



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES  
Facultad de Farmacia y Bioquímica

*Estudio de la especificidad de la familia de proteínas  
14-3-3 en la regulación de TAZ en células madre  
mesenquimales adultas*

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos  
Aires en el área Ciencias Biológicas

**Lic. Aldana Daniela Gojanovich**

Director de tesis: Dr. Diego Martín Bustos

Co-Directora de tesis: Dra. Marina Uhart

Consejera de estudios: Dra. Ana María Puyó

Lugar de Trabajo: Instituto de Histología y Embriología de Mendoza "Dr. Mario  
H. Burgos", CONICET

Buenos Aires, 2016

Las MSCs (*mesenchymal stem cells*) se pueden diferenciar a células del linaje mesenquimal, incluyendo adipocitos y osteoblastos. Al activarse la vía Hippo, TAZ, efector de la vía y co-regulador transcripcional, se fosforila en Ser 89, lo que provoca su unión a las proteínas reguladoras 14-3-3 en el citoplasma. Esto impide la represión de genes implicados en adipogénesis (que por ende se expresan). En mamíferos, la familia 14-3-3 está compuesta por 7 parálogos que se unen específicamente a residuos fosforilados en serina o treonina (pS/T) en sus proteínas blanco. Nuestra hipótesis fue que la interacción con TAZ era específica de uno o algunos parálogo/s de 14-3-3. Se observaron variaciones en los niveles de los parálogos de 14-3-3 durante la adipogénesis de células hASCs y 3T3-L1. La variación se produjo tanto a nivel del ARNm como de la proteína, siendo específica para los parálogos 14-3-3 , , y . El parálogo más variable fue 14-3-3 , cuyos valores aumentaron durante la adipogénesis de hASCs y 3T3-L1. Tras el silenciamiento de 14-3-3 los resultados sugerirían que ésta podría regular la localización subcelular de TAZ. Nuestro análisis apoya el concepto actualmente creciente de funciones moleculares específicas para los diferentes parálogos de 14-3-3.

MSCs (mesenchymal stem cells) can differentiate to adipocytes and osteoblasts, among other mesenchymal cells. Upon activation of the Hippo pathway, the transcriptional co-regulator TAZ, is phosphorylated in its Ser 89, which causes its binding to 14-3-3 regulatory proteins in the cytoplasm. This prevents the repression of adipogenesis involved genes. In mammals, the 14-3-3 family is composed of 7 paralogs that specifically bind serine or threonine phosphorylated residues (pS / T) in their target proteins. Our hypothesis was that the interaction with TAZ was specific to one or a few 14-3-3 paralogs. Variations of the levels of these paralogs were observed during the adipogenesis of hASCs and 3T3-L1 cells. The variation occurred both at mRNA and protein level, being specific for the paralogs 14-3-3 , , and . The paralog that showed the greatest variation was 14-3-3 , wich values increased during the adipogenesis of both hASCs and 3T3-L1. The results after silencing 14-3-3 suggests that this paralog could regulate the subcellular localization of TAZ. Our analysis supports the current concept of specific molecular functions for the different paralogs of 14-3-3.

Estos años de gran esfuerzo, dedicación, crecimiento profesional y personal fueron compartidos con muchas personas a las que quiero mencionar.

Los principales responsables de este enorme logro son mamá y papá, por enseñarme que la perseverancia es la clave del triunfo y que sin desafíos la vida es una rutina. Le doy las gracias por esos llamados infinitos acompañándome pese a la distancia, sintiéndolos tan cerca. Al igual que a mi hermano, por darme esos abrazos fuertes cada vez que vuelvo a casa de visita.

Agradezco a Diego y Marina por haberme recibido en su laboratorio y por haber confiado en mí durante estos años. Por todos los conocimientos transmitidos, por las críticas constructivas, la paciencia y por enseñarme a mantener la calma ante la “sorpresa” de un ensayo fallido.

A esa amiga, compañera del laboratorio, esa hermana de tamaño reducido, que tuve la suerte de conocer el primer año de la facultad, convertirme en su amiga y, además, que se animara a esta aventura de un doctorado mendocino. Ella es mi pu, mi amiga Yeyé (la ieie en Mendoza). Es la que hace mis días, dentro y fuera del laboratorio, muy divertidos. Es quien me acompaña los fines de semanas a dividir las células por más que ella no tenga que hacer nada con las suyas, la que está atenta a mis sueños profundos y evita que pierda mis vuelos, la que reniega con todo el mundo y me hace reír mucho por eso, la que nos hace los asados, la que sin duda, es una amiga de fierro.

