



**CARACTERIZACIÓN TRANSCRIPTÓMICA
DE CÉLULAS TRONCALES
MESENQUIMALES INDUCIDAS A
DIFERENCIARSE EN ADIPOCITOS**

**MÁSTER EN INVESTIGACIÓN
BIOMÉDICA TRASLACIONAL**

BELÉN PALOMARES CAÑERO



CARACTERIZACIÓN TRANSCRIPTÓMICA DE CÉLULAS TRONCALES MESENQUIMALES INDUCIDAS A DIFERENCIARSE EN ADIPOCITOS

VºBº Tutores:

José Manuel Quesada Gómez

Antonio Casado Díaz

ÍNDICE

1. Resumen	5
2. Introducción	6
3. Hipótesis y objetivos	10
3.1. <i>Objetivos generales</i>	11
3.2. <i>Objetivos específicos</i>	11
4. Material y métodos	11
4.1. <i>Obtención de células MSC</i>	11
4.2. <i>Diferenciación adipogénica y osteogénica</i>	12
4.3. <i>Tinciones histoquímicas “Oil Red y Alizarin Red”</i>	13
4.4. <i>Aislamiento de ARN para construcción de librerías superSAGE</i>	13
4.5. <i>Construcción y secuenciación de librerías SuperSAGE en adipogénesis</i>	14
4.6. <i>Análisis de enriquecimiento</i>	15
4.7. <i>Confirmación del perfil de expresión SuperSAGE mediante qRT-PCR</i>	15
4.8. <i>Análisis estadístico</i>	16
5. Resultados	16
5.1. <i>Diferenciación adipogénica y osteogénica</i>	16
5.2. <i>Análisis descriptivo de las librerías generadas por ST-DGE</i>	17
5.3. <i>Análisis de enriquecimiento</i>	18
5.4. <i>Confirmación del perfil de expresión SuperSAGE mediante qRT-PCR</i>	22
6. Discusión	24
7. Conclusión	29
8. Bibliografía	30

ABREVIATURAS

MSC: Células troncales mesenquimales o células mesenquimales del estroma.

ISCT: Sociedad Internacional de Terapia Celular.

DM2: Diabetes tipo 2.

MO: Médula ósea.

α -MEM: Medio esencial mínimo α .

bFGF: Factor de crecimiento de fibroblastos básico.

FBS: Suero fetal bovino.

DAVID: Base de datos Anotación, Visualización y Descubrimiento Integrado.

GO: Ontología génica.

KEGG: Enciclopedia de genes y genomas Kioto.

PPAR γ : *receptor gamma activado por el factor proliferador de peroxisomas*

C/EBPs: *proteínas de unión al potenciador CCAAT*

FABP4: *proteína de unión a ácidos grasos 4*

LPL: *lipoproteína lipasa*

ADIPOQ: *adiponectina*

ACSL1/ACSL5: *acil-CoA sintetasa de larga cadena, miembro de la familia 1/5*

TGFB1: *factor de crecimiento transformante, beta 1*

PRRX2: *par relacionado con homeobox 2*

CH3L1: *Quitinasa 3-de tipo 1 (glicoproteína 39 de cartílago)*

NDST1: *Glucosaminil-N-deacetilasa/N-sulfotransferasa-1*

HDACs: Histonas deacetilasas

MEC: Matriz extracelular

ADH1B: *alcohol deshidrogenasa 1B*

ACADS: *acil-CoA deshidrogenasa de cadena corta de C-2 a C-3*

HADHB: *hidroxiacil-CoA deshidrogenasa / 3 cetoacil-CoA tiolasa / enoil-CoA hidratasa (proteína trifuncional), subunidad beta*

WDTC1: *WD y tetratricopeptido 1*

TRB3: *homólogo 3 de Tribbles*

CARACTERIZACIÓN TRANSCRIPTÓMICA DE CÉLULAS TRONCALES MESENQUIMALES INDUCIDAS A DIFERENCIARSE EN ADIPOCITOS

1. RESUMEN

La inducción de la diferenciación de células troncales mesenquimales (MSC) en adipocitos supone un complejo y altamente organizado programa de expresión génica. Son muchos los estudios realizados en este campo con el fin aumentar el conocimiento del desarrollo de la adipogénesis, incluyendo todas las vías y factores que influyen en la determinación de que las células MSC se diferencien en adipocitos. La comprensión del proceso adipogénico y su regulación tiene una gran relevancia para el conocimiento de los procesos implicados en enfermedades como la obesidad y la diabetes, las cuales en los últimos tiempos son consideradas como epidémicas a nivel mundial. Con el objeto de profundizar en el conocimiento del proceso de diferenciación adipogénica, en el presente estudio hemos determinado mediante expresión diferencial a nivel de transcriptoma, genes, funciones moleculares y vías metabólicas implicados en el proceso de diferenciación de MSC a adipocitos in vitro. Los resultados muestran como la vía del factor de transcripción PPAR γ es la que principalmente se activa durante la adipogénesis.

2. INTRODUCCIÓN

Las células troncales mesenquimales, también conocidas como células mesenquimales del estroma o MSC (acrónimo del inglés, Mesenchymal Stem Cells o Mesenchymal Stromal Cells) son células multipotentes de elevada plasticidad. Se encuentran ampliamente distribuidas *in vivo*, pudiendo ser aisladas de médula ósea, periostio, membrana sinovial, grasa, sangre del cordón umbilical, sangre periférica, hígado fetal y pulmón, entre otras. No obstante, la fuente de MSC más utilizada es la médula ósea, donde están incluidas en el estroma [1]. Owen y Friedenstein fueron los primeros en describir este tipo de células derivadas de la médula ósea [2]. En las últimas décadas, los estudios llevados a cabo con estas células se han incrementado enormemente debido al elevado interés a nivel tanto biológico básico como clínico. Sin embargo, este gran interés originó inconsistencias y ambigüedades en su uso. Debido a esto, la Sociedad Internacional de Terapia Celular (ISCT) ha detallado los criterios mínimos que debe cumplir una célula para ser considerada MSC [3]:

- Las MSC deben ser adherentes a plástico en condiciones de cultivo estándar utilizando frascos de cultivo de tejidos.
- Cuando son medidas por citometría de flujo $\geq 95\%$ de la población de MSC debe expresar CD105, CD73 y CD90. Además, estas células deben carecer de expresión ($\leq 2\%$ positivas) de CD45, CD34, CD14 o CD11b, CD79a o CD19 y HLA de clase II.
- Las células deben ser capaces de diferenciarse *in vitro* en osteoblastos, adipocitos y condroblastos bajo condiciones estándar de diferenciación.

A pesar de los criterios mínimos de diferenciación establecidos por la ISCT, se ha demostrado que bajo estímulos específicos poseen la increíble capacidad de diferenciación en un linaje mesodérmico (miocito, osteocito, endotelio, adipocito, y cardiomiocito), ectodérmico (neuronal) o endodérmico (hepática, páncreas, epitelio respiratorio). Sin embargo, esta competencia debe ser cuidadosamente investigada pues, en ocasiones no se ha podido demostrar la funcionalidad de las células obtenidas [4].

La diferenciación *in vitro* de MSC a adipocitos (Figura 1) supone un proceso de eventos muy bien organizado y controlado por numerosos factores de transcripción, factores de

crecimiento, citocinas y moléculas extracelulares. Los inductores adipogénicos que inician el proceso de diferenciación incluyen ligandos del receptor gamma activado por proliferadores peroxisomales (PPAR γ), agonistas de glucocorticoides, glucosa y algún agente que aumente la concentración de AMPc intracelular [3].

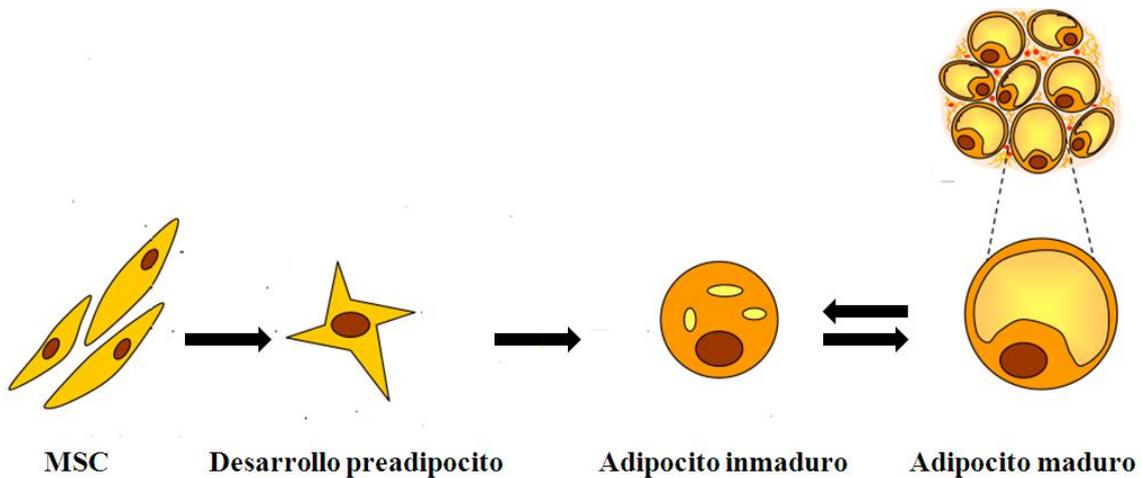


Fig.1. Diferenciación a adipocito. Las flechas en ambos sentidos indican la capacidad del adipocito de retroceder a la fase anterior ante situaciones de escasez de energía (ej; pérdida de peso).

La adipogénesis incluye dos fases principales: Una fase de determinación y una fase de diferenciación terminal. En la primera, la célula MSC se compromete hacia una línea adipogénica, perdiendo su capacidad para diferenciarse hacia otra de las posibles líneas de diferenciación de las mesenquimales, y se transforma en preadipocito. En esta fase, las características morfológicas son indistinguibles de las de sus precursoras, sin embargo, lo que sí tiene lugar es la expresión génica de genes que van a controlar la expresión de otros que serán los responsables de que, finalmente, el adipocito se convierta en maduro. Determinar que una célula MSC se encuentra comprometida hacia una línea adipogénica es difícil [5]. Su determinación es posible cuando se encuentra en la segunda fase, la fase de diferenciación terminal, donde se producen una serie de cambios cronológicos en la expresión génica hasta originar el fenotipo exacto de un adipocito maduro, el cual puede sintetizar y transportar lípidos y secretar proteínas específicas de los adipocitos. La diferenciación está condicionada por la comunicación entre las células y el medio extracelular.

