**A**) y Zfp423 (**B**) en células de la FEV de ratas macho CTR y DRF. Valores expresados en Unidades Arbitrarias (UA). n=4 experimentos. Valores  $\pm$  EEM. \*p<0,05 vs CTR.

Continuando con el análisis de marcadores, se determinaron las expresiones de distintos marcadores pro- y anti-adipogénicos. En primer medida se cuantificaron los niveles de expresión de tres receptores que intervienen en el proceso adipogénico, como son MR, GR y ObRb. Como puede observarse los niveles de ARNm del primer receptor fueron mayores en las células DRF, sin encontrarse diferencias significativas en GR ni en ObRb (**Figura 14, Paneles A, B y C** respectivamente). Este resultado reforzaría la idea de que las células DRF presentarían una mayor capacidad de respuesta al estímulo adipogénico de los GCs.

Finalmente se analizaron los niveles de ARN mensajero de dos factores anti-adipogénicos como Pref-1 y Wnt10b. Como se puede observar en la **Figura 15**, no se encontraron diferencias para ninguno de los dos marcadores en las células de los animales DRF.



**Figura 14:** Niveles de expresión de los ARNm de MR (A), GR (B) y ObRb (C) en células de la FEV de ratas macho CTR y DRF. Valores expresados en Unidades Arbitrarias (UA). n=4 experimentos. Valores  $\pm$  EEM. \* $p < 0,05$  vs CTR.



**Figura 15:** Niveles de expresión de los ARNm de Pref-1 (A) y Wnt-10b (B) en células de la FEV de ratas macho CTR y DRF. Valores expresados en Unidades Arbitrarias (UA). n=4 experimentos. Valores  $\pm$  EEM.

## DISCUSIÓN

## Consideraciones generales

Desde hace algunas décadas, con la aparición de determinadas alteraciones y patologías relacionadas al aumento de peso, el estudio del proceso de expansión del Tejido adiposo se convirtió en objeto de numerosas investigaciones. Sin embargo el mecanismo de este proceso está lejos de ser completamente entendido y existen determinados paradigmas que actualmente están siendo discutidos y revisados. En especial, la expansión del TA en situaciones de sobrepeso u obesidad y su relación con la secuencia de eventos por la que contribuye a la generación de alteraciones metabólicas son dos temas controversiales y de los que aún no se conoce mucho.

Históricamente se consideró al aumento de la masa de TA *per se*, como el componente perjudicial para la salud en aquellas patologías relacionadas al aumento de peso. Sin embargo, la aparición de individuos obesos metabólicamente sanos <sup>117</sup> constituyó un punto de quiebre de esta concepción y generó una nueva perspectiva en la cual la **naturaleza de la expansión** del TA se postuló como el protagonista principal. De esta manera comenzó a prestarse principal importancia a las dos contribuciones que pueden tener lugar durante este proceso: la hiperplasia o adipogénesis (generación de nuevos adipocitos) y la hipertrofia (aumento de tamaño de los adipocitos existentes). Actualmente se plantea que la cinética de expansión del TA contaría con distintas etapas en las cuales se podrían combinar ambas contribuciones <sup>72</sup>. La hipótesis más aceptada es la que postula una secuencia donde se atraviesa una hipertrofia inicial, luego ocurriría una combinación de ambas contribuciones y finalmente una inhibición de la adipogénesis y el predominio de la hipertrofia con las consecuentes alteraciones.

De esta manera se podría postular así a la hiperplasia del TA como un componente saludable en el proceso de expansión, ya que permitiría la generación de nuevas células

adiposas donde almacenar el exceso energético (en forma de lípidos), evitando la aparición de adipocitos hipertróficos, que representaría un estado más desfavorable. Si el proceso adipogénico se inhibiera, como se ha visto que ocurre en determinados fenotipos de obesidad <sup>118</sup>, el exceso de lípidos se distribuiría entre un menor número de células, las cuales alcanzarían en algún momento su capacidad límite de almacenamiento. Si esto ocurre, y el balance energético positivo continúa, los lípidos que ya no pueden ser almacenados en su lugar original lo empezarían a hacer en otros compartimentos del organismo, como el hígado, los músculos, etc, generándose así una acumulación ectópica de lípidos con el consiguiente detrimento que esto genera <sup>119</sup>.

Si bien estas hipótesis comienzan a cobrar importancia dentro del campo científico, todavía se mantiene la idea original de que la adipogénesis es un proceso perjudicial para la salud, por contribuir al aumento de la masa de TA. Por esta razón, y con el objetivo de contribuir al conocimiento de este fenómeno, el primer interrogante que surgió como parte de este trabajo de Tesis fue conocer que ocurría en el proceso de expansión de dicho tejido en dos modelos de SM. El interés principal radicó en el rol fundamental que podrían jugar la hiperplasia y la hipertrofia en la patogénesis y evolución de dicho síndrome. En particular se estudiaron dos modelos de SM, uno inducido por manipulación dietaria (alto consumo de fructosa) y otro caracterizado por el aumento de los niveles de GCs circulantes. Ambos modelos se estudiaron en dos etapas del desarrollo de la patología, lo que permitió profundizar en la cinética de expansión del TA, aportando nuevos conocimientos a este campo de estudio.

### **Modelo de Síndrome Metabólico con elevados glucocorticoides.**

Anteriormente, tanto nuestro grupo de trabajo así como otros autores, han descripto las diversas alteraciones metabólicas que desarrollan los animales MSG y que hacen que presenten un fenotipo similar al de SM en humanos. Una de las particularidades de estos animales, es el aumento crónico de GCs, acompañado del incremento de la masa de TA; situación similar a la encontrada en el Síndrome de Cushing y no en la obesidad, donde los niveles de GCs suelen estar normales. Sin embargo, a pesar de los numerosos estudios que abordan la importancia de los GCs en la expansión del TA, no se encuentra resuelta aún la incógnita acerca de que ocurre con la capacidad adipogénica ante el aumento crónico de la actividad biológica de los GCs.

Como se dijo anteriormente, una de las características fundamentales de los animales MSG es que presentan un incremento en la masa de TA en la cavidad abdominal, rasgo que les confiere un fenotipo particular de obesidad central <sup>61</sup>. El TARP es uno de los depósitos de mayor contribución a la masa total de TA abdominal en roedores, y nuestros resultados mostraron un aumento significativo del TARP tanto a edad prepuberal como a edad adulta, que, fue acompañado por el incremento, del tamaño de los adipocitos de este depósito. Tanto la masa como la hipertrofia celular fue mayor a edad adulta, hecho que se pudo observar al comparar la distribución de tamaños adipocitarios de los grupos MSG y se corroboró mediante el análisis estadístico de interacción de variables. Esta progresión de la hipertrofia coincide con las alteraciones encontradas en edades más avanzadas (90-120 días de vida), donde se encontró un patrón de adipoquinas empeorado, obesidad más acentuada <sup>63,64</sup>, al mismo tiempo que una hipertrofia mayor <sup>120</sup>. Sin embargo, a pesar de conocerse que la hipertrofia es en parte responsable de la acumulación excesiva de TA en estos animales, no se conoce si

el componente hiperplásico está presente, así como tampoco la naturaleza y temporalidad de las contribuciones en dicha expansión, y su posible relación con las alteraciones metabólicas del modelo, lo que será discutido posteriormente.

La hipertrofia adipocitaria en general ha sido ampliamente relacionada con diversas alteraciones metabólicas, siendo la insulino-resistencia periférica una de las más ampliamente descritas <sup>121</sup>. Con respecto a esto, los animales MSG presentaron niveles de insulina normales, mostrando una tendencia de aumento a los 60 días, sin llegar a ser significativa. Sin embargo a edades más avanzadas estos animales presentan hiperinsulinemia <sup>120</sup> y disminución en la sensibilidad a la insulina <sup>122</sup>, que coincide con el mayor tamaño adipocitario y con el desmejoramiento metabólico general. Cabe destacar que los niveles de adiponectina elevados encontrados en los animales MSG de 60 días, podrían en parte responder a un efecto compensatorio previo a este estado de insulino-resistencia, teniendo en cuenta los efectos insulino-sensibilizantes atribuidos a esta adipoquina <sup>123,124</sup>.

Otro rasgo característico del modelo MSG es la hiperleptinemia, presente desde edades tempranas y que, como observamos en nuestros resultados, se acentúa con la progresión del fenotipo. Los niveles de LEP se han correlacionado con la masa total de TAB, específicamente con el tamaño de los adipocitos <sup>125</sup> y por lo tanto en estados de obesidad dichos niveles están aumentados, como pudimos corroborarlo en nuestro modelo. Sin embargo, se ha observado que en patologías con aumento de TAV se genera un estado de leptino-resistencia central, que conlleva a una falta de acción de la misma <sup>126</sup> y aunque el mecanismo no ha sido completamente dilucidado, se sabe que en el mismo intervienen estructuras hipotalámicas <sup>127</sup>. Por otra parte, en resultados previos de nuestro laboratorio, se mostró la resistencia a esta hormona a nivel adrenal <sup>128</sup>. Si

este fenómeno pudiese extenderse a otros tejidos periféricos <sup>129</sup>, como el TA se podría suponer una disminución en los mecanismos autócrinos normales. Teniendo en cuenta los efectos que LEP posee sobre la expansión del TA <sup>130</sup>, no sería extraño suponer que sea en parte responsable de la anormal expansión del TARP encontrada en estos animales, hecho que se discutirá más adelante.

Una de las alteraciones más importantes y atractivas del modelo MSG, para nuestro estudio, es el aumento de GCs circulantes, que está presente desde etapas tempranas del desarrollo de los animales MSG (30 días) y se mantiene a lo largo de la vida de los mismos. Este aumento está relacionado con algunas de las alteraciones metabólicas que se manifiestan en el fenotipo MSG, especialmente con el aumento del TAV <sup>63,120</sup>. La relación entre GCs y la expansión del TA es conocida desde hace tiempo. Así, estudios realizados en las ratas obesas Zucker, mostraron que la adrenalectomía con sustitución exógena de bajas concentraciones de GCs evitaba la acumulación de TAV. Además, cuando las dosis de sustitución aumentaban, los depósitos de TAV (retroperitoneal y parametrial) también lo hacían y los adipocitos presentaban mayor tamaño <sup>131</sup>.

En seres humanos, se ha demostrado que los niveles sistémicos de cortisol en individuos con obesidad son normales o incluso bajos <sup>132,133</sup>, sin embargo en el Síndrome de Cushing existe un incremento de los depósitos de TAV que le confiere la característica típica de obesidad central de esta patología <sup>134</sup>. En relación al aumento sistémico de GCs también se ha descrito una correlación positiva entre los valores de diámetro de cintura (TAV) y una desregulación del eje HHA (con aumento de secreción de cortisol) en individuos sometidos a estrés <sup>135</sup>. Estos antecedentes, sumados a los ya detallados para los modelos animales, sustentan fuertemente el efecto que poseen los GCs en la acumulación de TAV, mostrando principalmente un efecto sobre la hipertrofia



adipocitaria. Sin embargo, hasta el momento no se ha descrito completamente como se llegaría a ese estado de aumento de TAV, ni cuáles serían los efectos de la presencia crónica de los GCs sobre el proceso y la naturaleza del mismo.

Por esta razón resultó de interés el estudio del proceso de expansión del TA en distintos estadios, haciendo principal hincapié en el estado de las células precursoras. El estado de la adipogénesis *in vitro* de las células de la FEV en dos períodos del desarrollo del fenotipo (30 y 60 días de vida), resultaría fundamental para determinar la activación o inhibición de la contribución hiperplásica, y el análisis de los adipocitos maduros nos aportaría información sobre que contribuciones estarían presentes *in vivo*. De esta manera podríamos determinar los efectos de los GCs en los distintos períodos de la expansión del TARP.

De esta manera, el estudio del proceso de diferenciación *in vitro* de las células de la FEV fue el primer paso para poder evaluar el potencial adipogénico de dichas células. Así, al analizar la capacidad de diferenciación de las células de la FEV de los animales MSG a edad prepuberal, se pudo observar un aumento en la misma, reflejado en el aumento de los parámetros analizados. En primer lugar, la acumulación de lípidos intracelulares y la secreción de LEP, dos de las características fundamentales de los adipocitos maduros, fueron mayores en las células MSG en el período terminal. De manera interesante, al analizar estos parámetros en las células MSG de los animales a edad adulta, se encontró que ambos valores resultaron menores en estas células. En los dos casos la secreción de LEP fue un reflejo de la expresión del gen *Ob*, la cual fue mayor en las células de los animales de 30 días y menor en los animales adultos en la etapa terminal de cultivo. Estas variaciones serían consecuencia, en parte, de las variaciones encontradas en la expresión de dos de los factores de transcripción que regulan y orquestan el desarrollo

del fenotipo adipocitario: PPAR $\gamma$ 2 y C/EBP $\alpha$  <sup>136,137</sup>. Se ha estudiado ampliamente el efecto de ambos factores en la expresión de Ob, de las enzimas involucradas en el metabolismo lipídico, así como también en la captación de glucosa estimulada por insulina en los adipocitos <sup>138-141</sup>. Así, el aumento de los parámetros de diferenciación observados en los adipocitos de los animales de 30 días, fue concordante con un aumento en la expresión de ambos factores de transcripción; y ocurrió lo contrario para las células de los animales adultos, que presentaron menores niveles de ambos factores de transcripción a lo largo de todo el período de maduración.