También quiero agradecer a esa otra amiga que este doctorado me regaló. La conocí cuando apenas llegaba a Mendoza y nos hicimos amigas al instante, como si nos conociéramos de

otra vida. Ella es la mamá, mi amiga Cintia. Ha hecho sin duda mi estadía en Mendoza inolvidable. Es la amiga que siempre tiene el SI para todo lo que le proponga, la que hace los mejores postres, la que me deja ser su copiloto de aventuras, la que me transmite alegría en todo momento. Gracias por todo!!!!

A Yani, sin duda a ella tengo que darle eternamente las gracias. Otra amiga que la facultad me permitió conocer y cuya amistad permanece intacta pese a la distancia y los años transcurridos. Es mi ídola, como siempre le digo. Me transmite optimismo, ánimo para los desafíos, amor y alegría. Admiro su inteligencia y su manera de vivir la vida. Te adoro amiga!

A mi mamá postiza en Mendoza, mi súper amiga La Vicky. Tuve el placer de conocerla en un curso poco antes de la mudanza del laboratorio y tanta suerte la mía, que era mendocina. Por esas charlas que sin duda te levantan el ánimo y te hacen olvidar de los problemas. A su familia que tan bien me han adoptado y me han hecho sentir como uno más de ellos.

A la Florcita y su hermoso bombón Joaco, por haberme acompañado en este último tramo del doctorado y por hacerme pasar momentos muy lindos.

A mis amigos, el negro y el pancho, porque no solo han compartido salidas, sino que me han sabido acompañar en ese momento de crisis denominado escritura de tesis

Agradezco a Gustavo y Andreia que me acompañaron y ayudaron en mi estadía en Boston y que siempre responden a mis llamados. Me transmiten su cariño a miles de km en todo momento.

A Andrea y Clara, mis citometristas preferidas, por su buena onda y predisposición.

A las chicas del Lab 107 a las que siempre molesto con mates y me hacen reír sin duda.

A CONICET por haberme otorgado la beca que me permitió desarrollar este trabajo y al director del IHEM, Luis Mayorga por haberme permitido trabajar en el instituto.

A todos ellos, simplemente GRACIAS!!!!

*A mis padres, hermano  
y amigas de la vida, Yeye, Cintia y Yani*

*Índice*

1. INTRODUCCIÓN	
1.1 Células Madre	8
1.1.1 Células madre mesenquimales (MSCs): células madre derivadas de tejido adiposo (ASCs)	11
1.2 Adipogénesis	15
1.3 La vía de la quinasa Hippo	22
1.4 TAZ (Transcriptional co activator with PDZ binding motif)	25
1.5 La familia de Proteínas 14-3-3	30
2. OBEJTIVOS	35
3. MATERIALES Y MÉTODOS	
3.1 Aislamiento de Células Madre derivadas de tejido adiposo humano (hASCs)	37
3.2 Expansión y criopreservación de células hASCs, 3T3-L1 y HEK293T	39
3.3 Caracterización de hASCs por citometría de flujo	40
3.4 Diferenciación adipogénica	42
3.5 Tinción con Oil red O	44
3.6 Aislamiento de ARN, síntesis de ADNc y PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR)	45
3.7 Lisados celulares totales y análisis por Western Blot (WB)	49
3.7.1 Medida de concentración de proteínas	49
3.7.2 Electroforesis en geles desnaturizantes de poliacrilamida	50
3.7.3 Electrotransferencia de proteínas y detección por el método de WB	52
3.8 Producción de anticuerpo policlonal contra la proteína TAZ	53
3.9 Inmunofluorescencia Indirecta (IFI)	57
3.9.1 IFI del co-regulador transcripcional “TAZ”	57
3.9.2 IFI de los parálogos de 14-3-3	58
3.10 Silenciamiento de los parálogos de 14-3-3 a través de shRNA	60
3.10.1 Subclonado de los shRNAs en vectores virales	60
3.10.2 Producción de lentivirus	64
3.10.3 Infección de células 3T3-L1 con lentivirus	66
3.11 Producción de bacterias electrocompetentes y transformación	66
4. RESULTADOS	
4.1 Aislamiento de Células Madre derivadas de tejido adiposo y caracterización	69
4.2 Diferenciación adipogénica	71
4.3 Niveles relativos de ARNm y proteína de los parálogos de 14-3-3 en células no tratadas y diferenciadas	81
4.4 Producción de anticuerpo policlonal contra la proteína TAZ	87
4.5 Silenciamiento de isoformas de 14-3-3 a través de shRNA y evaluación de la localización sub-celular de TAZ	90