La adipogénesis está implicada en diferentes enfermedades. Las alteraciones en la fisiología del adipocito debido a malos hábitos, como puede ser una mala alimentación

y una vida sedentaria, junto a los diferentes factores de riesgo asociados al desarrollo de síndrome metabólico y a enfermedad cardiovascular, puede ser el comienzo hacia una inestabilidad metabólica. El aumento de adipocitos conlleva un aumento en las concentraciones de adipocinas proinflamatorias circulantes originando un estado inflamatorio crónico que puede dar lugar a alteraciones cardiovasculares y enfermedades inflamatorias [6].

En 2003, dos estudios demostraron simultáneamente que en casos de obesidad se producía una filtración de macrófagos al interior del tejido adiposo. Así, se mostró por primera vez la estrecha relación existente entre las células inmunes y metabólicas y se explicó el origen de citoquinas derivadas del tejido adiposo. Los macrófagos infiltrados se clasificaron en dos subtipos: M1 o clásicamente activados, que secretan citoquinas proinflamatorias como el factor de necrosis tumoral e interleucina 6, producen estrés oxidativo y causan resistencia a insulina, y M2 o alternativamente activados, secretores de interleucina 10, interleucina 1 y relacionados con la remodelación tisular. En situaciones de obesidad predomina el subtipo M1 provocando un nivel más elevado de citoquinas proinflamatorias y de especies reactivas de oxígeno (ROS), lo que ocasiona resistencia a la insulina [7][8]. La resistencia a la insulina presenta una historia natural que finalmente causa DM2. En un principio, la resistencia insulínica está compensada por exceso de producción de insulina, pero esta superproducción, finalmente, conducirá a un fracaso de células β pancreáticas que dejarán de sintetizar insulina, siendo necesaria administración externa. Generalmente, la DM2 es diagnosticada en esta última fase. La acumulación de adipocitos favorece la resistencia a la insulina relacionada, además de con la DM2, con otras enfermedades como hipertensión, hipercolesterolemia, dislipemia y esteatosis hepática.

Los adipocitos también se encuentran implicados en la osteoporosis. Un estudio realizado por Pierre Meunier et al. fue de los primeros en demostrar que la acumulación de adipocitos en la médula ósea de mujeres con osteoporosis es mayor que en mujeres sanas jóvenes en estudios histomorfométricos de biopsias de cresta iliaca [9]. Posteriormente, este hallazgo fue confirmado por diversos estudios, donde además se demostró una correlación negativa entre la grasa en médula ósea y la formación de hueso [10][11][12]. A su vez, también aumenta el riesgo de fractura ósea por compresión [13]. Diversos estudios muestran que esta alteración en la formación ósea,

debido al desequilibrio establecido a favor de la diferenciación de MSC a adipocitos frente a osteoblastos, está condicionada por cambios en el nicho celular, en especial la edad y menopausia.

El compromiso y posterior diferenciación de las MSC hacia un linaje adipogénico u osteogénico requiere la expresión y acción secuencial de una serie factores de transcripción [14]. La adipogénesis es promovida por el receptor gamma activado por proliferadores peroxisomales (PPAR γ), y la proteína de unión al potenciador CCAAT (C/EBP). Por otra parte, la osteoblastogénesis requiere el factor de transcripción Runx2/Cbfa1, osterix; y la vía de señalización Wnt. Diversos estudios han demostrado que PPAR γ , además de activar la diferenciación adipogénica, también regula negativamente la diferenciación osteogénica [15][16].

El PPAR γ pertenece a la superfamilia génica de receptores hormonales nucleares denominados PPAR, de los que hay tres subtipos, PPAR α , PPAR β/δ , PPAR γ , los cuales son activados por ácidos grasos poliinsaturados. Mientras que PPAR α y PPAR β/δ se expresan a lo largo del proceso de adipogénesis, PPAR γ lo hace al inicio de ésta. Existen dos isoformas de PPAR γ : PPAR γ 1 y PPAR γ 2. PPAR γ 1 se encuentra distribuido en muchos tejidos, sin embargo PPAR γ 2 se expresa, prácticamente de forma exclusiva, en el tejido adiposo. Es conocido como el principal inductor de adipogénesis pues es necesario y suficiente para que se produzca la diferenciación adipogénica.

C/EBPs pertenece a los factores de transcripción de proteínas con cremallera de leucina. Existen diferentes isoformas expresadas en adipocitos: C/EBP α , C/EBP β , C/EBP γ , C/EBP δ y el factor de transcripción homólogo a la proteína de unión a la caja CCAAT (CHOP). En el tejido adiposo, C/EBP α , C/EBP β y C/EBP δ favorecen la adipogénesis, sin embargo, C/EBP γ y CHOP la inhiben [17].

La diferenciación es llevada a cabo por una cascada de señalización donde se van produciendo diferentes interacciones moleculares. Durante la primera fase las células comienzan a perder la morfología fibroblástica y aumentan la expresión de **lipoproteínas de baja densidad** o LDL (del inglés *low density lipoproteins*). También están implicados los factores de transcripción C/EBP β y C/EBP δ que activan PPAR γ y C/EBP α , que a su vez activan a la mayoría de los genes implicados en alcanzar el

fenotipo maduro (Fig.2) [18]. Durante esta fase de maduración, en el citoplasma van apareciendo gotas lipídicas, las cuales aumentan de tamaño y se fusionan hasta que prácticamente todo el citoplasma es ocupado por una gran gota.

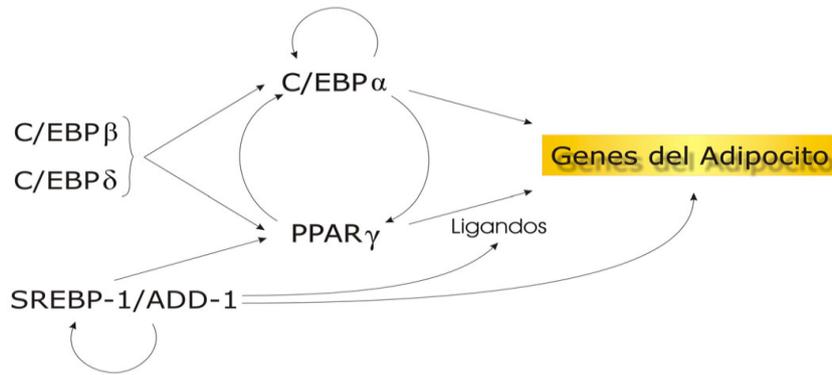


Fig.2. Factores de transcripción implicados en el inicio de la cascada de señalización de adipogénesis. Abreviaturas: C/EBP, proteínas de unión al potenciador CCAAT; PPAR γ , receptor gamma activado por el factor proliferador de peroxisomas; SREBP-1/ADD-1, factor de diferenciación y determinación de los adipocitos/proteína de unión a elementos de respuesta regulados por esteroides

Un mejor entendimiento de los mecanismos moleculares involucrados en la diferenciación de estas células podría facilitar el desarrollo de nuevas aplicaciones terapéuticas frente a enfermedades cuya prevalencia cada vez es mayor como son DM2 u osteoporosis.

3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

En la actualidad, la obesidad es una de las enfermedades con mayor prevalencia a nivel mundial, y tanto es así, que ha sido considerada como una de las epidemias del siglo XXI. La base de esta enfermedad se desarrolla por un desequilibrio en la homeostasis energética, en la cual el adipocito presenta un papel fundamental. Por este motivo, el aumento de la comprensión del complejo proceso de adipogénesis, desde la fase en la que una célula troncal se diferencia a un adipocito, puede ser de gran relevancia.

3.1 Objetivos generales

Determinar la expresión génica, funciones moleculares y vías metabólicas implicadas de manera significativa en la diferenciación de MSC a adipocitos.

3.2. Objetivos específicos

1. Evaluar la plasticidad de las células troncales mesenquimales al ser inducidas a diferenciarse a adipocitos y osteoblastos.
2. Construir librerías SuperSAGE del proceso de adipogénesis, así como realizar el análisis de enriquecimiento de las funciones moleculares (GO) y vías metabólicas implicadas (KEGG Pathway).
3. Validar el perfil de expresión SuperSAGE mediante qRT-PCR.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1. Obtención de células MSC

Las células MSC fueron obtenidas a partir de la médula ósea procedente de tres donantes reclutados a través del Programa de Trasplante de Médula Ósea del Servicio de Hematología presente en el Hospital Universitario Reina Sofía (Córdoba, España). Los tres donantes dieron su consentimiento informado.

El aislamiento de MSC a partir de médula ósea (MO) fue realizado siguiendo una metodología previamente optimizada [19]. Tres alícuotas de 3 mL de médula ósea, cada una procedente de un donante, fueron centrifugadas a 140 g y 4°C durante 10min. Se desechó el sobrenadante y sembramos 800 µl de la fracción celular en 2 flask de 75 cm² (Nunc, Kamstrupvej, Denmark) que contenían 15 mL α-MEM (Cambrex, East Rutherford, NJ, USA) suplementado con 15% de suero fetal bovino (FBS; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 2 mm UltraGlutamina (Cambrex), 100 U ampicilina, 0.1 mg estreptomycin/mL y 1 ng factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF)/mL (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA). Las células fueron crecidas en incubador a 37°C y 5% CO₂.

El medio de cultivo fue reemplazado cada 3-4 días. Los sucesivos cambios fueron eliminando eritrocitos y células no adherentes mientras las MSC, al ser células adherentes al plástico, continuaron creciendo. Aproximadamente a los 10 días se observaron diferentes colonias celulares en un estado cercano a la confluencia. Las células fueron tripsinizadas y subcultivadas en el mismo medio de cultivo a una densidad de 300 células/cm² en flask de 75 cm². Una vez alcanzada la confluencia, las MSC volvieron a ser tripsinizadas y subcultivadas en diferentes flask, placas P6 y P12 para la realización de los diferentes experimentos.

Estudios de citometría de flujo de estos cultivos confirmaron que se trataban de células MSC cuantificando aproximadamente un 99% de positividad para los marcadores de CD105, CD73 y CD90 y menos de un 2% para los marcadores CD34, CD14 y CD45 según criterio de la ISCT [3].