Adicionalmente a las alteraciones encontradas en los parámetros de diferenciación analizados, se encontró que un mayor porcentaje de células provenientes de los animales MSG de 30 días se diferenciaban frente al estímulo adipogénico, invirtiéndose este fenómeno cuando se trataba de las células de los animales adultos. Además las células que se diferenciaban lo hacían llegando a mayores estados de maduración en primer el caso, mientras que cuando se trataba de las células del TARP de los animales adultos ocurría lo contrario, aumentando el número de células en estadios más inmaduros. En conjunto, estos resultados indicarían que el proceso adipogénico, en los animales más jóvenes, estaría activado, mientras que en los animales de edad más avanzada presentaría un grado de inhibición.

Es importante tener en cuenta que cualquier alteración observada sobre la diferenciación *in vitro* es consecuencia de algún efecto sobre las CPAs contenidos en la FEV del TARP. Esto es así ya que, dichas células fueron las únicas que estuvieron en contacto con el ambiente alterado presente *in vivo*, y que luego de aisladas fueron analizadas en condiciones equivalentes a sus respectivos controles. Es decir que, tanto la activación en la adipogénesis observada en los animales de 30 días como la inhibición

observada en los animales adultos, sería un reflejo de posibles cambios sufridos por las CPAs. Esto podría explicarse como el resultado de un mayor o menor número de CPAs presentes en la FEV de los grupos estudiados, y/o de un potencial adipogénico diferencial de dichas células.

Para poder determinar cuál de estos dos fenómenos o si ambos eran los responsables de los cambios en la capacidad adipogénica, como primera instancia se decidió determinar el número de CPAs presentes en la FEV del TARP de los animales de ambas edades. Como se mencionó anteriormente la FEV está compuesta por una mezcla de poblaciones celulares, dentro de las cuales se encuentran las CPAs. Existen diversas estrategias para la identificación de dichas células, que se basan principalmente en la presencia o ausencia de marcadores de superficie <sup>82,83,142</sup>. Dentro de los marcadores estudiados en las CPAs, se ha sugerido que CD34 es el que aporta mayor información con respecto a la determinación adipocitaria de las células de la FEV, distinguiendo entre aquellas células con capacidad adipogénica, CD34+, y aquellas que no, CD34- <sup>143</sup>. Si bien existen estrategias utilizadas que pretenden un mayor refinamiento en la identificación de las CPAs, pareciera que la dupla CD34+/CD31- define una población con fuertes características adipogénicas *in vitro* <sup>143,144</sup>. Dentro de la FEV del TARP de los animales estudiados, donde se utilizó como estrategia de inmunomarcación el patrón CD34+CD31-CD45-, no se encontraron diferencias en el porcentaje de CPAs en ninguna de las dos edades estudiadas. Esto indicaría que el número de células precursoras no sería el factor que estaría determinando un aumento o disminución de la diferenciación *in vitro*, por lo tanto una posible explicación podría subyacer en la sensibilidad de los precursores a responder a los estímulos de diferenciación, lo que generaría una capacidad adipogénica distinta.

Esto nos condujo a estudiar dos componentes fundamentales que marcan el grado de competencia de las células precursoras. Desde hace algunos años se ha identificado a la proteína Zfp423 como un regulador de la expresión de PPAR $\gamma$ 2, actuando como co-activador de las proteínas Smad y amplificando las acciones pro-adipogénicas de PPAR $\gamma$ 2<sup>87</sup>. Así, Zfp423 y PPAR $\gamma$ 2<sup>86</sup> han sido recientemente aceptados como los factores que determinan un mayor grado de sensibilidad de dichos precursores a diferenciarse hacia adipocitos, proponiéndose como marcadores de preadipocitos<sup>143</sup>. Sin embargo, cabe destacar que hasta el momento no se ha llegado a un consenso con respecto a un marcador que defina de manera inequívoca a los preadipocitos. Con respecto a esto, nuestros resultados indican que las células de la FEV aisladas de los animales tratados con MSG a edad adulta poseen menores niveles de expresión de ambos factores. Esto explicaría, en parte, una menor sensibilidad de estas células frente al estímulo adipogénico, lo que se traduciría en los menores parámetros de diferenciación encontrados *in vitro*. Por otra parte los precursores provenientes de animales juveniles presentaron un comportamiento opuesto, que concuerda con la mayor capacidad adipogénica mostrada. Por lo tanto, teniendo en cuenta que el número total de CPAs en la FEV del TARP de estos animales no presentó cambios, en ninguna de las edades estudiadas, la expresión diferencial de los factores de competencia en las células de la FEV sería el fenómeno con mayor peso al momento de explicar las variaciones en la capacidad de diferenciación encontradas *in vitro*.

En este punto no debe dejarse de lado el efecto de los diversos factores pro- y anti-adipogénicos que actúan en los primeros pasos del proceso de diferenciación, cuyas variaciones también podrían contribuir a la explicación de las alteraciones encontradas. En primer lugar, las células precursoras del TA requieren la supresión/represión tanto

de Pref-1 como de Wnt10b, ambos factores anti-adipogénicos, para poder atravesar el proceso de diferenciación <sup>98,145,146</sup>, siendo los GCs y los elevados niveles de AMPc capaces de inhibir estas señales <sup>147,148</sup>. Con respecto a esto, nuestros resultados mostraron que las células de los animales adultos mostraron mayores niveles de expresión de Pref-1 y de Wnt10b, y se diferenciaban menos, mientras que ocurría exactamente lo contrario con las células de los animales MSG de 30 días. Estos resultados estarían indicando que parte de la inhibición encontrada en las células de la FEV de los animales adultos podría deberse a un perfil de expresión aumentado de factores anti-adipogénicos, siendo a la inversa para las células de los animales más jóvenes.

Hasta este punto pareciera una paradoja que los animales MSG a edad adulta presenten una inhibición de la adipogénesis cuando los valores plasmáticos de CORT son elevados, teniendo en cuenta la acción pro-adipogénica que se conoce de estas hormonas <sup>45,149</sup>. Para poder explicar esto es necesario hacer referencia al estado de los receptores MR y GR, a través de los cuales ejercen su acción los GCs en las células precursoras. Con respecto a esto se demostró que, la estimulación de los GCs a través de los MR sería más importantes que a través de los GR <sup>150-152</sup>. Así se vio que el bloqueo de MR, en la línea celular 3T3-L1 y en preadipocitos de ratón, generó una inhibición de la diferenciación al estimularse con DEXA, que no ocurrió al bloquearse la expresión de GR <sup>90</sup>. Por otro lado, un dato importante es que los GCs poseen una afinidad diez veces mayor por MR que por su propio receptor <sup>153</sup>, lo que implica que aún a bajas concentraciones de GCs estos podrían actuar preferencialmente vía MR. En nuestro modelo, podría suponerse que las células de los animales adultos presentan un grado de resistencia a la acción de CORT a través de los MR, dado que sus niveles de expresión fueron menores y los de GR no

presentaron diferencias, lo que explicaría la menor capacidad adipogénica de las células de estos animales. En el caso de los animales de 30 días no se vieron alteraciones en el receptor y el proceso adipogénico se vio estimulado, avalando la hipótesis del efecto estimulador de los GCs a través de MR como principal responsable. Cabe destacar que si bien los niveles de CORT en las ratas MSG fueron elevados también a edad juvenil, este aumento estuvo presente por menor tiempo que en los animales adultos, lo que podría explicar la disminución de MR en una edad y no en la otra.

Sin embargo, no debe dejarse de lado que se han encontrado resultados dispares sobre la importancia de MR y GR en este proceso. Así, en cultivos primarios de preadipocitos humanos el bloqueo de MR no provocó cambios, mientras que el de GR suprimió la estimulación por parte de los GCs <sup>154</sup>. Adicionalmente, ha sido estudiado el rol del GR en la diferenciación de preadipocitos de la línea 3T3-L1, encontrándose que los niveles proteicos de GR y de otros componentes del heterocomplejo del receptor, aumentan y modifican su localización luego de la inducción de la diferenciación <sup>155</sup>. Por lo tanto, estos resultados indicarían una contribución de la vía de GR en el mecanismo de diferenciación adipocitaria. La discrepancia en las contribuciones de GR y MR en la acción de los GCs ha sido atribuida a diferencias en la temporalidad de las acciones de los GCs, así como también a respuestas dependientes del depósito de TA analizado<sup>154</sup>.

En vista de los resultados encontrados en el proceso adipogénico, y teniendo en cuenta que la corrección de los niveles de GCs produjo una reversión de varias de las disfunciones encontradas en el modelo MSG in vivo <sup>63,156</sup>, surgió la necesidad de analizar que ocurría con las alteraciones encontradas en las células de la FEV al normalizarse los niveles de CORT circulantes. De esta manera encontramos que las células de la FEV provenientes de los animales MSG-ADX+CORT recuperaron la sensibilidad al estímulo

de diferenciación y la capacidad adipogénica. En concordancia con las alteraciones metabólicas, este resultado confirmaría el rol crucial del ambiente endógeno rico en GCs sobre las alteraciones de las células de FEV, lo que avala la importancia del aumento de CORT en el desarrollo integral del fenotipo MSG, en especial en la expansión anómala del TAV.

Como se pudo observar, no caben dudas que los elevados niveles de GCs generan una expansión anormal del TARP, y que ésta a su vez interviene en el desarrollo de las alteraciones metabólicas de las ratas MSG. En este punto es interesante introducir un nuevo concepto, donde la importancia del aumento de TAV no se centra en el aumento de la masa en sí, sino en las contribuciones que la generan. Esta concepción surgió como consecuencia de la aparición de "individuos obesos metabólicamente sanos e individuos delgados metabólicamente enfermos"<sup>157</sup>, lo que sugirió que la capacidad de mantener el componente hiperplásico activo daría lugar a una expansión saludable del TA, evitando o disminuyendo la aparición de hipertrofia y sus posteriores consecuencias. Avalando esta hipótesis se ha comprobado que la activación de la adipogénesis ha mejorado los parámetros metabólicos de ratones obesos <sup>158,159</sup> y que, por el contrario la inhibición de la misma produjo alteraciones severas en fenotipos humanos de obesidad <sup>118,160,161</sup>.

Con el fin de establecer una relación similar a la planteada entre los resultados del proceso adipogénico *in vitro* y las alteraciones *in vivo* de nuestro modelo, analizamos las distintas contribuciones, hiperplásica e hipertrófica, a través de los tamaños celulares de los adipocitos maduros. Asumimos que las células de menor tamaño corresponderían a la generación de nuevas células (hiperplasia) y que las células de tamaño mayor indicarían hipertrofia de células pre-existentes. Con respecto a esto, pudimos ver la presencia únicamente del componente hipertrófico en los animales MSG a edad

prepuberal. Por el contrario, en los animales adultos se observó un patrón que estaría indicando un fuerte componente hipertrófico en la expansión tisular, marcado por el desplazamiento de una población hacia valores mayores, y una contribución hiperplásica, representada por adipocitos más pequeños. Estos resultados nos permitirían sugerir una cinética de expansión *in vivo* del TARP que coincidiría con los resultados obtenidos *in vitro*. Es decir que la capacidad de los precursores de generar nuevos adipocitos observada *in vitro* en los animales jóvenes, dio como resultado una nueva población de adipocitos de menor tamaño encontrada a edad adulta. Por otra parte, los adipocitos hipertróficos presentes a 30 días probablemente continuaron aumentando de tamaño entre los 30 y los 60 días de vida, mientras que la inhibición adipogénica encontrada *in vitro* en los animales adultos favorecería la hipertrofia de los existentes, agudizándose más aún en el futuro. El efecto negativo de la inhibición de la adipogénesis y predominio de la hipertrofia, como ya se mencionó, determina una expansión del TA no saludable <sup>162,163</sup>, como consecuencia de la disfunción del TA asociado a la hipertrofia adipocitaria lo que contribuye al desarrollo de las alteraciones metabólicas presentes en patologías tales como SM y obesidad. En nuestro modelo, la inhibición observada en la adipogénesis a 60 días podría ser una de las razones por las cuáles los trastornos metabólicos se vuelven más severos a edades más avanzadas <sup>63</sup>.