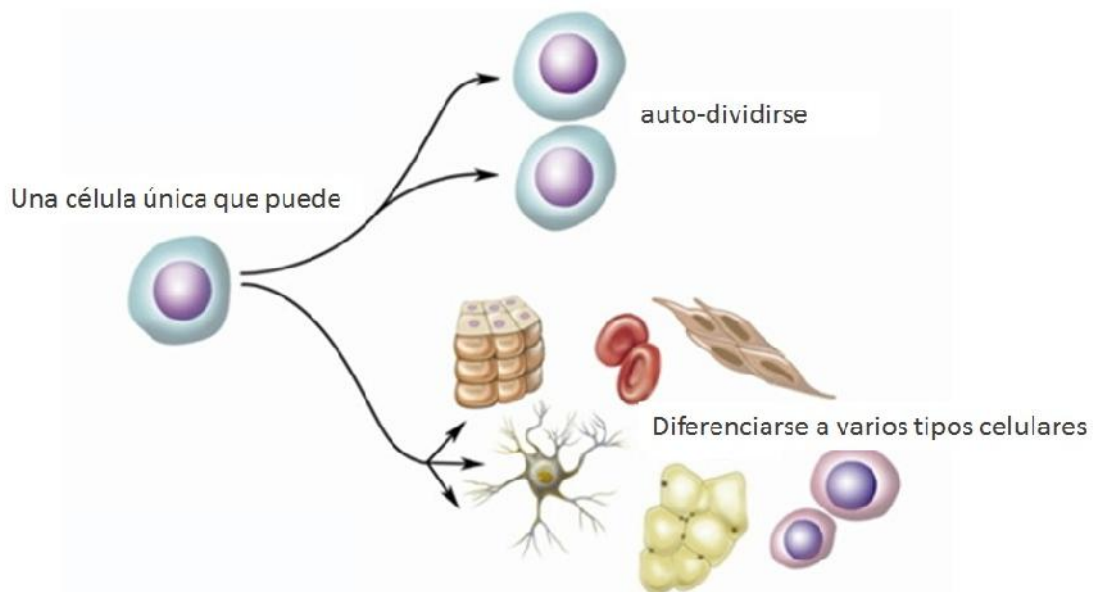


5.	DISCUSIÓN	98
6.	CONCLUSIONES	114
7.	RESUMEN	116
8.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	120

# *Introducción*

## 1.1 Células Madre

Las células madre se definen como aquellas que poseen la capacidad de dividirse indefinidamente y diferenciarse a los distintos tipos celulares del organismo (**Figura 1**). Son células no especializadas capaces de renovarse a sí mismas a través de la división celular, a veces con largos períodos de inactividad. Bajo ciertas condiciones fisiológicas o experimentales las células madre pueden convertirse en células de un tejido u órgano específico con funciones especiales, es decir pueden diferenciarse. En algunos tejidos, como el intestino y la médula ósea, las células madre se dividen regularmente para reparar y reemplazar los tejidos dañados. En otros órganos, como el corazón y el páncreas, estas células sólo se dividen en condiciones particulares.



**Figura 1.** Esquema de las propiedades más importantes que definen a las células madre.

Las células madre pueden clasificarse según su potencial para diferenciarse a distintos tipos celulares o según su origen. En función de la primera característica, las células madre se pueden clasificar en:

- a) Totipotentes: Pertenecen a este grupo las células madre capaces de diferenciarse a cualquier tipo celular, incluso dar origen a un organismo completo y a los tejidos extraembrionarios. Una célula cigoto totipotente se genera tras la fecundación de un óvulo por un espermatozoide. Durante las primeras etapas del desarrollo embrionario se produce la división celular del cigoto generando más células totipotentes (hasta la etapa de 8-16 células), luego estas células comienzan a ser células pluripotentes.
- b) Pluripotentes: Capaces de generar cualquier célula de un organismo pero no los tejidos extraembrionarios. Son las que dan lugar a las tres capas embrionarias: mesodermo, endodermo y ectodermo.
- c) Multipotentes: Pueden diferenciarse sólo a algunos tipos celulares, aquellos correspondientes a la misma capa embrionaria que originó el tejido en el que se encuentran.

Dependiendo de su origen dichas células se clasifican en:

- a) Células madre embrionarias (ESC, acrónimo inglés de *Embryonic Stem Cells*): son células madre pluripotentes que, como su nombre lo indica, provienen de embriones, antes de su implantación en el útero. Durante el desarrollo embrionario se llega a una estructura denominada blastocisto, compuesta de una masa celular interna (embrioblasto), fuente de las células madre embrionarias, y una masa celular externa (trofoblasto) que se convertirá en parte de la placenta. Las primeras líneas de células madre

se aislaron de ratón a principio de los años 80 (Evans y Kaufman, 1981; Axelrod, 1984). Entre los años 1998 y 2000 se obtuvieron las primeras ESC de origen humano (Reubinoff *et al.*, 2000, Thomson *et al.*, 1998).