4.2. Diferenciación adipogénica y osteogénica

La diferenciación de las células MSC fue realizada siguiendo el protocolo previamente optimizado y publicado por nuestro grupo [19]. Las células MSC de cada donante fueron sembradas en α -MEM (suplementado al igual que se mencionó anteriormente) en placas P6 y placas P12 (TPP, Trasadingen, Switzerland) a una densidad de 500 células/cm². El medio se reemplazó cada 2-3 días hasta alcanzar, aproximadamente, un 85% de confluencia, momento en el que los cultivos fueron diferenciados a adipocitos, osteoblastos o se mantuvieron sin diferenciar para ser utilizados como controles. Para la diferenciación a osteoblastos, el medio, sin bFGF, fue suplementado con los inductores osteogénicos (10⁻⁸ M dexametasona, 0.2 mM ácido ascorbico y 10 mM β -glicerolfosfato), y para la diferenciación adipogénica con 5x10⁻⁷ M dexametasona, 0.5 mM isobutilmetilxantina y 50 mM indometacina. Todos los inductores usados procedieron de Sigma-Aldrich. Los medios de cultivo de las placas inducidas a diferenciación fueron reemplazados cada 2-3 días hasta el día 21. Las placas control recibieron los mismos cambios que las de diferenciación, utilizando como medio α -MEM con 10% FBS (medio sin inductores y sin bFGF).

4.3. Aislamiento de ARN para construcción de librerías superSAGE

Partimos del cultivo de MSC inducidas a diferenciación a adipocitos y de sus correspondientes controles en P6 de tres MO (M1, M2 y M3) procedentes de tres pacientes distintos. A dos tiempos diferentes (7 y 14 días), las células fueron lisadas utilizando la solución de lisis contenida en el kit mirVana miRNA isolation.

Según las células fuesen utilizadas para un experimento o para otro, se siguieron pasos diferentes:

- *Construcción de librerías:* El lisado celular de los dos tiempos y de las tres médulas inducidas a adipocitos se mezcló, originando una única muestra. Lo mismo se hizo con las células controles. De este modo, trabajamos solo con dos muestras “Adipocitos” y “Controles”.
- *Confirmación del perfil de expresión génica mediante qRT-PCR:* Nos quedamos, de forma independiente, con el lisado celular de cada MO a los diferentes tiempos.

Con el kit mencionado anteriormente, se extrajo el ARN total de todas las muestras siguiendo el protocolo del fabricante. En el caso de las muestras usadas para la construcción de las librerías, como el volumen de lisado celular del que partíamos excedía al que era posible usar por columna, fue necesaria la utilización de varias columnas por muestra. En el último paso, todos los ARN que procedían de la misma muestra se unieron y homogeneizaron. Además, se incluyó un tratamiento con DNasa (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA).

Una vez cuantificado el ARN extraído y testada su calidad mediante un espectrofotómetro NanoDrop ND-1000, se comprobó la integridad del ARN por electroforesis en un gel al 1,2% de agarosa. Las muestras de ARN se almacenaron a -80°C.

4.4. Tinciones histoquímicas “Oil Red y Alizarin Red”

Las células cultivadas en placas P12, a distintos tiempos del proceso de diferenciación (día 14 y 21), fueron fijadas y teñidas con la tinción Oil Red o Alizarin Red para corroborar su diferenciación. La tinción Oil Red permite identificar la presencia de

grasa en el interior de los adipocitos y la tinción Alizarin Red valora la mineralización de la matriz extracelular en la diferenciación osteogénica.

Tinción Oil Red: Las células fueron fijadas durante 20 min con formaldehído al 3,7%. Se lavaron con agua destilada y se tiñeron durante 20 minutos con una mezcla de 8,2 mL de Oil Red al 0,3% en isopropanol más 6,8 mL de agua destilada. Se volvieron a lavar con agua destilada y se tiñeron con hematoxilina. Tras volver a lavarlas con agua destilada, se observaron al microscopio electrónico y se fotografiaron.

Tinción Alizarin Red: Las células se fijaron durante 10 min con formaldehído al 3,7% y a continuación, tras un previo lavado con agua destilada, se tiñeron durante 45 minutos con una mezcla de 10 mL de Alizarin Red al 1% en agua más 1 mL de hidróxido de amonio al 1%. Las células en las placas fueron lavadas con agua destilada y una vez secas se observaron en el microscopio y se tomaron fotografías para su registro.

4.5. Construcción y secuenciación de librerías SuperSAGE en adipogénesis

Se utilizaron 5 µg de ARN por muestra para la construcción de la librería ST-DGE realizada por GenXPro GMBH (Frankfurt, Alemania) como describió Matsumura et al [20]. Los posibles errores producidos por la PCR, debido a la distinta eficiencia con la que son amplificados los fragmentos de ADN, fueron eliminados mediante la aplicación de la técnica “TraeQuant”, tal y como fue descrita por B. Rotter según patente de aplicación (WO2009152928) [21].

Se originaron dos librerías, una de la muestra de adipocitos y otra de la muestra controles. Para ambas librerías fue utilizada la enzima *NlaIII* (sitio de reconocimiento: 5'-CATG-3'). Las lecturas de cada librería fueron resumidas en número de transcritos únicos (UniTags) y se introdujeron en la base de datos RefSeq RNA. Los genes obtenidos se ordenaron de forma ascendente en base a la cuantificación de la expresión génica. Para la selección de genes expresados de forma significativa en adipocitos frente a controles se hizo uso del programa DEGseq ($p < 0.001$, $|\log > 1,32| = |\text{fold-change} > 2,5|$).

4.6. Análisis de enriquecimiento

Los genes seleccionados se cargaron en la base de datos Anotación, Visualización y Descubrimiento Integrado (DAVID). Se determinaron de las funciones moleculares (GO; Gene Ontology) y las rutas metabólicas (KEGG; Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) que se encuentran activadas o reprimidas en los genes seleccionados (Punto de corte de enriquecimiento de FDR <0,01).

4.7. Confirmación del perfil de expresión SuperSAGE mediante qRT-PCR

Los resultados obtenidos del análisis de expresión génica fueron confirmados mediante qRT-PCR. Se retrotranscribió 1µg de ARN total a ADNc usando iScript cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad, Hercules, CA USA) en 20µl.

La PCR a tiempo real se llevó a cabo con 1µl de ADNc y 10 pmoles de cada primer (Tabla1) usando el kit LightCycler 480 Resolight dye (Roche Applied Science). La PCR constó de una desnaturalización a 95°C durante 10 min, seguida de 45 ciclos de tres pasos: desnaturalización a 94°C durante 10s, anillamiento a 65°C durante 15s y extensión a 72°C durante 15s. Los resultados se normalizaron con el gen constitutivo de la PolR2A y se analizaron con el software LightCycler® 480, Version 1.5.

Genes	Secuencia del primer (5'--> 3')
<i>Quitinasa 3-de tipo 1 (glicoproteína 39 de cartílago) (CHI3L1)</i>	CGTCTCAAACAGGCTTTGTGGTC CGTAGAGCGTCACATCATTCCACT
<i>Glucosaminil-N-deacetilasa/N-sulfotransferasa-1 (NDST1)</i>	GGGCATCATTGGCTTCTCAAGG CAGCACTGGCTCATAGGTGGA
<i>Par relacionado con homeobox 2 (PRRX2)</i>	CCACCGCCCTGAGTCCAGA CTGAACTCCTTGGCCTTGAGACG
<i>Acil-CoA sintetasa de cadena larga miembro de familia 1 (ACSL1)</i>	CGAAGATCCGCACTACTTGACAG ATTCATAGGGTTGGTCTGGTTTCC
<i>Adiponectina (ADIPOQ)</i>	CATGACCAGGAAACCACGACTC CCGATGTCTCCCTTAGGACCA
<i>Lipoproteína lipasa (LPL)</i>	AAGAAGCAGCAAATGTACCTGAAG CCTGATTGGTATGGGTTTCACTC
<i>Proteína de unión a ácidos grasos 4 (FABP4)</i>	TCAGTGTGAATGGGGATGTGAT TCTGCACATGTACCAGGACACC
<i>ADN dirigida por ARN polimerasa II (POLR2A)</i>	TTTTGGTGACGACTTGAAGTGC CCATCTTGTCCACCACCTCTTC
<i>Factor de crecimiento transformante beta (TGFb)</i>	GTACCTGAACCCGTGTTGCTCT CGCACAACTCCGGTGACATCA
<i>Receptor gamma activado por el factor proliferador de peroxisomas (PPARG2)</i>	GCGATTCTTCACTGATACACTG GAGTGGGAGTGGTCTTCCATTAC

Tabla 1. Genes y oligos utilizados en el estudio de qRT-PCR.

4.8. Análisis estadístico

En las variables cuantitativas se calcularon los valores de la media \pm SEM (error estándar de la media). Para comparar los diferentes tratamientos, (MSC inducidas a diferenciación adipogénica vs. controles) se realizó la prueba U de Mann-Whitney, para datos no paramétricos, mediante el programa estadístico G-Stat versión 2.0. Se consideraron diferencias estadísticamente significativas cuando $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1. Diferenciación adipogénica y osteogénica

La figura 3 muestra que a los 21 días existe una clara diferencia entre las células inducidas a diferenciarse y las células control. Las células que estuvieron en presencia de inductores osteoblásticos, al someterse a la tinción Alizarin Red, dieron lugar a un precipitado rojizo indicando la presencia de mineralización (Figura 3a). Paralelamente, en las imágenes de microscopía óptica 10x (Figura 3b) apreciamos la acumulación de vesículas lipídicas en el citoplasma de las células inducidas a diferenciación adipogénica con la tinción Oil Red. La posterior tinción con hematoxilina permitió la identificación de los núcleos celulares.