Al analizar el mismo proceso de expansión en los animales cuyos valores de CORT habían sido normalizados, se pudo observar que el patrón de tamaños de los adipocitos presentó una distribución similar a la encontrada en los animales CTR, permitiendo asumir que el efecto de la normalización de GCs encontrado *in vitro* también se correlacionó con lo que ocurrió *in vivo*, y más aún, que al recuperarse la capacidad adipogénica se revirtió la hipertrofia existente. Este resultado muestra, como ocurre en



el síndrome de Cushing en humanos <sup>160,162-164</sup>, que la sobreproducción de GCs juega un rol preponderante en el desarrollo de la hipertrofia y de la expansión no saludable del TA. De manera importante, la eliminación de la sobre-producción endógena de GCs corrigió las alteraciones encontradas, no sólo en el proceso adipogénico *in vitro*, sino también en la expansión del TARP *in vivo*, apoyando aún más fuertemente la acción desfavorable de la hipercorticosteronemia en dicho proceso y en la generación de alteraciones metabólicas del modelo.

Finalmente, no puede dejarse de lado el posible efecto de LEP en la expansión del TARP de estos animales, teniendo en cuenta la hiperleptinemia presente y los efectos que posee sobre la adipogénesis. Con respecto a esto, no han sido aun claramente determinados y dentro de la bibliografía existente se han postulado tanto efectos pro-<sup>165</sup> como anti-adipogénicos para esta adipoquina <sup>166-168</sup>. En referencia a los primeros, se observó que las CPAs provenientes de ratones db/db presentaron una sobreexpresión de Pref-1 <sup>169</sup> y una menor expresión de PPAR $\gamma$ 2 luego de someterlos a un tratamiento agudo o crónico con LEP *in vitro* <sup>170</sup>. Esto podría sugerir que, la hiperleptinemia podría ser otro factor directo o indirecto en la regulación de la adipogénesis en las ratas MSG <sup>171</sup>. Sin embargo, no debe dejarse de lado que si bien la hiperleptinemia como la hipercorticosteronemia estuvieron presentes en los animales desde la menor edad estudiada, los niveles de expresión de ObRb en las células de la FEV no arrojaron diferencias en ninguna de las dos edades, a diferencia de lo ocurrido para MR. Es decir que la menor diferenciación encontrada en los animales de 60 días fue acompañada por una menor expresión de MR, pero no de ObRb; mientras que a 30 días no se encontraron diferencias en ninguno de los dos receptores. Esto en parte podría reforzar la idea de que, la menor sensibilidad a la acción los GCs sería el mayor factor actuante en

la generación de las alteraciones del proceso adipogénico, ya que las células de la FEV no habrían desarrollado cambios en la sensibilidad a LEP a nivel de receptor.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, podemos resumir que por primera vez se analiza y se describe la cinética de expansión del TARP en un modelo de SM con elevados niveles de GCs endógenos, en el cuál la inhibición del proceso adipogénico estaría cumpliendo un rol fundamental en la génesis y mantenimiento de las alteraciones metabólicas encontradas en los animales MSG.

## **Modelo de Síndrome Metabólico inducido por alto consumo de fructosa.**

Como se mencionó previamente en la Introducción, el consumo excesivo de fructosa induce diversos efectos deletéreos sobre el metabolismo en los seres humanos <sup>172</sup>. Por esta razón se han desarrollado diversos modelos animales que han sido ampliamente utilizados para analizar alteraciones similares a las descritas para el SM <sup>26,173</sup>. En lo que respecta a esta tesis, se utilizó un modelo de consumo de fructosa en el agua de bebida (10% p/v durante 3 y 8 semanas), en el cual se describieron varias alteraciones metabólicas que se detallarán a continuación y las cuales habían sido previamente documentadas en nuestro laboratorio (ratas Wistar y Sprague-Dawley, 3 semanas de ingesta) <sup>41,174,175</sup>. De manera adicional se decidió estudiar los efectos de la ingesta de fructosa durante un periodo más prolongado (8 semanas), donde las alteraciones podrían agudizarse. Específicamente, el objeto de estudio fue la expansión del TARP en los dos estadios de progresión del modelo, con el objetivo de poder determinar el efecto de la ingesta de una DRF sobre las células precursoras y las posteriores consecuencias en dicho proceso de expansión.

Como se mencionó anteriormente, la obesidad central (determinada por la circunferencia de la cintura en humanos) es una característica fundamental del SM. En relación a esto, se ha observado que en condiciones experimentales, el consumo de bebidas endulzadas a base de fructosa fue asociada con un aumento en los depósitos abdominales de TA en seres humanos <sup>176</sup>, así como también en roedores <sup>41</sup>. Nuestros resultados mostraron que, a pesar de no presentar diferencias en el peso corporal, si se encontró un aumento en la masa de TARP en los animales DRF, tanto a 3 y 8 semanas, comparados con su respectivo grupo CTR. Sin embargo, no se observaron diferencias

significativas en el análisis de interacción de variables, lo que podría indicar que la ingesta de fructosa no generaría una desmejora de este parámetro en el período estudiado. En el caso de los animales DRF de 8 semanas, también se registró un incremento en el TAE, contribuyendo a una mayor cantidad de TA en la cavidad abdominal. Además se observó un aumento en el tamaño de los adipocitos en ambos estadios estudiados, que coincidió con los valores anteriormente registrados para células que presentaron alteraciones en el contenido lipídico y un marcado incremento en la liberación de ácidos grasos y en las citoquinas proinflamatorias <sup>41</sup>. De manera interesante, a diferencia de lo ocurrido para la masa del TARP, el tamaño adipocitario luego de 8 semanas de tratamiento fue mayor que luego de 3 semanas, indicando una progresión de la hipertrofia, lo que sustentaría la asociación entre el aumento del tamaño adipocitario y la desmejora de los trastornos metabólicos, como se ha observado en otros estudios <sup>177-179</sup>.

Otra de las alteraciones de aparición temprana fue el aumento de TGs plasmáticos, que cuenta con dos contribuciones principales: una casi inmediata generada por un aumento de la LDN hepática y otra posterior consecuencia del aumento de la lipólisis adipocitaria. En el primer caso el efecto responde a una capacidad intrínseca de la fructosa, que a diferencia de otros azúcares, aporta a través del metabolismo hepático un porcentaje considerable de materia prima (triosas fosfato) para la LDN <sup>42</sup>, contribuyendo a la síntesis tanto de glicerol como de los ácidos grasos que forman parte de los triglicéridos-VLDL <sup>180,181</sup>. La segunda contribución, sin embargo, podría ser consecuencia de la presencia de adipocitos de mayor tamaño los cuales presentan un perfil lipolítico alterado, contribuyendo así al aumento de TGs en circulación <sup>182,183</sup>. En relación a esto, pudimos observar que tanto a 3 como a 8 semanas de ingesta de una

DRF, los niveles de TGs fueron mayores. Este podría relacionarse con el mayor tamaño adipocitario encontrado en ambos períodos, como se ha observado en otros estudios de consumo prolongado de fructosa, siendo una de las posibles explicaciones la menor acción anti-lipolítica de la INS sobre los adipocitos hipertróficos, que como se sabe responden en menor medida a esta hormona <sup>184</sup>.

Nuestros resultados mostraron que el consumo de una DRF provoca un incremento en la leptinemia y que, al igual que el tamaño adipocitario, esta fue mayor en los animales DRF 8 semanas, lo que podría indicar que este aumento en los niveles de LEP estaría relacionado con el tamaño adipocitario más que con la masa de TARP. Con respecto a esto, es conocida la correlación del aumento del tamaño de los adipocitos con la secreción de LEP y la sensibilidad a la INS por parte del TA <sup>177-179,185</sup>, como se ha observado también en estudios de elevado consumo de fructosa <sup>41,177</sup>. Por otra parte, la hiperleptinemia en estados de obesidad ha sido relacionada con la presencia de leptino-resistencia periférica <sup>186</sup>, siendo la vía de señalización de SOCS3 (un factor de supresión de vías de señalización de citoquinas) una de las involucradas en este fenómeno. Al respecto, se comprobó que el consumo de fructosa induce SOCS3, lo que disminuye la fosforilación de serinas/treoninas en el receptor de LEP y genera la menor sensibilidad <sup>187</sup>. Este resultado nos induce a pensar que en los animales DRF podría estar ocurriendo un mecanismo similar, y que la disminución en los efectos de LEP podría ser una razón de las alteraciones encontradas en la diferenciación del TARP. Si bien se realizó un estudio de la expresión de ObRb en las células de la FEV, como se discutirá posteriormente, se requeriría un análisis más detallado para poder confirmar la existencia de leptino-resistencia y el mecanismo involucrado.

Previamente en nuestro laboratorio se observó que los adipocitos hipertróficos provenientes de ratas DRF, respondieron a la acción de INS liberando menores cantidades de LEP *in vitro* <sup>41</sup> y presentaron menores niveles del ARNm de IRS-1 e IRS-2, indicando una menor sensibilidad a esta hormona. En relación a esto, nuestros animales DRF presentaron hiperinsulinemia con niveles de glucosa circulantes normales en ambas edades, lo que indicaría un estado de tolerancia a la glucosa alterada, pero que no se vio acentuada al prolongar la ingesta. Por otro lado no puede dejarse de lado la contribución del aumento de TGs y de AGL, los cuales se ha documentado que generan una inhibición en la cascada de señalización de receptor de INS en diversos tejidos diana como músculo, hígado y TA <sup>188</sup>. Así, el aumento de lípidos circulantes, resultado de una mayor LDN inducida por fructosa y de una mayor tasa de lipólisis en el TA, podría ser otro factor causante de la insulino-resistencia encontrada <sup>189</sup>.

Luego de corroborar que el consumo de una DRF generara las alteraciones características de un modelo de SM, el siguiente paso fue analizar el proceso de expansión del TARP de estos animales durante la progresión del síndrome. Por todo lo expuesto y en base a otros reportes en la literatura <sup>190,191</sup>, se sabe que la hipertrofia adipocitaria es responsable, en parte, de la expansión del TARP y de las disfunciones encontradas luego de un período de ingesta de fructosa. Sin embargo no hay evidencias del potencial efecto sobre la hiperplasia y por este motivo resultó muy atractivo estudiar el efecto sobre el proceso adipogénico *in vitro* de las células de estos animales, así como también analizar las distintas contribuciones de la expansión del TARP *in vivo* a través del análisis del tamaño adipocitario

El primer paso consistió en evaluar la capacidad de diferenciación adipocitaria de las células de la FEV de los animales DRF, para poder determinar el potencial adipogénico

de las células aisladas del TARP. De esta manera se observó que la ingesta de fructosa durante 3 y 8 semanas generó un aumento en la capacidad de diferenciación que se vio reflejado en el mayor porcentaje de células diferenciadas. En cuanto a los parámetros funcionales, el efecto más notorio encontrado fue sobre la acumulación de lípidos intracelulares que mostró un aumento en el período terminal de diferenciación. Conjuntamente se evaluó la capacidad de secreción de LEP, por parte de los adipocitos en cultivo, así como también la expresión del gen Ob, el gen de Adipoq y el de IRS-1. Estos resultados fueron dispares al comparar las células de ambos períodos de tratamiento, ya que todos estos parámetros resultaron aumentados en las células de animales DRF de 3 semanas, sin embargo las pertenecientes a los animales DRF 8 semanas presentaron un aumento en IRS-1, pero no presentaron cambios en la secreción de LEP ni en la expresión de Ob y Adipoq a lo largo del cultivo.

Con respecto a los principales factores de transcripción involucrados en el proceso adipogénico, nuestros resultados muestran que si bien no se encontraron diferencias en los niveles de expresión de PPAR $\gamma$ 2 en ninguno de los períodos evaluados, si se observó que, el consumo de fructosa generó un aumento en los niveles de expresión de C/EBP $\alpha$ . Esto concuerda con el aumento encontrado en la capacidad adipogénica de las células DRF y sustentarían la hipótesis que plantea que el aumento de expresión de uno de los dos factores es suficiente para que el proceso adipogénico se active <sup>96,99</sup>.

Finalizando con el análisis del proceso de diferenciación, evaluamos el porcentaje de células diferenciadas, observando que la ingesta de fructosa generó un aumento en este parámetro en ambos períodos de tratamiento. Sin embargo, al profundizar en este análisis surge un dato muy interesante, ya que los grados de maduración a 3 semanas presentaron un perfil distinto al observado a 8 semanas. En el primer caso los grados de

maduración más avanzados eran predominantes, generando un perfil de maduración con un claro aumento en el porcentaje de células en estadios terminales de diferenciación. Sin embargo en el caso de las células DRF 8 semanas, no existieron diferencias en el perfil de grados analizados.