- b) Células madre adultas: son células madre multipotentes localizadas en prácticamente todos los tejidos del organismo. Sólo pueden dar algunos tipos celulares y pueden permanecer inactivas por años. Dentro de este grupo encontramos las células madre mesenquimales adultas (MSC, acrónimo inglés de *Mesenchymal Stem Cells*) y las células madre hematopoyéticas (HSC, acrónimo inglés de *Hematopoietic Stem Cells*). Estas últimas, a diferencia de las MSC, sólo pueden dar origen a células de la sangre. La médula ósea y el cordón umbilical son dos tejidos que poseen ambos tipos celulares.
- c) Células madre pluripotentes inducidas (iPSC, acrónimo inglés de *induced Pluripotent Stem Cells*): son células madre que poseen las mismas características y propiedades que las ESC, pero que son originadas experimentalmente a partir de células adultas ya diferenciadas sobre las que se expresan cuatro genes exógenos: Oct4, Sox2, c-Myc y Klf4, capaces de desdiferenciarlas. A esta desdiferenciación se la denomina reprogramación celular. Las iPSC fueron obtenidas por primera vez en el año 2006 a partir de fibroblastos de ratón (Takahashi y Yamanaka, 2006) y en 2007 a partir de células humanas (Takahashi *et al.*, 2007).

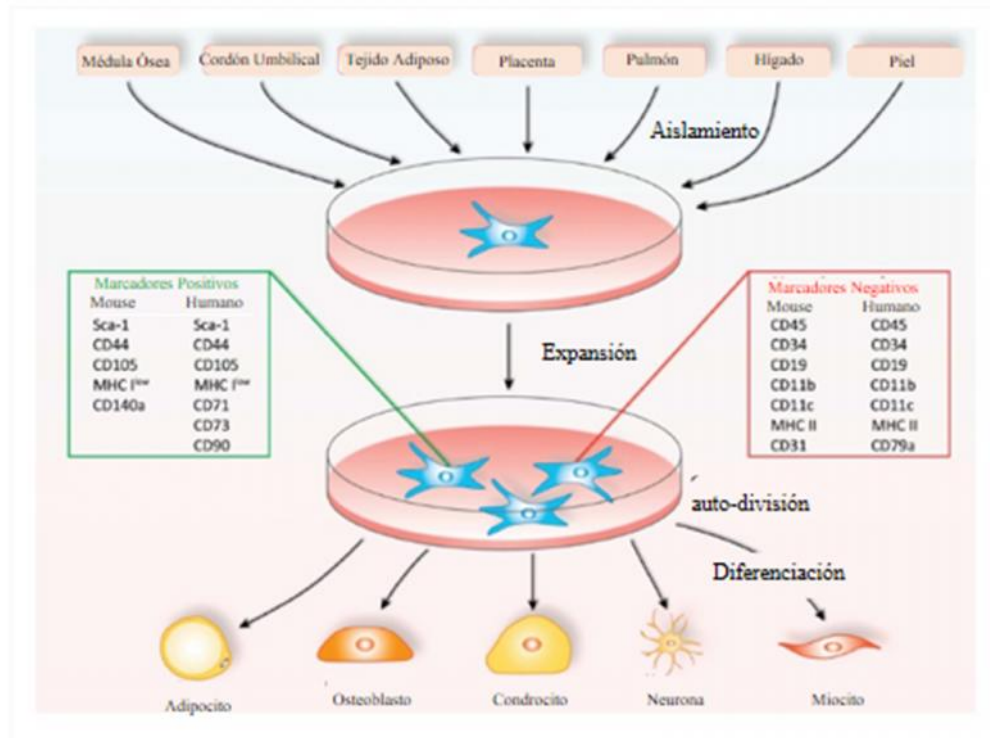
### *1.1.1. Células madre mesenquimales (MSCs): células madre derivadas de tejido adiposo (ASCs)*

Como anteriormente se ha expuesto, las MSCs comprenden una variedad de células multipotentes que pueden ser aisladas de varios tejidos humanos y cultivadas *in vitro* para su uso científico o clínico. Las MSCs fueron descritas por primera vez hace 50 años por Friedenstein y colaboradores (Friedenstein *et al.*, 1966) como una población de células adherentes aisladas de médula ósea, las cuales exhibían una morfología fusiforme similar a la de un fibroblasto. Con el tiempo se descubrió que estas células podían ser inducidas *in vitro* a diferenciarse a células de diversos tejidos como hueso, cartílago, tejido adiposo, tendón y músculo. Aunque la médula ósea ha sido la principal fuente de MSCs durante años, el procedimiento tradicional de extracción requiere anestesia general o espinal, y el número que se obtiene de MSCs suele ser bajo (aproximadamente 1 MSC por cada  $10^5$  células adherentes estromales) (Bruder *et al.*, 1997). La frecuencia de MSCs en médula ósea y la capacidad de diferenciación de estas células disminuyen con la edad (D'Ippolito *et al.*, 1999). Por ello se ha optado por aislar MSCs de otros tejidos humanos. A partir del trabajo publicado por Castro-Malaespina y colaboradores (Castro-Malaespina *et al.*, 1980), en el que además de aislar MSCs de médula ósea pudieron obtenerlas de sangre periférica, varios investigadores han desarrollado diferentes métodos para el aislamiento de poblaciones de MSCs de distintos tejidos. Se han obtenido MSCs de cordón umbilical, a través de un método menos invasivo que el descrito para médula ósea, sin producir daño al bebé ni a la madre. En el año 1991 McElreavey y colaboradores reportaron por primera vez el aislamiento de células con morfología similar a la de fibroblastos a partir de la gelatina de Wharton de cordón umbilical humano (McElreavey *et al.*, 1991). También se han aislado MSCs de tejido adiposo (Zuk *et al.*, 2001), corazón (Beltrami *et al.*, 2003), pulmón (Griffiths *et al.*, 2005), placenta (In 't Anker *et al.*, 2004) y pulpa dental (Gronthos *et al.*, 2000) entre otros. Las características