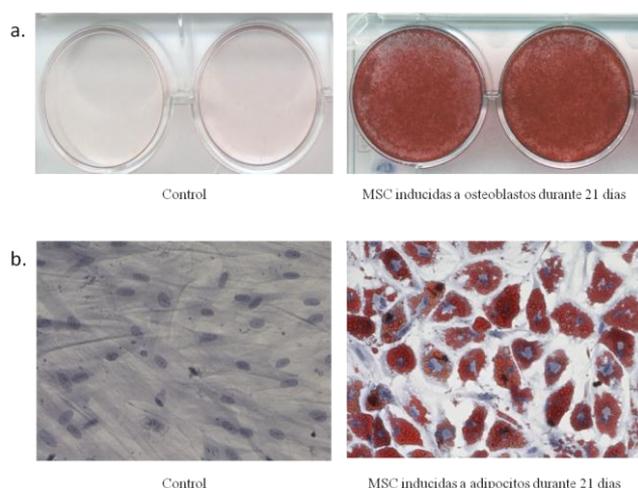


Figura 3. Diferenciación de células MSC a osteoblastos y adipocitos. A. Mineralización de células MSC inducidas a osteoblastos, puesta de manifiesto mediante la Tinción Alizarin Red. B. Tinción Oil Red de vesículas lipídicas en células MSC inducidas a adipocitos y control. En rojo vesículas teñidas con Oil Red y en azul núcleos teñidos con hematoxilina.

5.2. Análisis descriptivo de las librerías generadas por ST-DGE.

Fueron secuenciados un total de 11.117.879 Unitags en la muestra controles frente a 8.470.472 Unitags en la muestra adipocitos. De todos ellos, y tras la aplicación de la técnica “TraeQuant”, se seleccionaron un total de 3.702.636 Unitags en controles y 1.082.269 Unitags en adipocitos (Ver tabla 2), correspondiéndose con 13.223 genes. De estos genes, se consideraron expresados diferencialmente aquellos cuya diferencia de expresión fuera significativa con una $p < 0.001$ y además presentaran 2,5 veces de cambio de expresión ($\log_2(\text{cambio de expresión}) > 1,32$) entre control y adipocitos. Aplicando estos criterios se detectaron 2.765 genes expresados diferencialmente, lo que corresponde a un 20,9% de todos los genes identificados. De esos genes, 659 estaban activados en adipocitos y 2.106 reprimidos. La tabla 3 muestra los 16 genes con más diferencias de expresión (teniendo en cuenta $\text{FDR} < 0,01$), con los 8 genes más expresados y los 8 genes menos expresados en adipocitos

	Control	Adipocito		Cantidad	Porcentaje
Total reads	11.117.879	8.470.472	Measured Genes	13.223	100
After duplicate removal	4.683.747	1.464.020	Differentially expressed	2.765	20,91
Uniquely mapped to exonic regions	3.702.636	1.082.269	Upregulated	659	4,98
			Downregulated	2.106	15,93

Tabla 2. Lecturas secuenciadas en cada librería

GeneName	C_TPM	A_TPM	Log2 fc	FDR	Regulation
FABP4	1,34770889	10258,3333	-12,8882697	0	Positiva
ADH1B	2,42587601	2099,07407	-9,75130147	0	Positiva
LPL	0	1208,33333	-13,1244919	1,47E-260	Positiva
ADIPOQ	0,26954178	902,777778	-11,7039162	6,43E-253	Positiva
TIMP4	0	696,296296	-12,3292466	4,27E-170	Positiva
AOC3	0,26954178	369,444444	-10,4149027	1,84E-121	Positiva
PLIN1	0	332,407407	-11,2624978	2,35E-92	Positiva
APCDD1	0,26954178	192,592593	-9,47509751	3,48E-67	Positiva
FLNA	1690,2965	9,25925926	7,51789392	0	Negativa
BGN	955,525606	1,85185185	9,01691212	0	Negativa
FHL2	712,12938	2,77777778	8,00779446	0	Negativa
CHI3L1	371,698113	0	9,65474895	5,79E-139	Negativa
CDC42EP1	226,145553	0,92592593	7,93786921	3,52E-100	Negativa
MAGED2	184,097035	0,92592593	7,64108397	1,48E-81	Negativa
AP2S1	166,037736	0	8,49212875	2,28E-65	Negativa
PKN1	143,396226	0	8,28062464	3,42E-56	Negativa

Tabla 3. Los 16 genes expresados más diferencialmente. Regulación positiva indica que los genes están sobreexpresados en la adipogénesis y regulación negativa que están reprimidos.

5.3. Análisis de enriquecimiento

A través del servidor DAVID se determinaron las asociaciones entre los genes expresados diferencialmente mediante el análisis de enriquecimiento a nivel de función molecular con GO y rutas metabólicas con KEGG Pathway.

En el conjunto de los genes sobreexpresados en adipocitos, el análisis de GO reveló 5 categorías enriquecidas significativamente. Entre ellas, **unión a ácidos carboxílicos** (FDR=5,24e-6) (ej. Receptor gamma activado por el factor proliferador de peroxisomas, acetil-CoA carboxilasa alfa, acetil-CoA carboxilasa beta, apolipoproteína C1, soluto transportista familia 19 (Transportador tiamina), miembro3, dihidrolipoamida S-acetiltransferasa, inhibidor de la unión a diazepam, fosfoenolpiruvato carboxiquinasa 1, ácido graso sintasa, proteína de unión a ácidos grasos 4, proteína de unión a ácidos grasos 5), **unión a ácidos monocarboxílicos** (FDR=4,56e-5) (ej. Acetil-CoA deshidrogenasa de cadena corta C2 a C3, activadora de la araquidonato 5-lipooxigenasa, receptor gamma activado por el factor proliferador de peroxisomas, citocromo P450, familia 26, subfamilia B, polipéptido 1, acetil-CoA carboxilasa alfa, acetil-CoA carboxilasa beta, apolipoproteína C-1, proteína de unión a ácidos grasos 4, proteína de unión a ácidos grasos 5, inhibidor de la unión a diazepam, aldo-ceto reductasa familia 1, miembro C1, hidroxiacil-CoA deshidrogenasa / 3 cetoacil-CoA tiolasa / enoil-CoA hidratasa (proteína trifuncional), subunidad beta) y **unión a ácidos grasos** (FDR=0,009) (ej. Acetil-CoA deshidrogenasa de cadena corta C2 a C3, activadora de la araquidonato 5-lipooxigenasa, receptor gamma activado por el factor proliferador de peroxisomas, apolipoproteína C-1, proteína de unión a ácidos grasos 4, proteína de unión a ácidos grasos 5, inhibidor de la unión a diazepam, hidroxiacil-CoA deshidrogenasa / 3 cetoacil-CoA tiolasa / enoil-CoA hidratasa (proteína trifuncional), subunidad beta). En KEGG, la ruta que presentó una mayor significación estadística fue **vía de señalización PPAR** (FDR=8.2e-5) (Lipoproteína, estearoil-CoA desaturasa (delta-9-desaturasa), receptor gamma activado por el factor proliferador de peroxisomas, acuaporina 7, inhibidor de la unión a diazepam, adiponectina, fosfoenolpiruvato carboxiquinasa 1, acil-CoA sintetasa miembro de la familia de cadena larga 1, acil-CoA sintetasa miembro de la familia de cadena larga 5, molécula de CD36 (receptor de trombospondina), sorbin sh3 y dominio que contiene proteínas 1, perilipina 1, proteína de unión a ácidos grasos 4, proteína de unión a ácidos grasos 5, subfamilia de receptores nucleares 1, grupo H, miembro 3) (ver

figura 5). Además, otras ocho rutas también mostraron un enriquecimiento significativo, como por ejemplo la *vía de señalización adipocitoquina* ($FDR=0.004$) (Leptina, sustrato receptor de insulina 2, molécula de CD36 (receptor de trombospondina), acil-CoA sintetasa miembro de la familia de cadena larga 1, acil-CoA sintetasa miembro de la familia de cadena larga 5, familia de transportadores de soluto 2 (facilitador de transportador de glucosa), miembro 4, factor nuclear del polipeptido potenciador de la luz kappa en células B inhibidas, alfa, acetil-CoA carboxilasa beta, receptor gamma activado por el factor proliferador de peroxisomas, coactivador alfa 1, adiponectina, receptor 2 de adiponectina, fosfoenolpiruvato carboxiquinasa 1) (ver tabla 4).

a)

Término	Cantidad	Genes	Benjamini
GO:0048037~cofactor binding	31	LDHB, STEAP4, ALDH1L1, HMGCR, PGD, HADHB, FMO4, GPD1L, CSAD, FMO2, FMO3, FASN, IDH2, GCSH, IDH1, CAT, DHTKD1, HADH, NQO2, DHCR24, ACADS, NDUFA9, IDH3B, DLAT, DBI, AOX1, ABAT, HSD11B2, THNSLI, AOC2, LOC729080, AOC3	1.1958E-08
GO:0050662~coenzyme binding	24	STEAP4, LDHB, HMGCR, PGD, HADHB, GPD1L, FMO4, FMO2, FMO3, IDH2, IDH1, GCSH, CAT, DHTKD1, HADH, DHCR24, NQO2, NDUFA9, ACADS, IDH3B, DLAT, DBI, AOX1, HSD11B2, LOC729080	5.2842E-07
GO:0031406~carboxylic acid binding	20	ACADS, PPARG, ACACA, APOC1, SLC19A3, ACACB, DLAT, SLC19A2, DBI, PCK1, HADHB, SLC1A3, ALOX5AP, FMO3, CYP26B1, FASN, GCSH, FABP4, LOC729080, AKR1C1, FABP5	5.2453E-06
GO:0033293~monocarboxylic acid binding	12	ACADS, ALOX5AP, PPARG, CYP26B1, ACACA, APOC1, FABP4, ACACB, DBI, AKR1C1, FABP5, HADHB	4.5647E-05
GO:0005504~fatty acid binding	8	ACADS, ALOX5AP, PPARG, APOC1, FABP4, DBI, FABP5, HADHB	0.00977302

b)

Término	Cantidad	Genes	Benjamini
hsa03320:PPAR signaling pathway	15	LPL, SCD, PPARG, AQP7, DBI, ADIPOQ, PCK1, ACSL1, CD36, SORBS1, PLIN1, FABP4, FABP5, NR1H3, ACSL5	8.2198E-05
hsa04920:Adipocytokine signaling pathway	12	LEP, IRS2, CD36, ACSL1, SLC2A4, ADIPOR2, NFKBIA, ACACB, PPARGC1A, ADIPOQ, PCK1, ACSL5	0.00379255
hsa00280:Valine, leucine and isoleucine degradation	10	ACADS, AOX1, HMGCS1, ABAT, HADH, ACAT2, PCCB, ALDH9A1, AUH, HADHB	0.00440732
hsa00360:Phenylalanine metabolism	7	PRDX6, MAOA, ALDH1A3, MAOB, AOC2, PNPLA3, AOC3	0.00496357
hsa00640:Propanoate metabolism	8	LDHB, ACSS1, ACACA, ABAT, ACACB, ACAT2, PCCB, ALDH9A1	0.00553654
hsa00982:Drug metabolism	11	FMO4, GSTM4, MAOA, ALDH1A3, FMO2, AOX1, FMO3, MAOB, GSTZ1, ADH1B, MGST1	0.00565975
hsa05016:Huntington's disease	19	NDUFA3, NDUFB10, POLR2L, SLC25A5, NDUFA9, NDUFB9, CYC1, POLR2I, PPARG, COX7C, PPARGC1A, VDAC3, NDUFB1, UQCRHL, UQCR10, NDUFS8, ATP5A1, ATP5H, UQCRCB	0.00640267
hsa00620:Pyruvate metabolism	9	LDHB, ACSS1, ACYP2, ACACA, DLAT, ACACB, ACAT2, ALDH9A1, PCK1	0.00678721
hsa00350:Tyrosine metabolism	9	MAOA, ALDH1A3, AOX1, MAOB, GSTZ1, ADH1B, AOC2, PNPLA3, AOC3	0.00678829

Tabla 4. Análisis de enriquecimiento de genes sobreexpresados en adipogénesis. a) Funciones moleculares significativas en GO. b) Rutas moleculares significativas en KEGG.