En conjunto, estos resultados indican un aumento en el proceso de diferenciación *in vitro* para las células DRF en ambos períodos, lo que muestra que un alto consumo de fructosa genera la activación de la capacidad adipogénica en la expansión del TA. Cabe destacar que, si bien el aumento hipertrófico del TA en modelos de ingesta de fructosa ha sido ampliamente aceptado <sup>41,184</sup>, hasta el momento no existían antecedentes referidos al potencial efecto del consumo de fructosa sobre la capacidad adipogénica. Únicamente se ha analizado el efecto estimulador de la fructosa sobre la diferenciación *in vitro* de la línea celular 3T3-L1 <sup>192</sup>. Por otro lado, pudimos observar que la activación de la adipogénesis, luego de 3 semanas de consumo de fructosa, se mantuvo al prolongar el período a 8 semanas, lo que podría estar indicando que la contribución adipogénica estuvo presente entre ambos períodos, contribuyendo a la expansión del TARP observada. Actualmente son contradictorios los estudios en donde se considera a la hiperplasia como un aporte sustancial en la expansión del TAV <sup>72,73,75</sup>, por esta razón creemos que nuestros resultados son relevantes para esclarecer la importancia de dicha contribución.

Sin embargo, al referirnos a las células de los animales DRF 8 semanas, es necesario realizar un análisis más profundo de los posibles fenómenos que podrían estar ocurriendo. En primer lugar se podría hipotetizar que si bien el proceso de diferenciación está activado, como se mostró anteriormente, dichas células podrían estar atravesando un período de transición, lo que explicaría la aparición de parámetros



de diferenciación sin modificaciones. Adicionalmente se vio que, si bien se mantiene el porcentaje de células diferenciadas, ya no lo hacen alcanzando niveles de maduración más avanzados, como se observó en las células DRF 3 semanas. Este resultado, junto con los parámetros de diferenciación que no presentaron cambios, sería un indicio para suponer el inicio de una inhibición en el proceso adipogénico y que, si analizáramos el proceso de expansión a tiempos más prolongados que 8 semanas, probablemente la hiperplasia estaría inhibida, dando lugar primordialmente al componente hipertrófico.

Este efecto inhibitorio en la expansión hiperplásica ha sido previamente documentado en fenotipos de obesidad en seres humanos <sup>118,193,194</sup> donde se ha correlacionado negativamente el IMC y el tamaño adipocitario con el número de preadipocitos capaces de diferenciarse. Esta inhibición favorecería un predominio de la hipertrofia asociada a las alteraciones metabólicas presentes en la obesidad, y explicaría porque las alteraciones relacionadas con la expansión del TA en estados patológicos más avanzados se acentúan. En nuestro caso sería necesario corroborar dicha hipótesis prolongando la ingesta de fructosa a tiempos mayores que 8 semanas, sin embargo los datos anteriormente mencionados no deberían descartarse como un indicio de que este fenómeno comenzara a ocurrir.

Hasta el momento nuestros resultados indican un aumento en la capacidad adipogénica de las células de la FEV de los animales DRF, sin embargo, para poder encontrar una posible explicación a este fenómeno resultó importante poder evaluar el estado de dichas células. En este punto es importante tener en cuenta que, los cambios encontrados en la capacidad adipogénica son el reflejo de posibles cambios sufridos por las células precursoras *in vivo*, ya que solamente las células de la FEV aisladas del TARP estuvieron presentes en el entorno metabólico alterado de los animales DRF, reflejando

posteriormente esto en un patrón de diferenciación *in vitro* perturbado. Como se detallará a continuación, pueden ser varias las alteraciones que intervengan en este comportamiento, entre las que se analizaron un posible cambio en el número de CPAs, un grado de competencia diferencial de las mismas y un perfil de factores pro- y anti-adipogénicos alterado.

En primer lugar, al estudiar específicamente el número de CPAs presentes en la FEV (CD34+CD31-CD45-), se pudo observar un aumento de precursores en los animales DRF 8 semanas, sin encontrarse cambios en los animales DRF 3 semanas. En general se ha considerado que los depósitos de TA que se expanden principalmente por hiperplasia, poseen un mayor número de precursores que aquellos que lo hacen a expensas de hipertrofia <sup>195,196</sup>. En este caso los resultados obtenidos en la diferenciación de las células DRF de 8 semanas se asociarían a un mayor número de células precursoras presentes en el TARP de estos animales, generando un mayor número de células diferenciadas.

El hecho de que no exista un aumento en el número de CPAs en los animales DRF 3 semanas estaría indicando que, el aumento en la capacidad adipogénica encontrada *in vitro* respondería a otro mecanismo, hecho que nos condujo a hipotetizar la existencia de una capacidad de respuesta disímil al estímulo de diferenciación. Como se mencionó antes, esta sensibilidad se define como la competencia de las células precursoras a diferenciarse al linaje adipocitario <sup>197</sup>, y específicamente está regulada por dos factores: Zfp423 y PPAR $\gamma$ 2 <sup>84,86</sup>. En este contexto, nuestros resultados muestran un aumento de los niveles de Zfp423 y PPAR $\gamma$ 2 en las células de los animales DRF, lo que indicaría que generaron una mayor capacidad para diferenciarse a adipocitos en respuesta al consumo de fructosa. Teniendo en cuenta, que en ambos períodos de ingesta estudiados

se encontró un aumento de la competencia de las células precursoras, se podría asumir que el consumo de fructosa genera un efecto diferencial en las CPAs: en primera instancia el aumento en la competencia de las CPAs sin cambio en el número sería efecto dominante; pero al prolongar el tiempo de consumo también se activaría la proliferación aumentando el número de CPAs, siendo ambos factores los responsables del incremento en la adipogénesis.

Sin embargo, no puede dejarse de lado que, al ser mayor el número de CPAs a 8 semanas, los niveles de expresión de Zfp423 y PPAR $\gamma$ 2 podrían no estén elevados y que sea un efecto indirecto del mayor número de precursores. Por lo tanto, podría suponerse que únicamente el aumento del número de CPAs sea el efecto predominante para explicar el incremento adipogénico *in vitro*, como ya ha sido encontrado en otros estudios de intervención dietaria <sup>195</sup>.

Como se mencionó anteriormente la capacidad de diferenciación también depende del estado de diversos factores, pro- y anti-adipogénicos que fueron analizados en las células de ambos grupos DRF. Se pudo observar una menor expresión de factores anti-adipogénicos, como son Pref-1 y Wnt10b <sup>92,146</sup>, en las células de los animales DRF de 3 semanas. Esto podría ocurrir por una mayor respuesta al estímulo de inducción, teniendo en cuenta el efecto inhibitorio sobre la expresión de Pref-1, ejercido por DEXA, y sobre la expresión de Wnt10b causado indirectamente por IBMX, ambos componentes de la mezcla de diferenciación <sup>93,147</sup>. Al referirnos a las células de los animales DRF 8 semanas los niveles de Pref-1 y los de Wnt10b no resultaron alterados, y si se vieron aumentados los niveles de MR. Sin embargo como se mencionó anteriormente, la cantidad de CPAs en el TARP de estos animales fue mayor, lo que podría estar indicando que la expresión de ambos factores anti-adipogénicos podría estar disminuida, pero el

aumento en el número de CPAs podría estar enmascarando dicha inhibición. De manera inversa podría estar ocurriendo lo mismo con la expresión de MR. Por lo tanto no puede descartarse que el aumento en la diferenciación en este caso pueda deberse principalmente a un mayor número de células precursoras y no a una expresión diferencial de los factores que regulan la capacidad adipogénica. En este último caso sería necesario cuantificar la expresión de dichos marcadores específicamente en las CPAs.

Por lo tanto, teniendo en cuenta los resultados obtenidos, es importante tener una visión global del estado de los precursores para poder definir su capacidad adipogénica, donde no sólo el número sino también el grado de competencia y la expresión diferencial de factores pro y anti adipogénicos juegan un papel importante. De esta manera pareciera que en etapas tempranas el efecto de la DRF sería fundamentalmente sobre la expresión de factores regulatorios en las células precursoras, mientras que luego de un período más prolongado se vería afectada principalmente la cantidad de células destinadas a diferenciarse.

Según nuestros resultados y los antecedentes bibliográficos, queda claro que el componente hipertrófico está presente en la expansión del TAA causada por la ingesta de fructosa, sin embargo no se conoce que ocurre con el componente hiperplásico <sup>41,184</sup>. Por este motivo, luego de poder confirmar la activación de la capacidad adipogénica *in vitro*, el siguiente paso fue poder determinar si esta activación se correlacionaba la expansión del TARP *in vivo*. Para ello realizamos el análisis de la distribución de tamaños de los adipocitos, método que ha sido ampliamente utilizado para estudiar las diferentes contribuciones que tienen lugar en procesos de incremento de masa del TA <sup>73,75</sup>. En este punto es importante destacar que la mayor parte de los estudios realizados

sobre adipogénesis *in vivo* son resultado indirecto de la medida del tamaño adipocitario, donde se asume que los adipocitos más pequeños representan nuevas células generadas por diferenciación de los precursores. Recientemente se han descrito dos estrategias de estudio de la adipogénesis *in vivo*, una en la cual se utilizó un modelo murino transgénico que permitió determinar la aparición de nuevos adipocitos luego de la ingesta de una dieta rica en grasas <sup>72</sup>, y otra donde se determinó la incorporación de Bromodeoxiuridina a los nuevos adipocitos generados <sup>196</sup>. Estos representan los primeros antecedentes directos en el tema, lo que pone de manifiesto que la dinámica de expansión del TA es un campo donde aún queda mucho por investigar, siendo nuestros resultados un aporte significativo al estado de la temática.

Así, al analizar las contribuciones de la expansión del TARP *in vivo*, pudimos encontrar que el componente hipertrófico estaba presente en ambos períodos estudiados, como ya se mencionó anteriormente. En el grupo de animales DRF 3 semanas, la presencia de una única población de adipocitos de mayor tamaño nos permitió suponer que ésta era la principal contribución existente a esa edad. Sin embargo, al analizar la distribución de los adipocitos del grupo DRF 8 semanas, el panorama fue distinto, ya que se encontraron dos poblaciones de adipocitos maduros: la primera población de menor tamaño que correspondería a nuevos adipocitos generados en el período intermedio entre 3 y 8 semanas de ingesta, mientras que la segunda población de adipocitos más grandes correspondería a aquellos que ya a 3 semanas de ingesta presentaban hipertrofia. El dato más interesante que surge de nuestro análisis es que el TARP haya transcurrido por una etapa de hiperplasia entre las 3 y las 8 semanas estudiadas, lo que coincidiría con la activación de la adipogénesis en las células de la FEV observada a 3 semanas.

Respecto a esto, todavía son encontrados los resultados en bibliografía sobre la temporalidad y la naturaleza de los mecanismos de expansión del TA, tanto en estado fisiológico como patológicos. Así, históricamente se ha considerado que el TAA, frente a una situación de balance energético positivo, se expande exclusivamente por hipertrofia, mientras que el TASC lo hace por hiperplasia <sup>196</sup>, siendo este el fundamento del efecto de protección que se le ha adjudicado al TASC. Sin embargo, Wang y col. demostraron que el TA abdominal (epididimal) de ratones sometidos a dietas elevadas en lípidos, presentaría una expansión caracterizada por ambas contribuciones <sup>72</sup>, lo que estarían avalando el mecanismo sugerido en nuestro modelo, donde ambos componentes parecieran coexistir en un determinado período.

Por lo tanto, podríamos asumir que la cinética de expansión presente en nuestro modelo sería equivalente a la encontrada por Wang y col., donde se demostró que efectivamente la secuencia transcurría con un período de hipertrofia inicial, seguido por uno de hipertrofia/hiperplasia <sup>72</sup>. Finalmente, teniendo en cuenta los indicios de una posible reversión de la adipogénesis *in vitro* encontrada en las células DRF 8 semanas, así como también los antecedentes bibliográficos que sustentan esta hipótesis <sup>118198</sup>, podríamos suponer que la inhibición de la adipogénesis en estados más avanzados daría lugar a la hipertrofia adipocitaria exclusivamente, con las consecuencias que esto conllevaría. Sin embargo, resultaría interesante en nuestro caso aumentar más aún el tiempo de administración de fructosa, para poder confirmar que únicamente el componente hipertrófico es el que se mantiene activo, siendo el responsable principal de la expansión del TARP como ocurre en estados de obesidad.