relevantes que han convertido a las MSCs en blanco deseable en el campo de la medicina regenerativa y la terapia celular incluyen la capacidad de adherirse al plástico para formar colonias tipo fibroblastoides, elevada capacidad proliferativa y de diferenciación a varios linajes (**Figura 2**).

En los últimos años ha crecido considerablemente el interés particular por las MSC adultas aisladas a partir del compartimento vascular estromal del tejido adiposo. Se emplea un procedimiento simple de extracción, de fácil acceso al tejido adiposo subcutáneo, pudiéndose realizar un repetido número de veces. El protocolo de aislamiento de MSC a partir de tejido adiposo también es sencillo, se basa en un proceso de digestión enzimática. A su vez las MSC obtenidas de tejido adiposo tienen mayor capacidad de proliferación y diferenciación *in vitro* que las de médula ósea (Zhu *et al.*, 2008). Todo lo anteriormente mencionado convierte al tejido adiposo en una fuente de MSCs mucho más atractiva para investigación y aplicaciones clínicas. La obtención de las mismas se realiza a partir de tejido de descarte de cirugías estéticas como dermolipectomía o liposucción. La donación se realiza bajo consentimiento informado por parte del paciente, al cual se le ofrece información sobre el destino y uso de su tejido. En el año 1992 se iniciaba el desarrollo de la investigación en el área de las células madre derivadas de tejido adiposo, las ASCs (acrónimo inglés de *Adipose-derived Stem Cells*). En el trabajo de Young y colaboradores aislaron células a partir de grasa preperitoneal porcina e informaron que poseían una morfología similar a determinadas células adiposas subcutáneas humanas, al ser cultivadas en presencia de heparina y factor de crecimiento endotelial vascular (Young *et al.*, 1992). Recién en el año 2001, Zuk y colaboradores describieron a las ASCs como una población de células multipotentes. El tejido adiposo es derivado del mesoderma del embrión, al igual que la médula ósea, por lo que las ASC obtenidas del mismo tienen la capacidad potencial de, bajo determinadas condiciones,

dar origen a distintas células del mismo linaje mesodérmico como adipocitos, osteoblastos y condrocitos entre otros (Zuk *et al.*, 2002).



**Figura 2.** Aislamiento, expansión y diferenciación de MSCs. Las MSCs pueden ser aisladas de varios tejidos, ya sea de ratón, humano u otros animales. Esta población minoritaria de células puede ser aislada, expandida y enriquecida luego de pasajes seriales *in vitro*. Una combinación de marcadores positivos y negativos puede ser usada para determinar la pureza de las MSCs. Estas células a su vez pueden diferenciarse a varios tipos celulares como adipocitos, condrocitos, osteoblastos, neuronas y miocitos, entre otros (Figura adaptada de Chen *et al.*, 2016).



Respecto al aislamiento de ASCs, la información publicada sobre el rendimiento de este proceso es muy diversa. Se ha reportado que pueden obtenerse  $2-6 \times 10^8$  células procesadas de lipo-aspirado a partir de 300 ml de tejido adiposo (Zuk *et al.*, 2001) así como 5000 CFU-f (acrónimo inglés de *colony-forming unit-fibroblasts*) por g de tejido adiposo sólido (Strem *et al.*, 2005), siendo el rendimiento dependiente del método empleado para el aislamiento (Guilak *et al.*, 2004, Lei *et al.*, 2007). La mayoría de los estudios muestran que el tiempo de crecimiento de las células madre recién aisladas, incluidas las ASCs, es de aproximadamente 1 semana antes de su expansión (Lei *et al.*, 2007). Sin embargo, la capacidad de adherencia y de proliferación es más pronunciada en ASCs derivadas de donantes jóvenes comparado con donantes de mayor edad, como así también la diferenciación adipogénica, aunque la capacidad de diferenciación osteogénica no se encuentre alterada por la edad del donante (Shi *et al.*, 2005). En contraste con las células madre derivadas de médula ósea, el tejido adiposo es una fuente de abundantes MSCs, pudiéndose obtener un gran número de células a partir de muy poco volumen de tejido.