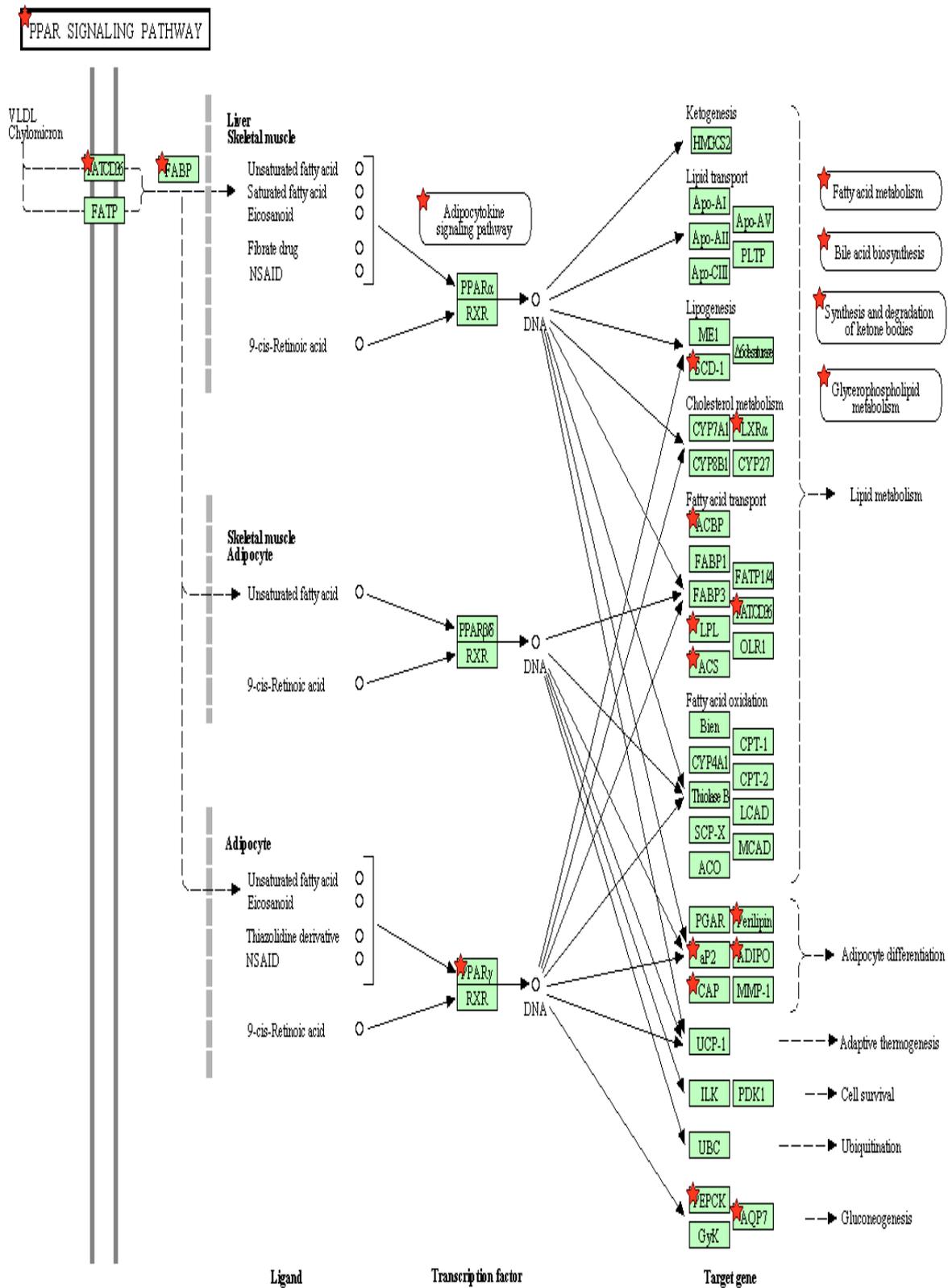


Figura 5. Vía de señalización PPAR: La vía PPAR es la más enriquecida en genes activados en la muestra adipocitos. Los genes expresados diferencialmente detectados están marcados con una estrella roja.

El conjunto de genes que se encontraron reprimidos en adipogénesis dieron lugar a solo una categoría en GO, **unión a enzimas** (FDR=0.006) (ej. proteína quinasa, activada por AMP, subunidad no catalítica gamma 1, factor auxiliar 2 de ARN nuclear pequeño U2, cáncer de mama anti-estrógeno resistencia a la proteína 1, proteína quinasa C sustrato 80K-H, homólogo 1 de oncogén de timoma murino viral V-AKT, lon peptidasa 1, mitocondrial, ciclina dependiente del inhibidor de quinasa 2A, ciclina dependiente del inhibidor de quinasa 2B, inhibidor de la peptidasa serina clado E [nexina, inhibidora del activador del plasminógeno, tipo 1], miembro 1, ranbp- tipo y c3hc4- tipo de zinc dedo- que contiene proteínas 1), y en el análisis KEGG a tres vías, **adhesión focal** (FDR=4,3e-6) (ej. factor de crecimiento placentario, factor de crecimiento derivado de plaquetas del polipéptido A, cáncer de mama anti-estrógeno resistencia a la proteína 1, fosfatidilinositol-4-fosfato 5-quinasa tipo I, gamma, vitronectina, homólogo 1 de oncogén de timoma murino viral V-AKT), **interacción ECM-receptor** (FDR=7,7e-5) (ej. Integrina alfa 11, integrina beta 5, vitronectina, sindecán-4, laminina beta 2) y **vías implicadas en cáncer** (FDR=0,002) (ej. Factor de crecimiento fibroblástico 18, receptor delta activado por el factor proliferador de peroxisomas, factor de crecimiento de la placenta, factor de crecimiento derivado de plaquetas del polipéptido A, transductor de señal y activador de la transcripción 5B, receptor nuclear translocador de aril hidrocarburos) (Tabla 5).

Término	Cantidad	Genes	Benjamini
a) GO:0019899-enzyme binding	84	PRKAG1, U2AF2, BCAR1, HR, PRKCSH, AKT1, LONP1, CDKN2A, CDKN2B, SERPINE1, RBCK1, VPS4A, SUPT5H, FIZ1, MAP2K7, FMNL1, IBTK, PTPRK, PHRF1, PFKL, RELA, PICK1, HDAC10, RAD9A, PRKCDBP, HMGAI, FLNA, PLAUR, THY1, MAST2, WDR44, MAP3K12, RIN3, MAP3K11, CARHSP1, PPM1E1, DIAPH1, ERBB2, VIM, TRIB3, RTKN, ITGB2, CHEK1, CDH2, ATP6V1G1, BDKRB2, RIMS1, STUB1, LLGL1, SQSTM1, CD4, CCS, SKIL, DNAJA3, RASA1, CDC42EP5, ACTB, INF2, KAT2A, WDC1, DGKQ, SMG5, TGFBR1, ARFIP2, AKAP8L, SKI, BAD, UBE2L3, DOCK6, STAT3, DVL1, TNKS1BP1, HDAC3, RPS6KA4, HDAC1, SP1, CABIN1, ATP6V0A1, PPP2R4, SYTL2, CACNA1C, TRIP6, CBS, DNM2	0,00633611
b) hsa04510:Focal adhesion	49	PGF, PDGFA, BCAR1, PIP5K1C, VTN, AKT1, ACTG1, PAK4, AKT3, AKT2, ACTN4, FLNC, FLNB, FLNA, VASP, VEGFB, PPP1CA, MAPK3, VEGFA, PDGFRB, DIAPH1, ERBB2, ITGA11, ITGB5, ELK1, SRC, LAMB2, RAC2, RAC3, ITGB8, ITGAV, COMP, COL6A2, THBS1, THBS2, THBS3, PIK3R2, FN1, COL4A4, ACTB, COL4A2, COL4A1, ITGA2, ITGA3, BAD, COL5A1, ITGA5, LAMA5, ITGA7	4,3225E-06
hsa04512:ECM-receptor interaction	26	ITGA11, ITGB5, VTN, SDC4, LAMB2, ITGB8, COMP, ITGAV, COL6A2, SV2A, AGRN, THBS1, THBS2, THBS3, FN1, COL4A4, COL4A2, COL4A1, HSPG2, ITGA2, ITGA3, COL5A1, SDC1, ITGA5, LAMA5, ITGA7	7,7276E-05
hsa05200:Pathways in cancer	59	FGF18, PPARC, PGF, PDGFA, STAT3B, ARNT2, MITF, NFKB2, TGFBI, AKT1, CDKN2A, CDKN2B, RARA, FGF1, FGF2, AKT3, AKT2, BCR, RELA, FADD, CDK6, VEGFB, MAPK3, VEGFA, PDGFRB, PIAS2, TRAF2, WNT3B, ERBB2, BCL2L1, ARNT, LAMB2, RAC2, RAC3, ITGAV, RUNX1, TRAF5, FN1, PIK3R2, COL4A4, DVL3, FZD8, COL4A2, IL6, COL4A1, TGFBR1, ITGA2, ITGA3, BAD, FZD2, STAT1, STAT3, FZD7, DVL1, HDAC1, LAMA5, RASSF1, BAX, ABL1	0,00219914

Tabla 5. Análisis de enriquecimiento de genes reprimidos en adipogénesis. a) Funciones moleculares significativas en GO. b) Rutas moleculares significativas en KEGG.