Los efectos del consumo de fructosa sobre la expansión del TA, como pudimos observar, comienzan en etapas tempranas sobre las células de la FEV, y parecieran generar

cambios en el estado global de competencia que dependen de la etapa de expansión en que se encuentra el TA. Sin embargo, en ambos casos los cambios generados *in vivo* permanecerían constantes en el proceso de diferenciación *in vitro*, siendo los responsables de la velocidad de diferenciación dispar encontrada entre las células DRF y las CTR. Esta impronta generada *in vivo* sobre los precursores podría responder a algún mecanismo de regulación que tenga la capacidad de perpetuarse en el tiempo, como sería el caso de la regulación epigenética. Existen estudios donde se ha documentado la hipometilación de los promotores de determinados genes del fenotipo adipocitario maduro (PPAR $\gamma$ 2, LEP, FABP-4) en células mesenquimáticas aisladas del TA, indicando que efectivamente la existencia de tales mecanismos de regulación <sup>199</sup>. Teniendo en cuenta esta evidencia y conociendo el estado de estrés oxidativo (EO) general que presentan estos animales (aumento de TBARS), y local sobre el TARP <sup>175</sup>, se podría especular que el EO estaría en parte involucrado en este cambio. Si bien sería necesario un mayor número de estudios para poder establecer el mecanismo preciso por el cual se mantiene este efecto *in vitro*, según los antecedentes bibliográficos se podría generar una hipótesis sobre el posible mecanismo actuante. Así, dentro de los posibles blancos de acción se podría postular a la proteína Sirtuin-1, encargada de censurar la disponibilidad de nutrientes en el TAB y de mediar los efectos correspondientes sobre la acumulación de lípidos. Esta proteína ha sido estudiada en modelos de disfunción vascular causados por consumo de DRF, y se ha observado una disminución en sus niveles en respuesta a la dieta <sup>200</sup>. Esta histona deacetilasa NAD<sup>+</sup> dependiente reprime la expresión de PPAR $\gamma$ 2 en etapas tempranas de la adipogénesis, inhibiendo su normal desarrollo<sup>201</sup>. De esta manera, una la disminución de Sirtuin-1 aumentaría PPAR $\gamma$ 2, reflejándose en un aumento de la adipogénesis. Adicionalmente, los elevados niveles de PPAR $\gamma$ 2 podrían estimular otro factor pro-adipogénico, Setd8,

una acetiltransferasa <sup>202</sup>, potenciando epigenéticamente el proceso adipogénico temprano. Estos probables cambios epigenéticos podrían contribuir al establecimiento y mantenimiento de la determinación adipocitaria en las CPAs en cultivo. De todas maneras, no se puede descartar que exista otro mecanismo que pueda contribuir a la persistencia del aumento de expresión de dichos factores en las CPAs aisladas de las ratas DRF <sup>203</sup>.

En resumen se podría asumir que, la expansión del TARP observada luego de la administración de una DRF a ratas macho normales, podría marcar la siguiente secuencia: un aumento inicial del tamaño, luego una posible co-existencia de adipogénesis e hipertrofia, y finalmente posterior un aumento del tamaño adipocitario que sería favorecido por la inhibición del proceso adipogénico. Este ordenamiento en la expansión adipocitaria pareciera estar anticipada por el estado de competencia y la capacidad adipogénica de los precursores, que serían los determinantes del tipo de expansión a ocurrir a posteriori. Es decir, células de la FEV con mayor compromiso a la adipogénesis indicarían un aumento posterior de nuevos adipocitos, de manera contraria la disminución de ese grado de compromiso de las células precursoras podría ser un indicativo de una inhibición ulterior en la adipogénesis, con el consecuente aumento de tamaño de los adipocitos existentes.



## CONCLUSIONES FINALES

En conclusión los resultados de los animales MSG nos indican que:

La capacidad de diferenciación *in vitro* de las células de la FEV de los animales MSG presentó alteraciones que dependen de la edad estudiada, estando estimulada en los animales juveniles, mientras que por el contrario, se encontró disminuida en los animales adultos. Estos cambios en la capacidad adipogénica de la FEV de acuerdo a la edad, estarían condicionando la contribución de la adipogénesis en la forma de expansión del TARP durante el desarrollo de los animales MSG.

Las CPAs presentaron cambios en la competencia adipocitaria, siendo mayor para las células provenientes de los animales más jóvenes y menor para los adultos. Por el contrario, el número de CPAs presentes en la FEV de estos animales no mostró cambios en ninguna de las dos edades. En conjunto esto podría explicar que las diferencias encontradas en la capacidad de diferenciación evaluada *in vitro* son consecuencia del cambio en la competencia de las CPAs, pero no del incremento de número en las mismas.

Al igual de los resultados previos de nuestro laboratorio con respecto a otras alteraciones endócrina-metabólicas inducidas por el tratamiento neonatal con MSG, los cambios en la capacidad adipogénica de las CPAs del TARP, son dependientes de los elevados niveles endógenos de GCs. Esto queda evidenciado cuando al corregir los niveles circulantes de GCs se restituyen tanto la capacidad adipogénica, así como la competencia de las células de la FEV.

A pesar de los altos niveles de GCs (potente factor pro-adipogénico) presentes en los animales MSG, en la edad adulta el potencial adipogénico de las CPAs se encontró disminuido. Aunque, en el presente Trabajo de Tesis Doctoral no se abordó los posibles

mecanismos que podrían llevar a esta inhibición, la disminución en la expresión de MR en los animales MSG junto con la importancia asignada al mismo en el proceso adipogénico, permitirían suponer que las células de los animales adultos desarrollarían una resistencia a la acción de los GCs

La expansión del TARP en el período estudiado, estaría dada por una contribución hipertrófica inicial, seguida de una combinación de hiperplasia/hipertrofia, que finalmente continuaría principalmente con el incremento de la hipertrofia. Esta cinética se pudo evaluar a través del análisis de tamaños adipocitarios, que fueron un reflejo de los posibles fenómenos que ocurrirían *in vivo*.

Por otra parte, los resultados de los animales DRF indicaron que:

El consumo de fructosa generó un aumento en la capacidad de diferenciación *in vitro* de las células de la FEV en ambos períodos estudiados, que se vio reflejado en el aumento de los parámetros de diferenciación cuantificados.

Las CPAs del TARP de los animales que consumieron fructosa durante 3 y 8 semanas presentaron un aumento en la competencia, indicando que este mecanismo podría ser el responsable del aumento en la diferenciación encontrado *in vitro*. Además, el número de CPAs sufrió un incremento en los animales DRF de 8 semanas, pero no en los de 3 semanas. Esto indicaría que el mecanismo por el cual la fructosa genera cambios en los precursores fue diferencial al comparar las dos etapas, siendo el aumento de competencia primordial en los animales DRF 3 semanas, y una combinación de ambos en los animales de DRF 8 semanas.

La cinética de expansión del TARP, al igual que se pudo observar para los animales MSG, habría transcurrido con una etapa inicial de hipertrofia y luego la combinación de

ambas contribuciones, lo que pudo ser evaluado a través de la cuantificación de tamaños adipocitarios.

Por último, creemos que los resultados obtenidos en el presente trabajo contribuye a la comprensión de diferentes aspectos, aún no esclarecidos, relacionados con el proceso adipogenico durante la expansión del TA. En primer término, hasta el momento sigue siendo contradictorio en la bibliografía internacional, si durante la expansión del TA abdominal se generan o no nuevas células adiposas. Nuestros resultados avalarían los trabajos que indican que si ocurre este proceso.

Por otro lado, sería al menos hasta nuestro conocimiento, la primera evidencia de que el consumo de dietas ricas en fructosa provoca un estímulo de la capacidad adipogénica del TARP. Serían necesario nuevos experimento que permitan evaluar si esto ocurre en otros depósitos de TA.

Además, de acuerdo a nuestros resultados, la activación del proceso adipogénico podría deberse en parte al incremento de la competencia y del número de las CPAs. Estos cambios, parecieran que pueden ocurrir al mismo tiempo o de manera independiente, incrementando el potencial adipogénico en ambos casos.

Por último demostramos que, en una situación crónica de incremento de GCs, los que desde hace años se reconocen como potentes factores pro-adipogénicos, la capacidad de las CPAs puede estar inhibida. De hecho, existen numerosos trabajos que postulan a los GCs como claves en el desarrollo de la obesidad, tanto por incremento de su actividad a nivel del TA o de sus niveles plasmáticos, como en el Síndrome de Cushing. Sin embargo existe muy poca información de cómo se ve afectada la adipogénesis por el aumento de la actividad glucocorticoidea crónica.

Por todo lo mencionado, creemos relevante el aporte del presente trabajo a la comprensión del proceso adipogénico. En los últimos años se ha postulado que la naturaleza de la expansión del TA sería determinante en la aparición y evolución de las alteraciones presentes en el SM. Específicamente la inhibición de la adipogénesis formaría parte de una expansión no saludable donde la hipertrofia adipocitaria predomina, acentuando los trastornos metabólicos relacionados y resultando en situaciones de mayor riesgo para la salud. Por el contrario, la activación de la adipogénesis y por consiguiente una expansión hiperplásica resultaría en una expansión saludable.

Por lo tanto, el conocimiento del proceso de desarrollo del TA en situaciones como el SM y la obesidad, sería crucial para el tratamiento y manejo de dichas patologías. En este contexto, el mantenimiento de la adipogénesis surge como un nuevo blanco relevante para evitar o contrarrestar el agravamiento las alteraciones relacionadas con la hipertrofia del TA.

Parte de los resultados de este Trabajo de Tesis dieron como resultado dos publicaciones científicas en revistas internacionales:

**MG. Zubiría; JP. Fariña; JJ. Gagliardino; E. Spinedi; A. Giovambattista.**

*"Fructose-rich diet intake-induced hypertrophic abdominal adipose tissue results from reduced precursor cell anti-adipogenic signals."* FEBS Journal. Noviembre 2013; 280 (22): 5864-5874.

**MG. Zubiría, J. Vidal-Bravo, E. Spinedi, A. Giovambattista.**

*"Relationship between Impaired Adipogenesis of Retroperitoneal Adipose Tissue and Hypertrophic Obesity: Role of Endogenous Glucocorticoid Excess"* Journal of Cellular and Molecular Medicine. Aceptado para su publicación. Marzo 2014.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Britos, S. *et al.* Obesidad en Argentina : ¿ Hacia un nuevo fenotipo ? 1–58 (2004).
2. Otero, A. S. & Grossi, M. M. de. *La Llamada Revolución Industrial: Siglos XVIII y XIX.* 430 (Universidad Católica Andrés Bello, 1998).
3. Moreno Esteban, B., Monereo Megías, S. & Álvarez Hernández, J. *Obesidad: La Epidemia Del Siglo XXI.* 493 (Ediciones Díaz de Santos, 2000).
4. Chaput, J.-P., Klingenberg, L., Astrup, A. & Sjödín, A. M. Modern sedentary activities promote overconsumption of food in our current obesogenic environment. *Obes. Rev.* **12**, e12–20 (2011).
5. Mathes, W. F., Kelly, S. A. & Pomp, D. Advances in comparative genetics: influence of genetics on obesity. *Br. J. Nutr.* **106 Suppl**, S1–10 (2011).
6. Martí, A., Martínez-González, M. A. & Martínez, J. A. Interaction between genes and lifestyle factors on obesity. *Proc. Nutr. Soc.* **67**, 1–8 (2008).
7. Rankinen, T. *et al.* The human obesity gene map: the 2005 update. *Obesity (Silver Spring)*. **14**, 529–644 (2006).
8. Aballay, L. R., Eynard, A. R., Díaz, M. D. P., Navarro, A. & Muñoz, S. E. Overweight and obesity: a review of their relationship to metabolic syndrome, cardiovascular disease, and cancer in South America. *Nutr. Rev.* **71**, 168–79 (2013).
9. Ministerio de Salud Presidencia de la Nación. *Segunda Encuesta Nacional de Factores de Riesgo.* (2011).
10. Ministerio de Salud de la Nación. *Encuesta Nacional de Nutrición y Salud.* 1–65 (2006).
11. Presidencia de la Nación. *LEY 26.396/08.* **08**, (2008).
12. Randle, P. J. Regulatory interactions between lipids and carbohydrates: the glucose fatty acid cycle after 35 years. *Diabetes. Metab. Rev.* **14**, 263–83 (1998).
13. Morrison, J. A., Friedman, L. A., Wang, P. & Glueck, C. J. Metabolic syndrome in childhood predicts adult metabolic syndrome and type 2 diabetes mellitus 25 to 30 years later. *J. Pediatr.* **152**, 201–6 (2008).
14. Hotamisligil, G. S., Arner, P., Caro, J. F., Atkinson, R. L. & Spiegelman, B. M. Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor- $\alpha$  in human obesity and insulin resistance. *J. Clin. Invest.* **95**, 2409–15 (1995).
15. Pedersen, B. K. *et al.* Searching for the exercise factor: is IL-6 a candidate? *J. Muscle Res. Cell Motil.* **24**, 113–9 (2003).
16. Caballero, A. E. Endothelial dysfunction, inflammation, and insulin resistance: a focus on subjects at risk for type 2 diabetes. *Curr. Diab. Rep.* **4**, 237–46 (2004).
17. McGarry, J. D. Banting lecture 2001: dysregulation of fatty acid metabolism in the etiology of type 2 diabetes. *Diabetes* **51**, 7–18 (2002).