El tejido adiposo incluye diversos tipos celulares además de las ASCs, como preadipocitos, adipocitos, fibroblastos, células endoteliales y monocitos residentes, células de músculo liso o pericitos, linfocitos y macrófagos (Schäffler *et al.*, 2007). Por ello, la Federación Internacional de Ciencia y Terapia Adiposa (IFATS) y la Sociedad Internacional de Terapia Celular (ISCT) han establecido los criterios mínimos para la identificación de las ASCs una vez cultivadas (Bourin *et al.*, 2013). Uno de ellos es la expresión de determinados marcadores de superficie. Las células deben ser identificadas fenotípicamente por los siguientes marcadores que se expresan en ASCs, comunes incluso para otras MSCs, que incluyen CD90 (Thy-1), CD73 (L-VAP-2, acrónimo inglés de *lymphocyte-vascular adhesion protein-2*), CD105 (endoglina) y CD44 (HCAM, acrónimo inglés de *Homing Cell Adhesion Molecule*). A su vez, se debe verificar la ausencia de marcadores de aquellas células que pudieran

eventualmente “contaminar” la población de interés de ASC por su presencia en el tejido adiposo. Éstos son: CD45 (antígeno común leucocitario), marcador clásico de células de origen hematopoyético excepto glóbulos rojos; CD31 (PECAM-1, acrónimo inglés de *Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule*), marcador de células endoteliales y sus progenitores; CD34, antígeno de las células progenitoras hematopoyéticas; CD11b (ITGAM, acrónimo inglés de *Integrin alpha M*) expresado en monocitos y macrófagos; CD19, antígeno de Linfocitos B y HLA-DR (acrónimo inglés de *Human leukocyte antigen*), de leucocitos. Según el criterio establecido la caracterización debe resultar < 2 % para los marcadores negativos y > 90% para los marcadores positivos mencionados anteriormente. Los otros criterios establecidos indican que las ASCs deben poseer la capacidad de adherirse al plástico cuando se las mantiene en condiciones estándar de cultivo, y que deben presentar potencial de diferenciación multipotente, es decir, deben tener la capacidad de diferenciarse a condrocitos, osteoblastos y adipocitos bajo determinadas condiciones de diferenciación *in vitro*.

## 1.2 Adipogénesis

En el cuerpo humano el exceso de energía se almacena en forma de grasa en el tejido adiposo y durante la escasez de energía, esta grasa es liberada dentro del torrente sanguíneo en forma de ácidos grasos siendo los mismos usados por otros tejidos del cuerpo como fuente de energía (Siersbaek *et al.*, 2010). Por ello es que el tejido adiposo es considerado como un regulador esencial del balance energético y la homeostasis de la glucosa (Rosen *et al.*, 2006). Hay dos tipos de tejidos adiposos en el cuerpo humano: tejido adiposo marrón y tejido adiposo blanco. Este último es el más abundante e importante fuente de almacenamiento de energía en forma de triglicéridos, mientras que el tejido adiposo marrón es importante en la

regulación de energía a través de la termogénesis, siendo importante en la generación de calor en respuesta a ambientes fríos (Gesta *et al.*, 2007).

La adipogénesis es el proceso por el cual las células madre se convierten en adipocitos. Consiste en un proceso de varios pasos que requiere la activación secuencial de numerosos factores de transcripción, incluyendo la familia C/EBP (acrónimo inglés de *CCAAT-enhancer-binding proteins*) y PPAR (acrónimo inglés de *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma*), responsables de la expresión de proteínas claves que inducen la formación del adipocito maduro (Zhao *et al.*, 2000). El proceso de adipogénesis también involucra cambios en la morfología celular, inducción de la sensibilidad a la insulina y en la capacidad secretoria de las células (Lefterova *et al.*, 2009). PPAR es inducido durante la diferenciación de preadipocitos a adipocitos y es esencial para este proceso. En ausencia de éste, las células precursoras son incapaces de diferenciarse a un adipocito maduro (Rosen *et al.*, 2000). Por otra parte, PPAR es capaz de promover la adipogénesis de células deficientes en C/EBP, pero este último factor no es capaz de promover dicho proceso en células deficientes de PPAR, demostrando que PPAR es el regulador fundamental de la adipogénesis (Rosen *et al.*, 2002). PPAR juega un rol dominante en la diferenciación adipogénica, en el metabolismo de la glucosa, la inflamación y otros procesos fisiológicos, siendo también blanco de un amplio número de drogas antidiabéticas como fármacos sensibilizadores de la insulina (Desvergne *et al.*, 1999). El patrón de transcritos y proteínas que regulan la diferenciación adipogénica incluye el transportador de glucosa 4 (GLUT4), lipoproteína lipasa (LPL), esteroil-CoA-desaturasa (SCD) y sintetasa de ácidos grasos (FAS) (Moseti *et al.*, 2016). Las vías de señalización reguladoras de la adipogénesis incluyen: la vía de señalización Wnt, Hippo, Hedgehog y de la proteína morfogénica de hueso (BMP), entre otras (James, 2013). Para poder comprender la adipogénesis se han empleado durante años líneas celulares de preadipocitos, entre las que encontramos la línea de preadipocitos de ratón