5.4. Confirmación del perfil de expresión SuperSAGE mediante qRT-PCR

La qRT-PCR fue realizada para confirmar las diferencias de expresión génica entre controles y cultivos inducidos a adipocitos mostradas tras el análisis de las librerías SuperSAGE. Por un lado se analizaron las muestras recogidas a los 7 días y por otro a los 14 días, lo cual permite determinar si la expresión de los genes variaba en estos dos periodos de tiempo durante la diferenciación. No obstante, está representada la media de las células de la MO de los tres pacientes (Figuras 6 y 7) \pm error típico de la media.

Se analizaron genes que se encontraron activos en la adipogénesis, como son LPL, ADIPOQ, FABP4, PPAR γ y ACSL1. Todos ellos estaban más expresados en las células tratadas con inductores adipogénicos que en las células control. Asimismo, su expresión fue mayor a los 14 días que a los 7 días. En los dos tiempos analizados, las diferencias de expresión génica fueron estadísticamente significativas para todos los genes (Figura 6). Adicionalmente, también se analizaron algunos de los genes reprimidos en la adipogenesis. Todos estaban más expresados significativamente en las células controles que en las células inducidas a adipocitos, con excepción de TGFB1 a los 7 días de inducción adipogénica cuya diferencia de expresión no fue significativa(Figura 7).

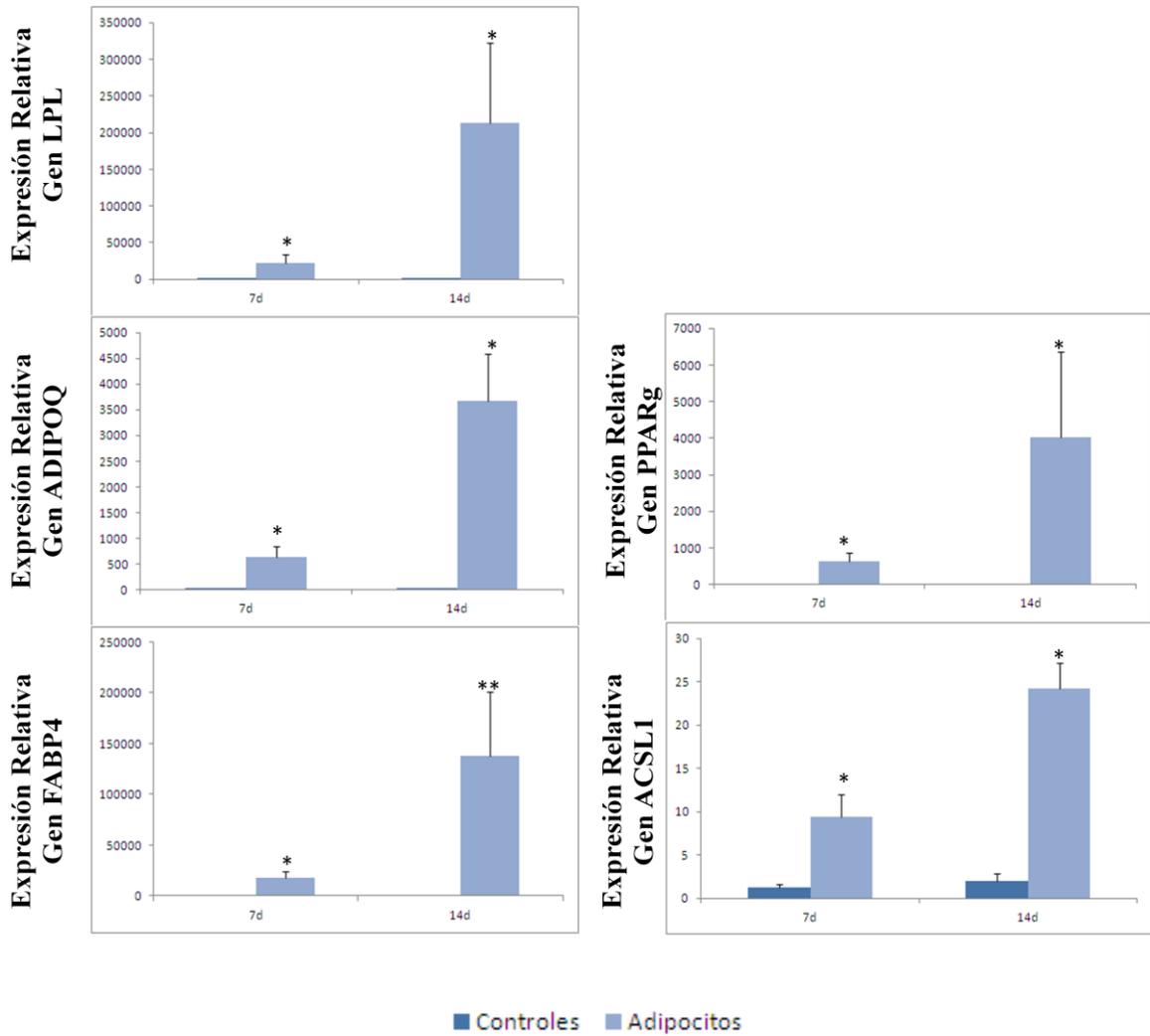


Figura 6. Cuantificación de la expresión relativa de genes activados en adipogénesis a los 7 y 14 días de tratamiento de células MSC con inductores adipogénicos frente a células control. P < 0,05; P < 0,001 células tratadas versus células control.

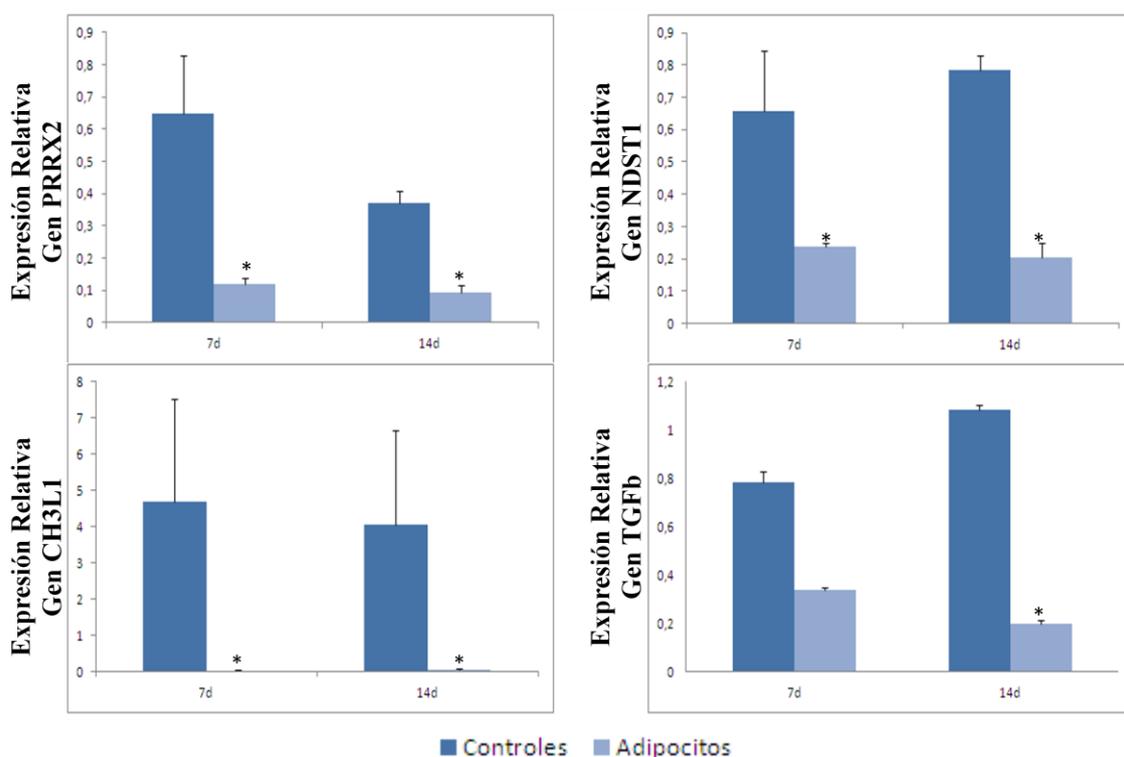


Figura 7. Cuantificación de la expresión relativa de genes reprimidos en adipogénesis a los 7 y 14 días de tratamiento de células MSC con inductores adipogénicos frente a células control. $P < 0,05$ células tratadas versus células control.

6. DISCUSIÓN

Estudios realizados en la década de los 70's por el grupo de Friedenstein demostraron la existencia de las células MSC, así como su caracterización [1]. A partir de ese momento, numerosos estudios destacan la elevada importancia del estudio de estas células debido a que se encuentran implicadas tanto en la reparación de tejidos como en enfermedades óseas y metabólicas [22].

Por otro lado, se sabe que existe una relación inversa entre la formación de hueso y la formación de tejido adiposo. Así, en la clínica, se observa que las pacientes con osteoporosis tienen un incremento de tejido adiposo en la médula ósea [23]. Centrándonos en la adipogénesis, consideramos conveniente la caracterización de los genes y las vías metabólicas implicadas en la diferenciación de células MSC a adipocitos. El completo conocimiento del mecanismo molecular involucrado en la

diferenciación de las células troncales podría resultar crítico para tratar, entre otras, patologías como la osteoporosis, la obesidad y la diabetes.

Nosotros hemos comprobado la plasticidad de las células MSC aisladas a partir de la MO de tres pacientes diferentes. Las tinciones histoquímicas muestran como ante la presencia de los inductores adecuados, las células comienzan un proceso de diferenciación a adipocitos u osteoblastos cambiando su morfología celular (Figura 3). De esta manera, corroboramos que se trataban de células MSC que cumplían con los criterios mínimos establecidos por la ISCT [3].