18. Pan, D. A. *et al.* Skeletal muscle triglyceride levels are inversely related to insulin action. *Diabetes* **46**, 983–8 (1997).
19. Roden, M. *et al.* Rapid impairment of skeletal muscle glucose transport/phosphorylation by free fatty acids in humans. *Diabetes* **48**, 358–64 (1999).
20. Ferrannini, E. *et al.* Insulin resistance in essential hypertension. *N. Engl. J. Med.* **317**, 350–7 (1987).
21. Laakso, M., Sarlund, H. & Mykkanen, L. Essential hypertension and insulin resistance in non-insulin-dependent diabetes. *Eur. J. Clin. Invest.* **19**, 518–26 (1989).
22. Alberti, K. G. M. M., Zimmet, P. & Shaw, J. Metabolic syndrome--a new world-wide definition. A Consensus Statement from the International Diabetes Federation. *Diabet. Med.* **23**, 469–80 (2006).
23. MARSHALL, R. O. & KOOI, E. R. Enzymatic conversion of D-glucose to D-fructose. *Science* **125**, 648–9 (1957).
24. Tappy, L. & Lê, K.-A. Metabolic effects of fructose and the worldwide increase in obesity. *Physiol. Rev.* **90**, 23–46 (2010).
25. Elliott, S. S., Keim, N. L., Stern, J. S., Teff, K. & Havel, P. J. Fructose, weight gain, and the insulin resistance syndrome. *Am. J. Clin. Nutr.* **76**, 911–22 (2002).
26. Bray, G. A., Nielsen, S. J. & Popkin, B. M. Consumption of high-fructose corn syrup in beverages may play a role in the epidemic of obesity. *Am. J. Clin. Nutr.* **79**, 537–43 (2004).
27. Schulze, M. B. *et al.* Sugar-sweetened beverages, weight gain, and incidence of type 2 diabetes in young and middle-aged women. *JAMA* **292**, 927–34 (2004).
28. Dennison, B. A., Rockwell, H. L. & Baker, S. L. Excess fruit juice consumption by preschool-aged children is associated with short stature and obesity. *Pediatrics* **99**, 15–22 (1997).
29. Ludwig, D. S., Peterson, K. E. & Gortmaker, S. L. Relation between consumption of sugar-sweetened drinks and childhood obesity: a prospective, observational analysis. *Lancet* **357**, 505–8 (2001).
30. Bantle, J. P., Laine, D. C. & Thomas, J. W. Metabolic effects of dietary fructose and sucrose in types I and II diabetic subjects. *JAMA* **256**, 3241–6 (1986).
31. Crapo, P. A. & Kolterman, O. G. The metabolic effects of 2-week fructose feeding in normal subjects. *Am. J. Clin. Nutr.* **39**, 525–34 (1984).
32. Macdonald, I. Influence of fructose and glucose on serum lipid levels in men and pre- and postmenopausal women. *Am. J. Clin. Nutr.* **18**, 369–72 (1966).
33. Faeh, D. *et al.* Effect of fructose overfeeding and fish oil administration on hepatic de novo lipogenesis and insulin sensitivity in healthy men. *Diabetes* **54**, 1907–13 (2005).
34. Liu, J. *et al.* Ethnic-specific criteria for the metabolic syndrome: evidence from China. *Diabetes Care* **29**, 1414–6 (2006).

35. Shulman, G. I. Cellular mechanisms of insulin resistance. *J. Clin. Invest.* **106**, 171–6 (2000).
36. Nakagawa, T. *et al.* A causal role for uric acid in fructose-induced metabolic syndrome. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **290**, F625–31 (2006).
37. Pagliassotti, M. J., Prach, P. A., Koppenhafer, T. A. & Pan, D. A. Changes in insulin action, triglycerides, and lipid composition during sucrose feeding in rats. *Am. J. Physiol.* **271**, R1319–26 (1996).
38. Sánchez-Lozada, L. G. *et al.* Fructose-induced metabolic syndrome is associated with glomerular hypertension and renal microvascular damage in rats. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **292**, F423–9 (2007).
39. Flores, L. E. *et al.* Islet cannabinoid receptors: cellular distribution and biological function. *Pancreas* **42**, 1085–92 (2013).
40. Jürgens, H. *et al.* Consuming fructose-sweetened beverages increases body adiposity in mice. *Obes. Res.* **13**, 1146–56 (2005).
41. Alzamendi, A. *et al.* Fructose-rich diet-induced abdominal adipose tissue endocrine dysfunction in normal male rats. *Endocrine* **35**, 227–32 (2009).
42. Mayes, P. A. Intermediary metabolism of fructose. *Am. J. Clin. Nutr.* **58**, 754S–765S (1993).
43. Peckett, A. J., Wright, D. C. & Riddell, M. C. The effects of glucocorticoids on adipose tissue lipid metabolism. *Metabolism*. **60**, 1500–10 (2011).
44. Patsouris, D. *et al.* Glucocorticoids and thiazolidinediones interfere with adipocyte-mediated macrophage chemotaxis and recruitment. *J. Biol. Chem.* **284**, 31223–35 (2009).
45. Hauner, H., Schmid, P. & Pfeiffer, E. F. Glucocorticoids and insulin promote the differentiation of human adipocyte precursor cells into fat cells. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **64**, 832–5 (1987).
46. Yu, C.-Y. *et al.* Genome-wide analysis of glucocorticoid receptor binding regions in adipocytes reveal gene network involved in triglyceride homeostasis. *PLoS One* **5**, e15188 (2010).
47. Lee, M.-J., Pramyothin, P., Karastergiou, K. & Fried, S. K. Deconstructing the roles of glucocorticoids in adipose tissue biology and the development of central obesity. *Biochim. Biophys. Acta* (2013). doi:10.1016/j.bbadis.2013.05.029
48. Kershaw, E. E. *et al.* Adipocyte-specific glucocorticoid inactivation protects against diet-induced obesity. *Diabetes* **54**, 1023–31 (2005).
49. Morton, N. M. *et al.* Novel adipose tissue-mediated resistance to diet-induced visceral obesity in 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1-deficient mice. *Diabetes* **53**, 931–8 (2004).
50. Masuzaki, H. *et al.* A transgenic model of visceral obesity and the metabolic syndrome. *Science* **294**, 2166–70 (2001).

51. Engeli, S. *et al.* Regulation of 11 $\beta$ -HSD genes in human adipose tissue: influence of central obesity and weight loss. *Obes. Res.* **12**, 9–17 (2004).
52. Lee, M.-J. *et al.* Depot-specific regulation of the conversion of cortisone to cortisol in human adipose tissue. *Obesity (Silver Spring)*. **16**, 1178–85 (2008).
53. Rask, E. *et al.* Tissue-specific changes in peripheral cortisol metabolism in obese women: increased adipose 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 activity. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **87**, 3330–6 (2002).
54. Pivonello, R., De Martino, M. C., De Leo, M., Lombardi, G. & Colao, A. Cushing's Syndrome. *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.* **37**, 135–49, ix (2008).
55. Chanson, P. & Salenave, S. Metabolic syndrome in Cushing's syndrome. *Neuroendocrinology* **92 Suppl 1**, 96–101 (2010).
56. Veyrat-Durebex, C. *et al.* Central glucocorticoid administration promotes weight gain and increased 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 expression in white adipose tissue. *PLoS One* **7**, e34002 (2012).
57. Campbell, J. E., Peckett, A. J., D'souza, A. M., Hawke, T. J. & Riddell, M. C. Adipogenic and lipolytic effects of chronic glucocorticoid exposure. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **300**, C198–209 (2011).
58. Holzwarth-McBride, M. A., Sladek, J. R. & Knigge, K. M. Monosodium glutamate induced lesions of the arcuate nucleus. II. Fluorescence histochemistry of catecholamines. *Anat. Rec.* **186**, 197–205 (1976).
59. Dolnikoff, M. S., Kater, C. E., Egami, M., de Andrade, I. S. & Marmo, M. R. Neonatal treatment with monosodium glutamate increases plasma corticosterone in the rat. *Neuroendocrinology* **48**, 645–9 (1988).
60. Larsen, P. J., Mikkelsen, J. D., Jessop, D., Lightman, S. L. & Chowdrey, H. S. Neonatal monosodium glutamate treatment alters both the activity and the sensitivity of the rat hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. *J. Endocrinol.* **141**, 497–503 (1994).
61. Nemeroff, C. B. *et al.* Growth, endocrinological and behavioral deficits after monosodium L-glutamate in the neonatal rat: possible involvement of arcuate dopamine neuron damage. *Psychoneuroendocrinology* **2**, 179–96 (1977).
62. Hirata, A. E., Andrade, I. S., Vaskevicius, P. & Dolnikoff, M. S. Monosodium glutamate (MSG)-obese rats develop glucose intolerance and insulin resistance to peripheral glucose uptake. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **30**, 671–4 (1997).
63. Perelló, M., Moreno, G., Gaillard, R. C. & Spinedi, E. Glucocorticoid-dependency of increased adiposity in a model of hypothalamic obesity. *Neuro Endocrinol. Lett.* **25**, 119–26 (2004).
64. Castrogiovanni, D., Gaillard, R. C., Giovambattista, A. & Spinedi, E. Neuroendocrine, metabolic, and immune functions during the acute phase response of inflammatory stress in monosodium L-glutamate-damaged, hyperadipose male rat. *Neuroendocrinology* **88**, 227–34 (2008).

- 
65. Cannon, B. & Nedergaard, J. Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol. Rev.* **84**, 277–359 (2004).
  66. Galic, S., Oakhill, J. S. & Steinberg, G. R. Adipose tissue as an endocrine organ. *Mol. Cell. Endocrinol.* **316**, 129–39 (2010).
  67. Saely, C. H., Geiger, K. & Drexel, H. Brown versus white adipose tissue: a mini-review. *Gerontology* **58**, 15–23 (2012).
  68. Gesta, S., Tseng, Y.-H. & Kahn, C. R. Developmental origin of fat: tracking obesity to its source. *Cell* **131**, 242–256 (2007).
  69. Atit, R. *et al.* Beta-catenin activation is necessary and sufficient to specify the dorsal dermal fate in the mouse. *Dev. Biol.* **296**, 164–76 (2006).
  70. Giralt, M. & Villarroya, F. White, brown, beige/brite: different adipose cells for different functions? *Endocrinology* **154**, 2992–3000 (2013).
  71. Spalding, K. L. *et al.* Dynamics of fat cell turnover in humans. *Nature* **453**, 783–787 (2008).
  72. Wang, Q. A., Tao, C., Gupta, R. K. & Scherer, P. E. Tracking adipogenesis during white adipose tissue development, expansion and regeneration. *Nat. Med.* **19**, 1338–1344 (2013).
  73. Jo, J. *et al.* Hypertrophy and/or Hyperplasia: Dynamics of Adipose Tissue Growth. *PLoS Comput. Biol.* **5**, e1000324 (2009).
  74. Drolet, R. *et al.* Hypertrophy and hyperplasia of abdominal adipose tissues in women. *Int. J. Obes. (Lond)*. **32**, 283–91 (2008).
  75. Faust, I. M., Johnson, P. R., Stern, J. S. & Hirsch, J. Diet-induced adipocyte number increase in adult rats: a new model of obesity. *Am. J. Physiol.* **235**, E279–E286 (1978).
  76. Hirsch, J. & Han, P. W. Cellularity of rat adipose tissue: effects of growth, starvation, and obesity. *J. Lipid Res.* **10**, 77–82 (1969).
  77. Garaulet, M., Hernandez-Morante, J. J., Lujan, J., Tebar, F. J. & Zamora, S. Relationship between fat cell size and number and fatty acid composition in adipose tissue from different fat depots in overweight/obese humans. *Int. J. Obes. (Lond)*. **30**, 899–905 (2006).
  78. Björntorp, P., Gustafson, A. & Persson, B. Adipose tissue fat cell size and number in relation to metabolism in endogenous hypertriglyceridemia. *Acta Med. Scand.* **190**, 363–7 (1971).
  79. Lee, M.-J., Wu, Y. & Fried, S. K. Adipose tissue heterogeneity: implication of depot differences in adipose tissue for obesity complications. *Mol. Aspects Med.* **34**, 1–11 (2013).
  80. Kissebah, A. H. & Krakower, G. R. Regional adiposity and morbidity. *Physiol. Rev.* **74**, 761–811 (1994).