3T3-L1 y 3T3-F442A, aisladas de embriones de ratones suizos de 17-19 días de edad. Estas células han sido caracterizadas y ampliamente utilizadas como modelo para el estudio de la diferenciación de preadipocitos (Green y Meuth, 1974). Los preadipocitos presentan una morfología fibroblastoide y pueden diferenciarse a adipocitos *in vitro* al cabo de una semana, en respuesta a un *cocktail* de drogas que se adiciona junto al medio de cultivo. Dicho *cocktail* consta de suero fetal bovino (SFB), insulina, dexametasona (un agonista selectivo de los glucocorticoides) y 3-iso-butil-1-metilxantina (IBMX, un inhibidor no selectivo de las fosfodiesterasas de los nucleótidos cíclicos, que resulta en la elevación de los niveles basales de AMPc) (Martini *et al.*, 2009). La insulina actúa por estimulación de las células en la captación de glucosa, la cual es almacenada en forma de triacilgliceroles. La dexametasona, al igual que la IBMX, inducen los genes responsables de la expresión de la familia de factores de transcripción C/EBP (Cao *et al.*, 1991). Zebisch y colaboradores describieron un protocolo detallado para la eficiente diferenciación de células 3T3-L1 a adipocitos (Zebisch *et al.*, 2012). En este protocolo adicionaron rosiglitazona (agonista de PPAR ) al *cocktail* mencionado, basados en un trabajo previo de Wabitsch (Wabitsch *et al.*, 2001). Tras dicho agregado encontraron que en preadipocitos 3T3-L1 la rosiglitazona estimula la diferenciación adipogénica de manera dosis dependiente con un máximo efecto a una concentración 2  $\mu$ M. Esta droga vuelve a las células más sensibles a la insulina a través de su unión a los receptores nucleares PPAR . La activación de estos receptores regula la transcripción de los genes que responden a la insulina implicados en el control de la producción, el transporte y la utilización de la glucosa. Aproximadamente 4 días después de la adición del *cocktail*, las células comienzan a acumular lípidos en forma de vacuolas lipídicas que crecen en número y tamaño a medida que transcurre el tiempo de cultivo de las células (Zebisch *et al.*, 2012), obteniéndose adipocitos maduros dentro de un período comprendido entre 5 y 7 días (Pal *et al.*, 2013). En la literatura encontramos diversos protocolos de diferenciación adipogénica

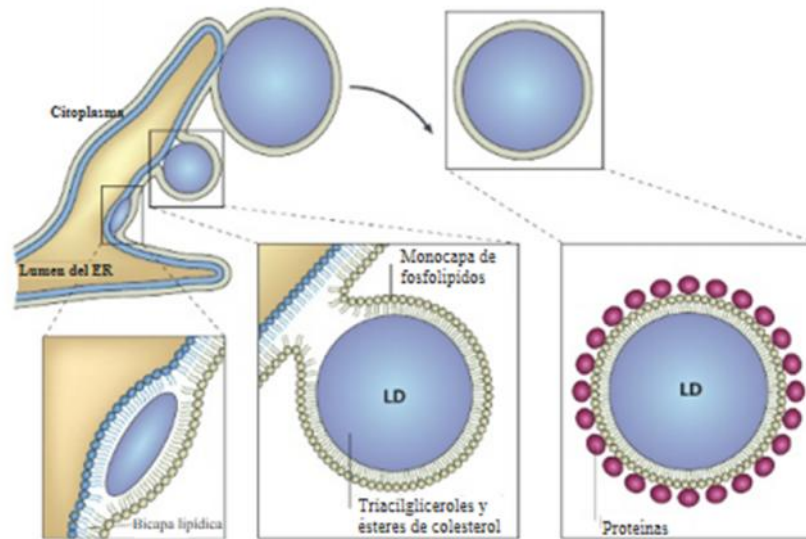
que contienen las drogas descritas anteriormente (muchos de ellos incluyen además la droga indometacina, inhibidora de la ciclooxigenasa 2 (COX2), siendo ésta última inhibidora de la adipogénesis (Styner *et al.*, 2010) en distintas proporciones y combinaciones. Por su rápida tasa de crecimiento, fácil manipulación y relativamente corto tiempo de diferenciación a adipocitos, es que las células 3T3-L1 se emplean como una línea modelo para estudios relacionados a la diferenciación adipogénica.