En la caracterización transcriptómica de células MSC diferenciadas a adipocitos frente a sus respectivas células control se identificaron 13.223 genes mediante la librería superSAGE. Entre ellos, se encontraron diferencias significativas estadísticamente en la expresión de 2.765 genes, 659 sobreexpresados y 2.106 reprimidos.

En la tabla 3 observamos que todos los genes **más expresados están relacionados con la diferenciación y el metabolismo del adipocito**. Por ejemplo, el gen **FABP4** (*proteína de unión a ácidos grasos 4*), específico de adipocitos, codifica una proteína transportadora de ácidos grasos en el interior celular con el fin de que estos sufran un proceso de oxidación o den lugar a la síntesis de triglicéridos o fosfolípidos. El gen **ADH1B** (*alcohol deshidrogenasa 1B*) codifica a una enzima que metaboliza productos de la peroxidación lipídica. El gen **LPL** (*lipoproteína lipasa*) codifica una proteína expresada, entre otros, en el tejido adiposo; actúa en la hidrólisis de triglicéridos y como ligando del receptor implicado en la absorción de lipoproteínas.

En cuanto a los **menos expresados**, son genes que codifican proteínas cuyas funciones están **relacionadas con el ciclo celular, con cambios del citoesqueleto que afectan a la forma de la célula o con la migración** (ej. **FLNA, BGN, FHL2, CH3L1**). El motivo de la represión de este tipo de genes es debido a que el desarrollo del proceso de diferenciación requiere la fase previa de inhibición del crecimiento por contacto y parada del ciclo. Estudios previos muestran que algunos de estos genes, como son BGN o FHL2, tienen un papel importante en la osteogénesis. Se sabe que una baja expresión conlleva una diferenciación atenuada a osteoblastos [24][25], lo cual apoya la

regulación negativa de la diferenciación de MSC hacia osteoblastos cuando las MSC se comprometen a diferenciarse a adipocitos [15] [16].

El análisis de enriquecimiento en GO reveló la sobreexpresión de genes que codificaban proteínas relacionadas, además de con la unión de coenzimas y cofactores, con la unión de ácidos carboxílicos y ácidos grasos, biomoléculas partícipes en el metabolismo lipídico. Encontramos genes como **ACADS** (*acetil-CoA deshidrogenasa de cadena corta de C-2 a C-3*) o **HADHB** (*hidroxiacil-CoA deshidrogenasa / 3 cetoacil-CoA tiolasa / enoil-CoA hidratasa (proteína trifuncional), subunidad beta*), que catalizan el primer y tercer paso, respectivamente, de la vía β -oxidación mitocondrial de ácidos grasos, **FABP4** y **FABP5** (*proteína de unión a ácidos grasos 4 y proteína de unión a ácidos grasos 5*) colaboran en la absorción, transporte y metabolismo de ácidos grasos. En concreto, FABP4 está asociado a enfermedades vinculadas a obesidad como resistencia a la insulina, diabetes mellitus tipo II y arteriosclerosis [26]. Entre estos genes también encontramos al gen marcador por excelencia y desencadenante de la adipogénesis, el gen **PPAR γ** .

Complementando el análisis de enriquecimiento, KEGG nos desveló 9 vías metabólicas involucradas de manera significativa en la adipogénesis. No obstante, atendiendo al nivel de significación, se distingue la vía de señalización PPAR. Los modelos de diferenciación de adipocitos estandarizados mencionan que interacciones moleculares entre miembros de las familias C/EBPs y PPAR son esenciales para que se produzca el proceso de diferenciación. PPAR γ , al ser estimulado por C/EBPb y C/EBPm, se heterodimeriza con RXR (receptor X retinoico) y activa el programa adipogénico. Modelos “in vivo” muestran que niveles anómalos de PPAR γ 1 y PPAR γ 2 conducen a la ausencia de formación de tejido adiposo [27]. Recientes estudios han confirmado que PPAR es suficiente y necesario para la diferenciación de adipocitos. Se ha demostrado que células deficientes en C/EBP pueden sufrir diferenciación si PPAR está sobreexpresado, por el contrario, ante un déficit de PPAR la diferenciación es imposible [28]. Nuestros resultados mostraron que de los tres subtipos de PPAR el PPAR γ fue el más expresado, siendo éste el promotor de la diferenciación del adipocito (Figura 5). Además, también había genes expresados en el metabolismo lipídico (transporte de ácidos grasos, lipogénesis o metabolismo del colesterol).

Otra de las vías metabólicamente activa es la **vía de señalización de adipocitoquinas**. En ella intervienen diferentes adipocitoquinas implicadas en la **resistencia y sensibilidad a la insulina** (ej. Leptina, sustrato receptor de insulina 2), **en el metabolismo y transporte de la glucosa** (ej. familia de transportadores de soluto 2 (facilitador del transporte de glucosa), miembro 4, receptor 2 de adiponectina, adiponectina, fosfoenolpiruvato carboxiquinasa 1 (soluble)) y en el **metabolismo de los ácidos grasos** (ej. molécula de CD36 (receptor de trombospondina), acil-CoA sintetasa de cadena larga miembro de la familia 1,), acil-CoA sintetasa de cadena larga miembro de la familia 5, acetil-CoA carboxilasa beta).

Las demás vías que **KEGG Pathway** mostró que se encontraban activadas en la **adipogénesis** están relacionadas con el **metabolismo de los aminoácidos (Degradación de valina, leucina e isoleucina, metabolismo de fenilalanina y de tirosina)** y con el **metabolismo de los carbohidratos (Metabolismo de piruvato y propanoato)**. De este modo, nuestros resultados coinciden con los resultados de diferentes estudios recientes, los cuales han establecido una interacción entre tejido adiposo, el metabolismo de aminoácidos de cadena ramificada, y la homeostasis de señalización de insulina/glucosa [29]. Igualmente, se conoce que muchas de la adipocitoquinas, como la leptina o la adiponectina, intervienen en la regulación de la homeostasis energética y como intermediarios del metabolismo de los lípidos y carbohidratos [30].

En cuanto a los **genes que encontramos reprimidos, el análisis de enriquecimiento GO** dio como estadísticamente significativa a una sola función molecular, **el sitio de unión de enzimas**. Entre los genes encontramos diversos tipos de **histonas deacetilasas (HDACs)** que participan, además de en la modificación de histonas, en la regulación de algunos factores de transcripción implicados en la adipogénesis. Existen suficientes evidencias de que la represión de HDACs tiene una especial importancia en el proceso de diferenciación adipogénica, tanto es así, que es considerado un paso limitante en la fase inicial de la diferenciación. La represión de HDAC1 y HDAC3 supone la no supresión de C/EBP β y PPAR γ , respectivamente [31]. Aún no se conoce bien como sucede, aunque hay sugerencias que indican que **una expresión disminuida de HDAC conlleva una descondensación de la cromatina de las regiones promotoras de genes adipogénicos**, la cual **facilita la unión de factores de transcripción**. HDAC3 actúa

en conjunto con WDTC1 (*WD y tetratricopeptide 1*), otro de los genes que está reprimido, facilitando la transcripción génica.

Un potente regulador negativo de la vía PPAR γ es el gen **TRB3** (*homólogo 3 de Tribbles*). Su baja expresión impide que pueda inhibir la vía PPAR γ y con ello la adipogénesis.

Encontramos un número importante de **genes reprimidos relacionados con la matriz extracelular (MEC)**. De hecho, el KEGG Pathway de genes reprimidos nos agrupó, de manera significativa, a los genes en tres vías: **Adhesión focal, interacción MEC-receptor y rutas en cáncer**. Esta última podría ser explicada de acuerdo con los resultados obtenidos en varios estudios donde se ha establecido que existe una relación entre PPAR γ y cáncer. Se demostró que PPAR γ se expresa en diferentes tipos de tumores. Agonistas de PPAR γ provocaban inhibición de la proliferación celular o inducían apoptosis. Llegando a la conclusión de que la activación de PPAR γ reduce la expresión de genes implicados en rutas neoplásicas [32].

La identificación de las vías reprimidas de adhesión focal y de la interacción MEC-receptor pone de manifiesto una importante fase en la historia natural de la adipogénesis, como es la remodelación de la matriz extracelular. Durante la adipogénesis las células son sometidas a un cambio morfológico, en el cual la matriz extracelular tiene una vital importancia pues aporta a la célula multitud de estímulos. La interacción entre la MEC y la célula se produce mediante complejos de adhesión focal. Durante la diferenciación del adipocito, la MEC sufre una serie de cambios caracterizados por la conversión de una matriz del estroma rica en fibronectina a una membrana basal rica en laminina. Los resultados obtenidos en estudios del dinamismo de los componentes de la MEC en diferentes etapas de la diferenciación a adipocitos son controversiales, probablemente debido al uso de diferentes métodos de determinación y cuantificación de proteínas. La MEC se puede ver afectada por factores como hipoxia o fuerzas mecánicas. Cuando la célula se encuentra diferenciada, su función consiste en el almacenamiento de triglicéridos hasta que, en ocasiones, provoca la hipertrofia del adipocito y le crea un estado de hipoxia. Aún no se conoce suficiente sobre las consecuencias que ocasiona la hipoxia, pero se piensa que la desestabilización de los componentes de la MEC podría ser uno de los principales problemas. En personas

obesas, la hipoxia influye negativamente en el mantenimiento de la MEC, provocando que la inestabilidad de la matriz origine la muerte celular y se active al sistema inmune, lo que finalmente conduce al desarrollo de enfermedades como es resistencia a la insulina o diabetes mellitus tipo II [33].

Adicionalmente, la validación de estos resultados mediante la qRT-PCR nos permitió confirmar la diferenciación de las MSC hacia a adipocitos y determinar el nivel de expresión relativa de algunos de los genes adipogénicos más representativos que, según estudios previos, están implicados en la diferenciación. El gen LPL (*lipoproteína lipasa*), a menudo considerado un marcador temprano de la diferenciación, está más expresado a los 14 que a los 7 días. Esto es debido a que realmente su expresión se produce cuando las células alcanzan la confluencia, reflejando el cese de crecimiento más que el inicio de la diferenciación. Por tanto, consideramos como **excelentes marcadores adipogénicos a los genes LPL, ADIPOQ, FABP4, PPAR γ y ACSL1**.

Por el contrario, también validamos algunos de los genes reprimidos en la adipogénesis. Para ello escogimos algunos de los genes utilizados, en estudios previos, como **marcadores de células troncales** (CH3L1, NDST1) [34][35] y **genes reguladores negativos de la adipogénesis** (PRRX2 y TGF β) [36].