81. Armani, A. *et al.* Cellular models for understanding adipogenesis, adipose dysfunction, and obesity. *J. Cell. Biochem.* **110**, 564–572 (2010).
82. Rodeheffer, M. S., Birsoy, K. & Friedman, J. M. Identification of white adipocyte progenitor cells in vivo. *Cell* **135**, 240–249 (2008).
83. Maumus, M. *et al.* Native human adipose stromal cells: localization, morphology and phenotype. *Int. J. Obes.* **2005** **35**, 1141–1153 (2011).
84. Tang, W. *et al.* White fat progenitor cells reside in the adipose vasculature. *Science* (80-. ). **322**, 583–586 (2008).
85. Maumus, M. *et al.* Evidence of in situ proliferation of adult adipose tissue-derived progenitor cells: influence of fat mass microenvironment and growth. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **93**, 4098–106 (2008).
86. Gupta, R. K. *et al.* Transcriptional control of preadipocyte determination by Zfp423. *Nature* **464**, 619–23 (2010).
87. Hata, A. *et al.* OAZ uses distinct DNA- and protein-binding zinc fingers in separate BMP-Smad and Olf signaling pathways. *Cell* **100**, 229–40 (2000).
88. Lefterova, M. I. & Lazar, M. a. New developments in adipogenesis. *Trends Endocrinol. Metab. TEM* **20**, 107–114 (2009).
89. Gregoire, F. M., Smas, C. M. & Sul, H. S. Understanding adipocyte differentiation. *Physiol. Rev.* **78**, 783–809 (1998).
90. Caprio, M. *et al.* Pivotal role of the mineralocorticoid receptor in corticosteroid-induced adipogenesis. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **21**, 2185–2194 (2007).
91. Kim, K.-A., Kim, J.-H., Wang, Y. & Sul, H. S. Pref-1 (preadipocyte factor 1) activates the MEK/extracellular signal-regulated kinase pathway to inhibit adipocyte differentiation. *Mol. Cell. Biol.* **27**, 2294–2308 (2007).
92. Wang, Y., Hudak, C. & Sul, H. S. Role of preadipocyte factor 1 in adipocyte differentiation. *Clin. Lipidol.* **5**, 109–115 (2010).
93. Smas, C. M., Chen, L., Zhao, L., Latasa, M. J. & Sul, H. S. Transcriptional repression of pref-1 by glucocorticoids promotes 3T3-L1 adipocyte differentiation. *J. Biol. Chem.* **274**, 12632–41 (1999).
94. Krishnan, V., Bryant, H. U. & Macdougald, O. A. Regulation of bone mass by Wnt signaling. *J. Clin. Invest.* **116**, 1202–9 (2006).
95. Longo, K. A. *et al.* Wnt10b inhibits development of white and brown adipose tissues. *J. Biol. Chem.* **279**, 35503–9 (2004).
96. Madsen, M. S., Siersbæk, R., Boergesen, M., Nielsen, R. & Mandrup, S. PPAR $\gamma$  and C/EBP $\alpha$  Synergistically Activate Key Metabolic Adipocyte Genes by Assisted Loading. *Mol. Cell. Biol.* (2013). doi:10.1128/MCB.01344-13

97. Rosen, E. D. & MacDougald, O. a. Adipocyte differentiation from the inside out. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **7**, 885–896 (2006).
98. Farmer, S. R. Regulation of PPARgamma activity during adipogenesis. *Int. J. Obes. (Lond).* **29 Suppl 1**, S13–6 (2005).
99. Lefterova, M. I. *et al.* PPARgamma and C/EBP factors orchestrate adipocyte biology via adjacent binding on a genome-wide scale. *Genes Dev.* **22**, 2941–52 (2008).
100. Kersten, S. Mechanisms of nutritional and hormonal regulation of lipogenesis. *EMBO Rep.* **2**, 282–6 (2001).
101. Wu, Z. *et al.* Cross-regulation of C/EBP alpha and PPAR gamma controls the transcriptional pathway of adipogenesis and insulin sensitivity. *Mol. Cell* **3**, 151–8 (1999).
102. Wu, Z., Xie, Y., Morrison, R. F., Bucher, N. L. & Farmer, S. R. PPARgamma induces the insulin-dependent glucose transporter GLUT4 in the absence of C/EBPalph during the conversion of 3T3 fibroblasts into adipocytes. *J. Clin. Invest.* **101**, 22–32 (1998).
103. Adamczak, M. & Wiecek, A. The adipose tissue as an endocrine organ. *Semin. Nephrol.* **33**, 2–13 (2013).
104. Friedman, J. M., Leibel, R. L. & Bahary, N. Molecular mapping of obesity genes. *Mamm. Genome* **1**, 130–44 (1991).
105. Friedman, J. M. & Halaas, J. L. Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature* **395**, 763–70 (1998).
106. Kadowaki, T. & Yamauchi, T. Adiponectin and adiponectin receptors. *Endocr. Rev.* **26**, 439–51 (2005).
107. Astapova, O. & Leff, T. Adiponectin and PPARy: cooperative and interdependent actions of two key regulators of metabolism. *Vitam. Horm.* **90**, 143–62 (2012).
108. Mohamed-Ali, V. *et al.* Subcutaneous adipose tissue releases interleukin-6, but not tumor necrosis factor-alpha, in vivo. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **82**, 4196–200 (1997).
109. Gregoire, F. M. Adipocyte differentiation: from fibroblast to endocrine cell. *Exp. Biol. Med. (Maywood)*. **226**, 997–1002 (2001).
110. Stephen W. Barthold, Kathryn A. Bayne, Myrtle A. Davis, J. I. E. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. (2011).
111. Giovambattista, A., Chisari, A. N., Gaillard, R. C. & Spinedi, E. Food intake-induced leptin secretion modulates hypothalamo-pituitary-adrenal axis response and hypothalamic Ob-Rb expression to insulin administration. *Neuroendocrinology* **72**, 341–9 (2000).
112. Spinedi, E., Giacomini, M., Jacquier, M. C. & Gaillard, R. C. Changes in the hypothalamo-corticotrope axis after bilateral adrenalectomy: evidence for a median eminence site of glucocorticoid action. *Neuroendocrinology* **53**, 160–70 (1991).



113. Perelló, M., Gaillard, R. C., Chisari, A. & Spinedi, E. Adrenal enucleation in MSG-damaged hyperleptinemic male rats transiently restores adrenal sensitivity to leptin. *Neuroendocrinology* **78**, 176–84 (2003).
114. Tchoukalova, Y. D., Harteneck, D. a, Karwoski, R. a, Tarara, J. & Jensen, M. D. A quick, reliable, and automated method for fat cell sizing. *J. Lipid Res.* **44**, 1795–1801 (2003).
115. Chen, J., Dodson, M. V & Jiang, Z. Cellular and molecular comparison of redifferentiation of intramuscular- and visceral-adipocyte derived progeny cells. *Int. J. Biol. Sci.* **6**, 80–88 (2010).
116. Grégoire, F., Todoroff, G., Hauser, N. & Remacle, C. The stroma-vascular fraction of rat inguinal and epididymal adipose tissue and the adipoconversion of fat cell precursors in primary culture. *Biol. cell under auspices Eur. Cell Biol. Organ.* **69**, 215–222 (1990).
117. Stefan, N. *et al.* Identification and characterization of metabolically benign obesity in humans. *Arch. Intern. Med.* **168**, 1609–16 (2008).
118. Isakson, P., Hammarstedt, A., Gustafson, B. & Smith, U. Impaired preadipocyte differentiation in human abdominal obesity role of Wnt, tumor necrosis factor- $\alpha$ , and inflammation. *Diabetes* **58**, 1550–1557 (2009).
119. Lee, Y. *et al.* Liporegulation in diet-induced obesity. The antisteatotic role of hyperleptinemia. *J. Biol. Chem.* **276**, 5629–35 (2001).
120. Moreno, G. *et al.* Impact of transient correction of increased adrenocortical activity in hypothalamo-damaged, hyperadipose female rats. *Int. J. Obes. (Lond)*. **30**, 73–82 (2006).
121. Ros Pérez, M. & Medina-Gómez, G. [Obesity, adipogenesis and insulin resistance]. *Endocrinol. Nutr.* **58**, 360–9 (2011).
122. Macho, L., Ficková, M., Jezová & Zórad, S. Late effects of postnatal administration of monosodium glutamate on insulin action in adult rats. *Physiol. Res.* **49 Suppl 1**, S79–85 (2000).
123. Fruebis, J. *et al.* Proteolytic cleavage product of 30-kDa adipocyte complement-related protein increases fatty acid oxidation in muscle and causes weight loss in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 2005–10 (2001).
124. Yamauchi, T. *et al.* The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipoatrophy and obesity. *Nat. Med.* **7**, 941–6 (2001).
125. Wozniak, S. E., Gee, L. L., Wachtel, M. S. & Frezza, E. E. Adipose Tissue: The New Endocrine Organ? A Review Article. *Dig. Dis. Sci.* **54**, 1847–1856 (2008).
126. Münzberg, H. & Myers, M. G. Molecular and anatomical determinants of central leptin resistance. *Nat. Neurosci.* **8**, 566–70 (2005).
127. El-Haschimi, K., Pierroz, D. D., Hileman, S. M., Bjørbaek, C. & Flier, J. S. Two defects contribute to hypothalamic leptin resistance in mice with diet-induced obesity. *J. Clin. Invest.* **105**, 1827–32 (2000).

128. Perello, M., Castrogiovanni, D., Giovambattista, A., Gaillard, R. C. & Spinedi, E. Prolonged but not short negative energy condition restored corticoadrenal leptin sensitivity in the hypothalamic obese rat. *Neuroendocrinology* **89**, 276–287 (2009).
129. Van Heek, M. *et al.* Diet-induced obese mice develop peripheral, but not central, resistance to leptin. *J. Clin. Invest.* **99**, 385–90 (1997).
130. Zhang, W., Della-Fera, M. A., Hartzell, D. L., Hausman, D. & Baile, C. a. Adipose tissue gene expression profiles in ob/ob mice treated with leptin. *Life Sci.* **83**, 35–42 (2008).
131. Freedman, M. R., Horwitz, B. A. & Stern, J. S. Effect of adrenalectomy and glucocorticoid replacement on development of obesity. *Am. J. Physiol.* **250**, R595–607 (1986).
132. Ljung, T., Andersson, B., Bengtsson, B. A., Björntorp, P. & Mårin, P. Inhibition of cortisol secretion by dexamethasone in relation to body fat distribution: a dose-response study. *Obes. Res.* **4**, 277–82 (1996).
133. Strain, G. W. *et al.* Sex difference in the influence of obesity on the 24 hr mean plasma concentration of cortisol. *Metabolism.* **31**, 209–12 (1982).
134. Newell-Price, J., Bertagna, X., Grossman, A. B. & Nieman, L. K. Cushing's syndrome. *Lancet* **367**, 1605–17 (2006).
135. Rosmond, R., Dallman, M. F. & Björntorp, P. Stress-related cortisol secretion in men: relationships with abdominal obesity and endocrine, metabolic and hemodynamic abnormalities. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **83**, 1853–9 (1998).
136. Desvergne, B. & Wahli, W. Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism. *Endocr. Rev.* **20**, 649–88 (1999).
137. Lane, M. D., Tang, Q. Q. & Jiang, M. S. Role of the CCAAT enhancer binding proteins (C/EBPs) in adipocyte differentiation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **266**, 677–683 (1999).
138. Schoonjans, K. *et al.* PPARalpha and PPARGamma activators direct a distinct tissue-specific transcriptional response via a PPRE in the lipoprotein lipase gene. *EMBO J.* **15**, 5336–48 (1996).
139. Castelein, H. *et al.* The peroxisome proliferator activated receptor regulates malic enzyme gene expression. *J. Biol. Chem.* **269**, 26754–8 (1994).
140. Leyvraz, C. *et al.* Selective effects of PPARGamma agonists and antagonists on human pre-adipocyte differentiation. *Diabetes. Obes. Metab.* **12**, 195–203 (2010).
141. Wang, N. D. *et al.* Impaired energy homeostasis in C/EBP alpha knockout mice. *Science* **269**, 1108–12 (1995).
142. Maumus, M. *et al.* Evidence of in situ proliferation of adult adipose tissue-derived progenitor cells: influence of fat mass microenvironment and growth. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **93**, 4098–4106 (2008).