7. CONCLUSIÓN

Existen suficientes evidencias que resaltan la importancia de la caracterización transcriptómica que tiene lugar durante del proceso de diferenciación de células troncales a adipocitos, uno de los tipos celulares en las que pueden ser diferenciadas. En este estudio hemos desarrollado librerías génicas a partir del transcriptoma para determinar el mayor número posible de genes implicados tanto positiva como negativamente en la diferenciación adipogénica. A su vez, la identificación de genes inductores de la osteoblastogénesis, entre los genes reprimidos durante la adipogénesis, nos permite apoyar la teoría sobre la relación inversa existente entre el programa de diferenciación adipogénico y osteoblastogénico en MSC.

El análisis de enriquecimiento de los genes significativamente expresados en la adipogénesis, realizado con la base de datos online DAVID, nos proporcionó las funciones moleculares y vías metabólicas implicadas en la diferenciación. Coincidiendo con las conclusiones de numerosos estudios, la vía metabólica más relevante en el proceso de diferenciación es la vía PPAR γ .

Con este trabajo, contribuimos a caracterizar a nivel génico y molecular el proceso de adipogénesis. El conocimiento del desarrollo de este proceso es crucial para comprender la base molecular de la obesidad y patologías asociadas. La realización de futuros estudios similares en los diversos modelos de adipogénesis existentes podrían complementar nuestros resultados, y ser la base para el desarrollo de nuevos fármacos y estrategias terapéuticas para combatir patologías en las que intervenga la adipogénesis, especialmente en diabetes mellitus tipo 2, enfermedad cardiovascular, hipertensión o hígado graso no alcohólico.

Bibliografía:

1. Kolf CM, Cho E, Tuan RS. Mesenchymal stromal cells. Biology of adult mesenchymal stem cells: regulation of niche, selfrenewal and differentiation. 2007. *Arthritis Res Ther* 9:204_214.
2. Owen M, Friedenstein AJ. Stromal stem cells: marrowderived osteogenic precursors. 1988. *Ciba Found Symp* 136:42-60.
3. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, Krause D, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. 2006. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 8:315-7.
4. N. B. Nardi and L. da Silva Meirelles. Mesenchymal stem cells: isolation, in vitro expansion and characterization. 2006 .*Handbook of Experimental Pharmacology* 174, 249–282.
5. Ntambi, J.M., Young-Cheul, K. Adipocyte differentiation and gene expression. 2000. *J. Nutr.* 130, 3122S–3126S.
6. Gregoire, F.M., Smas, C.M., Sul, H.S. Understanding of adipocyte differentiation. 1998. *Physiol. Rev.* 78, 783–809.
7. Xu H, Barnes GT, Yang Q, Tan G, Yang D, Chou CJ, Sole J, Nichols A, Ross JS, Tartaglia LA, et al. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the

- development of obesity-related insulin resistance. 2003. *J Clin Invest.* 112:1821–1830.
8. Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW., Jr Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. 2003. *J Clin Invest.* 112:1796–1808
 9. Meunier P, Aaron J, Edouard C, Vignon G. Osteoporosis and the replacement of cell populations of the marrow by adipose tissue. A quantitative study of 84 iliac bone biopsies. 1971 *Clin Orthop Relat Res* 80: 147-54.
 10. Rozman, C., Feliu, E., Berga, L., Reverter, J. C., Climent, C. and Ferran, M. J. Age-related variations of fat tissue fraction in normal human bone marrow depend both on size and number of adipocytes: a stereological study. 1989. *Exp. Hematol.* 17, 34–37.
 11. Justesen, J., Stenderup, K., Ebbesen, E. N., Mosekilde, L., Steiniche, T. and Kassem, M. Adipocyte tissue volume in bone marrow is increased with aging and in patients with osteoporosis. 2001. *Biogerontology* 2, 165–171.
 12. Verma, S., Rajaratnam, J. H., Denton, J., Hoyland, J. A. and Byers, R. J. Adipocytic proportion of bone marrow is inversely related to bone formation in osteoporosis. 2002. *J. Clin. Pathol.* 55, 693–698.
 13. Wehrli, F.W., Hopkins, J. A., Hwang, S. N., Song, H. K., Snyder, P. J. and Haddad, J. G. Cross-sectional study of osteopenia with quantitative MR imaging and bone densitometry. 2000. *Radiology* 217, 527–538.
 14. Komori T. Regulation of Osteoblast Differentiation by Transcription Factors. 2006. *J Cell Biochem* 99: 1233-9.
 15. Jeon MJ, Kim JA, Kwon SH, Kim SW, Park KS, Park SW et al. Activation of Peroxisome Proliferator-activated Receptor- γ inhibits the Runx2-mediated transcription of osteocalcin in osteoblasts. 2003. *J Biol Chem* 278: 23270-7.
 16. Khan E, Abu-Amer Y. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor- γ inhibits differentiation of preosteoblasts. 2003. *J Lab Clin Med* 142: 29-34.
 17. Ramji, D. P. and Foka, P. CCAAT/enhancer-binding proteins: structure, function and regulation. 2002. *Biochem. J.* 365, 561–575.
 18. Brey, C.W., Nelder, M.P., Hailemariam, T., Gaugler, R., Hashmi, S. Kruppel-like family of transcription factors: an emerging new frontier in fat biology. 2009. *Int. J. Biol. Sci.* 5 (6), 622–636.

19. A. Casado-Díaz, R. Santiago-Mora, R. Jiménez, J. Caballero-Villarraso, C. Herrera, A. Torres, G. Dorado, J.M. Quesada-Gómez. Cryopreserved human bone marrow mononuclear cells as a source of mesenchymal stromal cells: application in osteoporosis research. 2008. *Cytotherapy*. Vol 10; 460–468.
20. Matsumura H., Yoshida K., Luo S., Kimura E., Fujibe T., Albertyn Z., et al. High-throughput SuperSAGE for digital gene expression analysis of multiple samples using next generation sequencing. 2010. *PLoS ONE* 5:e12010.
21. Björn ROTTER, “Method for the quantitative analysis of nucleic acids, markers therefor and their use” Patent PCT/EP2009/003709, 25, Feb, 2010.
22. M Shi, Z-W Liu, and F-S Wang. Immunomodulatory properties and therapeutic application of mesenchymal stem cells. 2011. *Clin. Exp. Immunol* 164(1): 1-8.
23. Mark E Nuttall, Jeffrey M Gimble. Controlling the balance between osteoblastogenesis and adipogenesis and the consequent therapeutic implications 2004. *Current Opinion in Pharmacology*. Volume 4, Issue 3, 290–294.
24. Xiaoyan WANG, Kenichi HARIMOTO, Sijia XIE, Hao CHENG, Jing LIU and Zhao WANG. Matrix Protein Biglycan Induces Osteoblast Differentiation through Extracellular Signal-Regulated Kinase and Smad Pathways. *Biol. Pharm. Bull.* 33(11) 1891—1897 (2010).
25. Hamidouche Z1, Haÿ E, Vaudin P, Charbord P, Schüle R, Marie PJ, Fromigué O. FHL2 mediates dexamethasone-induced mesenchymal cell differentiation into osteoblasts by activating Wnt/beta-catenin signaling-dependent Runx2 expression. 2008. *FASEB J.* 22(11):3813-22.
26. Maeda, K., Uysal, K. T., Makowski, L., Gorgun, C. Z., Atsumi, G., Parker, R. A., Bruning, J., Hertzel, A. V., Bernlohr, D. A. & Hotamisligil, G. S. Role of fatty acid binding protein mal1 in obesity and insulin resistance. 2003. *Diabetes* 52:300-307.
27. Koutnikova, H., Cock, T.A., Watanabe, M., Houten, S.M., Champy, M.F., Dierich, A., Auwerx, J. Compensation by the muscle limits the metabolic consequences of lipodystrophy in PPAR Gamma hypomorphic mice. 2003. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 14457–14462.
28. Lefterova, M.I., Lazar, M.A.. New developments in adipogenesis. 2009. *Trends Endocrinol. Metab.* 20 (3), 107–114.
29. Abderrazak Kitsy, Skyla Carney, Juan C Vivar, Megan S Knight, Mildred A Pointer, Judith K Gwathmey, Sujoy Ghosh. Effects of Leucine Supplementation

- and Serum Withdrawal on Branched-Chain Amino Acid Pathway Gene and Protein Expression in Mouse Adipocytes. 2014. PLoS ONE 9(7):e102615.
30. Peter J. Havel. Update on Adipocyte Hormones. Regulation of Energy Balance and Carbohydrate/Lipid Metabolism. 2004. Diabetes vol. 53 no. suppl 1 S143-S151.
 31. Yoo EJ, Chung JJ, Choe SS, Kim KH, Kim JB. Downregulation of histone deacetylases stimulates adipocyte differentiation. 2006. J Biol Chem 281:6608–6615.
 32. Grommes C, Landreth GE, Heneka MT. Antineoplastic effects of peroxisome proliferator-activated receptor Γ agonists. 2004. THE LANCET ONCOLOGY. 5(7):419–429.
 33. Mariman EC, Wang P. Adipocyte extracellular matrix composition, dynamics and role in obesity. 2010. Cell Mol Life Sci. 67(8):1277-92
 34. Hoover DJ, Zhu V, Chen R, Briley K, Rameshwar P, et al. Expression of the Chitinase Family Glycoprotein YKL-40 in Undifferentiated, Differentiated and Trans-Differentiated Mesenchymal Stem Cells. 2013. PLoS ONE 8(5): e62491.
 35. Forsberg, M., Holmborn, K., Kundu, S., Dagälv, A., Kjellén, L. et al. Undersulfation of Heparan Sulfate Restricts Differentiation Potential of Mouse Embryonic Stem Cells. 2012. Journal of Biological Chemistry, vol. 287, ss. 10853-10862
 36. Du B, Cawthorn WP, Su A, Doucette CR, Yao Y, Hemati N, Kampert S, McCoin C, Broome DT, Rosen CJ, Yang G, MacDougald OA. The transcription factor paired-related homeobox 1 (Prrx1) inhibits adipogenesis by activating transforming growth factor- β (TGF β) signaling. 2013. J. Biol. Chem. 288 (5): 3036–47.