143. Cawthorn, W. P., Scheller, E. L. & MacDougald, O. A. Adipose tissue stem cells meet preadipocyte commitment: going back to the future. *J. Lipid Res.* **53**, 227–46 (2012).
144. Miranville, a *et al.* Improvement of postnatal neovascularization by human adipose tissue-derived stem cells. *Circulation* **110**, 349–55 (2004).
145. Rosen, E. D. & Spiegelman, B. M. Molecular regulation of adipogenesis. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **16**, 145–71 (2000).
146. Ross, S. E. *et al.* Inhibition of adipogenesis by Wnt signaling. *Science* **289**, 950–3 (2000).
147. Bennett, C. N. *et al.* Regulation of Wnt signaling during adipogenesis. *J. Biol. Chem.* **277**, 30998–1004 (2002).
148. Mak, W., Shao, X., Dunstan, C. R., Seibel, M. J. & Zhou, H. Biphasic glucocorticoid-dependent regulation of Wnt expression and its inhibitors in mature osteoblastic cells. *Calcif. Tissue Int.* **85**, 538–45 (2009).
149. Pantoja, C., Huff, J. T. & Yamamoto, K. R. Glucocorticoid Signaling Defines a Novel Commitment State during Adipogenesis In Vitro. *Mol. Biol. Cell* **19**, 4032–4041 (2008).
150. Hoppmann, J. *et al.* The balance between gluco- and mineralo-corticoid action critically determines inflammatory adipocyte responses. *J. Endocrinol.* **204**, 153–64 (2010).
151. Caprio, M. *et al.* Antiadipogenic effects of the mineralocorticoid receptor antagonist drospirenone: potential implications for the treatment of metabolic syndrome. *Endocrinology* **152**, 113–125 (2011).
152. Joyner, J., Hutley, L. & Cameron, D. Intrinsic regional differences in androgen receptors and dihydrotestosterone metabolism in human preadipocytes. *Horm. Metab. Res.* **34**, 223–8 (2002).
153. Arriza, J. L. *et al.* Cloning of human mineralocorticoid receptor complementary DNA: structural and functional kinship with the glucocorticoid receptor. *Science* **237**, 268–75 (1987).
154. Lee, M.-J. & Fried, S. K. The glucocorticoid receptor, not the mineralocorticoid receptor, plays the dominant role in adipogenesis and adipokine production in human adipocytes. *Int. J. Obes. (Lond)*. (2014). doi:10.1038/ijo.2014.6
155. Toneatto, J. *et al.* Dynamic mitochondrial-nuclear redistribution of the immunophilin FKBP51 is regulated by the PKA signaling pathway to control gene expression during adipocyte differentiation. *J. Cell Sci.* **126**, 5357–68 (2013).
156. Moreno, G. *et al.* Impact of transient correction of increased adrenocortical activity in , hypothalamo-damaged , hyperadipose female rats Address all correspondence to : (2006).
157. Ruderman, N., Chisholm, D., Pi-Sunyer, X. & Schneider, S. The metabolically obese, normal-weight individual revisited. *Diabetes* **47**, 699–713 (1998).

158. Wang, M.-Y. *et al.* Adipogenic capacity and the susceptibility to type 2 diabetes and metabolic syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 6139–44 (2008).
159. Hammarstedt, A., Sopasakis, V. R., Gogg, S., Jansson, P.-A. & Smith, U. Improved insulin sensitivity and adipose tissue dysregulation after short-term treatment with pioglitazone in non-diabetic, insulin-resistant subjects. *Diabetologia* **48**, 96–104 (2005).
160. O'Connell, J., Lynch, L., Hogan, A., Cawood, T. J. & O'Shea, D. Preadipocyte factor-1 is associated with metabolic profile in severe obesity. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **96**, E680–4 (2011).
161. Permana, P. A. *et al.* Subcutaneous abdominal preadipocyte differentiation in vitro inversely correlates with central obesity. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **286**, E958–62 (2004).
162. Nardelli, T. R. *et al.* Taurine prevents fat deposition and ameliorates plasma lipid profile in monosodium glutamate-obese rats. *Amino Acids* **41**, 901–8 (2011).
163. Cusi, K. The role of adipose tissue and lipotoxicity in the pathogenesis of type 2 diabetes. *Curr. Diab. Rep.* **10**, 306–15 (2010).
164. Rebuffé-Scrive, M., Krotkiewski, M., Elfverson, J. & Björntorp, P. Muscle and adipose tissue morphology and metabolism in Cushing's syndrome. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **67**, 1122–8 (1988).
165. Wagoner, B., Hausman, D. B. & Harris, R. B. S. Direct and indirect effects of leptin on preadipocyte proliferation and differentiation. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **290**, R1557–64 (2006).
166. Machinal-Quélin, F., Dieudonné, M. N., Leneuve, M. C., Pecquery, R. & Giudicelli, Y. Proadipogenic effect of leptin on rat preadipocytes in vitro: activation of MAPK and STAT3 signaling pathways. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **282**, C853–C863 (2002).
167. Kim, W. K. *et al.* Effects of leptin on lipid metabolism and gene expression of differentiation-associated growth factors and transcription factors during differentiation and maturation of 3T3-L1 preadipocytes. *Endocr. J.* **55**, 827–837 (2008).
168. Ambati, S. *et al.* Effects of leptin on apoptosis and adipogenesis in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem. Pharmacol.* **73**, 378–384 (2007).
169. Wang, M.-Y. *et al.* Adipogenic capacity and the susceptibility to type 2 diabetes and metabolic syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 6139–44 (2008).
170. Rhee, S. D., Sung, Y.-Y., Jung, W. H. & Cheon, H. G. Leptin inhibits rosiglitazone-induced adipogenesis in murine primary adipocytes. *Mol. Cell. Endocrinol.* **294**, 61–69 (2008).
171. Villena, J. A. *et al.* Resistance to high-fat diet-induced obesity but exacerbated insulin resistance in mice overexpressing preadipocyte factor-1 (Pref-1): a new model of partial lipodystrophy. *Diabetes* **57**, 3258–66 (2008).

172. Johnson, R. J. *et al.* Potential role of sugar (fructose) in the epidemic of hypertension, obesity and the metabolic syndrome, diabetes, kidney disease, and cardiovascular disease. *Am. J. Clin. Nutr.* **86**, 899–906 (2007).
173. Kohen-Avramoglu, R., Theriault, A. & Adeli, K. Emergence of the metabolic syndrome in childhood: an epidemiological overview and mechanistic link to dyslipidemia. *Clin. Biochem.* **36**, 413–20 (2003).
174. Alzamendi, A. *et al.* Effect of pioglitazone on the fructose-induced abdominal adipose tissue dysfunction. *PPAR Res.* **2012**, 259093 (2012).
175. Fariña, J. P. *et al.* Antioxidant treatment prevents the development of fructose-induced abdominal adipose tissue dysfunction. *Clin. Sci. (Lond).* **125**, 87–97 (2013).
176. Stanhope, K. L. *et al.* Consuming fructose-sweetened, not glucose-sweetened, beverages increases visceral adiposity and lipids and decreases insulin sensitivity in overweight/obese humans. *J. Clin. Invest.* **119**, 1322–34 (2009).
177. Lundgren, M. *et al.* Fat cell enlargement is an independent marker of insulin resistance and “hyperleptinaemia”. *Diabetologia* **50**, 625–33 (2007).
178. Skurk, T., Alberti-Huber, C., Herder, C. & Hauner, H. Relationship between adipocyte size and adipokine expression and secretion. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **92**, 1023–33 (2007).
179. Wåhlen, K., Sjölin, E. & Löfgren, P. Role of fat cell size for plasma leptin in a large population based sample. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes* **119**, 291–4 (2011).
180. Parks, E. J., Skokan, L. E., Timlin, M. T. & Dingfelder, C. S. Dietary sugars stimulate fatty acid synthesis in adults. *J. Nutr.* **138**, 1039–46 (2008).
181. Chong, M. F.-F., Fielding, B. A. & Frayn, K. N. Mechanisms for the acute effect of fructose on postprandial lipemia. *Am. J. Clin. Nutr.* **85**, 1511–20 (2007).
182. Michaud, A. *et al.* Abdominal subcutaneous and omental adipocyte morphology and its relation to gene expression, lipolysis and adipocytokine levels in women. *Metabolism*. **63**, 372–81 (2014).
183. Wueest, S., Rapold, R. A., Rytka, J. M., Schoenle, E. J. & Konrad, D. Basal lipolysis, not the degree of insulin resistance, differentiates large from small isolated adipocytes in high-fat fed mice. *Diabetologia* **52**, 541–6 (2009).
184. Crescenzo, R. *et al.* Adipose tissue remodeling in rats exhibiting fructose-induced obesity. *Eur. J. Nutr.* **53**, 413–9 (2014).
185. Maffei, M. *et al.* Increased expression in adipocytes of ob RNA in mice with lesions of the hypothalamus and with mutations at the db locus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**, 6957–60 (1995).
186. Couillard, C. *et al.* Hyperleptinemia is more closely associated with adipose cell hypertrophy than with adipose tissue hyperplasia. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* **24**, 782–8 (2000).

187. Vilà, L. *et al.* Suppressor of cytokine signaling-3 (SOCS-3) and a deficit of serine/threonine (Ser/Thr) phosphoproteins involved in leptin transduction mediate the effect of fructose on rat liver lipid metabolism. *Hepatology* **48**, 1506–16 (2008).
188. Capurso, C. & Capurso, A. From excess adiposity to insulin resistance: the role of free fatty acids. *Vascul. Pharmacol.* **57**, 91–7 (2012).
189. Choi, S. H. & Ginsberg, H. N. Increased very low density lipoprotein (VLDL) secretion, hepatic steatosis, and insulin resistance. *Trends Endocrinol. Metab.* **22**, 353–63 (2011).
190. Dekker, M. J., Su, Q., Baker, C., Rutledge, A. C. & Adeli, K. Fructose: a highly lipogenic nutrient implicated in insulin resistance, hepatic steatosis, and the metabolic syndrome. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **299**, E685–94 (2010).
191. Huang, B.-W., Chiang, M.-T., Yao, H.-T. & Chiang, W. The effect of high-fat and high-fructose diets on glucose tolerance and plasma lipid and leptin levels in rats. *Diabetes. Obes. Metab.* **6**, 120–6 (2004).
192. Du, L. & Heaney, A. P. Regulation of adipose differentiation by fructose and GluT5. *Mol. Endocrinol.* **26**, 1773–82 (2012).
193. Gustafson, B. *et al.* Inflammation and impaired adipogenesis in hypertrophic obesity in man. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **297**, E999–E1003 (2009).
194. Heinonen, S. *et al.* Adipocyte morphology and implications for metabolic derangements in acquired obesity. *Int. J. Obes. (Lond)*. (2014). doi:10.1038/ijo.2014.31
195. Macotela, Y. *et al.* Intrinsic Differences in Adipocyte Precursor Cells From Different White Fat Depots. *Diabetes* **61**, 1691–9 (2012).
196. Joe, A. W. B., Yi, L., Even, Y., Vogl, A. W. & Rossi, F. M. V. Depot-specific differences in adipogenic progenitor abundance and proliferative response to high-fat diet. *Stem Cells* **27**, 2563–70 (2009).
197. Cristancho, A. G. & Lazar, M. a. Forming functional fat: a growing understanding of adipocyte differentiation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **12**, 722–734 (2011).
198. Gustafson, B. & Smith, U. The WNT Inhibitor Dickkopf 1 and Bone Morphogenetic Protein 4 Rescue Adipogenesis in Hypertrophic Obesity in Humans. *Diabetes* **61**, 1217–1224 (2012).
199. Sørensen, A. L. *et al.* Lineage-specific promoter DNA methylation patterns segregate adult progenitor cell types. *Stem Cells Dev.* **19**, 1257–66 (2010).
200. Akar, F. *et al.* High-fructose corn syrup causes vascular dysfunction associated with metabolic disturbance in rats: protective effect of resveratrol. *Food Chem. Toxicol.* **50**, 2135–41 (2012).
201. Picard, F. *et al.* Sirt1 promotes fat mobilization in white adipocytes by repressing PPAR- $\gamma$ . *Nature* **429**, 771–6 (2004).

202. Okamura, M., Inagaki, T., Tanaka, T. & Sakai, J. Role of histone methylation and demethylation in adipogenesis and obesity. *Organogenesis* **6**, 24–32 (2010).
203. Pinnick, K. E. & Karpe, F. DNA methylation of genes in adipose tissue. *Proc. Nutr. Soc.* **70**, 57–63 (2011).