Durante la diferenciación adipogénica ocurre la aparición de proteínas y ARNm temprano, intermedio y tardío, y la acumulación de triglicéridos. Dicho proceso se desencadena en cuatro etapas principales: arresto del crecimiento, expansión clonal mitótica, diferenciación temprana y diferenciación terminal (Gregoire *et al.*, 1998). En el caso de la diferenciación adipogénica de MSCs se ha intentado describir los intermediarios celulares entre estas células madre y los adipocitos maduros, pero ha resultado complejo caracterizarlos a nivel molecular. Para los fines prácticos, la mayoría de los trabajos en este campo han descrito dos fases en la adipogénesis. La primera, conocida como fase de determinación, implica el compromiso de una célula madre con el linaje adipocito. La célula madre se convierte en preadipocito, el cual no puede ser distinguido morfológicamente de su precursor pero ha perdido el potencial de diferenciación a otros tipos celulares. La segunda fase se conoce como diferenciación terminal. En ella el preadipocito toma las características de una adipocito maduro, es decir, adquiere toda la maquinaria necesaria para el transporte y síntesis de lípidos, sensibilidad a la insulina y la secreción de proteínas específicas de adipocitos. La regulación molecular de la diferenciación terminal se encuentra más extensivamente caracterizada que la primera fase, debido a que en la mayoría de los estudios se han utilizado las líneas celulares mencionadas anteriormente, que al ser preadipocitos sólo son útiles para el estudio de la segunda fase (Rosen y MacDougald, 2006).

Al comienzo de la adipogénesis la insulina actúa a través de la señalización del receptor del factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-1), ya que los preadipocitos expresan muchos más receptores para IGF-1 que para insulina, aunque esta proporción cambia a medida que la diferenciación avanza (Smith *et al.*, 1988). El receptor de insulina individual (IRS) es un receptor transmembrana activado por la hormona insulina. Es una glucoproteína que pertenece a la familia de receptores de factores de crecimiento con actividad intrínseca de quinasas de Tyr (RTK's), los cuales al ser estimulados por su ligando se autofosforilan en residuos de Tyr. Una vez que la insulina interacciona con su receptor y éste es activado, se inician cascadas de señalización. Dos vías de transducción son activadas por acción de la insulina: la vía de la fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K) y la vía de las quinasas activadas por mitógenos (MAP quinasas) (Myers y White, 1996). La insulina promueve la translocación del transportador de glucosa GLUT4 de compartimentos intracelulares a la membrana plasmática, por una vía que depende de la activación de PI3K. Esto conlleva a un aumento de transporte de glucosa desde la circulación sanguínea al interior de la célula (McCarthy *et al.*, 2007). La pérdida del sustrato del receptor de insulina individual inhibe la adipogénesis (Tseng *et al.*, 2004).

Casi todas las células son capaces de almacenar lípidos en reservorios separados del citoplasma. Para empaquetar los lípidos eficientemente, las células los convierten en lípidos neutros, tales como triacilgliceroles y ésteres de esteroides, que excluyen el agua. Estos lípidos se depositan en organelas intracelulares especializadas llamadas vacuolas lipídicas (que también se conocen como adiposomas, cuerpos de lípidos o cuerpos de aceite) (Brasaemle y Wolins, 2012). Estas vacuolas constituyen depósitos de lípidos (tales como esteroides, ácidos grasos y fosfolípidos) para la síntesis de membrana, además de almacenar energía. Con su papel en el almacenamiento de lípidos, las vacuolas lipídicas ocupan un lugar prominente en las patologías comunes que están vinculadas a la acumulación de lípidos, incluida la

obesidad, la diabetes y la aterosclerosis (Krahmer *et al.*, 2013). En organismos eucariotas, las vacuolas lipídicas se originan en el retículo endoplásmico (ER, acrónimo inglés *endoplasmic reticulum*). Aún se desconoce el proceso inicial de formación de las vacuolas lipídicas. La mayoría de los modelos indican una acumulación inicial de triacilglicerol (o ésteres de esteroides) entre las membranas de la bicapa del ER, y que en algún momento la estructura en crecimiento brotará del ER dando lugar así a una organlea independiente cuyo contenido está rodeado de una monocapa de fosfolípidos y proteínas asociadas (**Figura 3**). Una vez formadas, las vacuolas crecen en tamaño por un proceso que es independiente de la biosíntesis de triglicéridos. Por fusión entre ellas las vacuolas aumentan su tamaño y este proceso se logra por el transporte de las vesículas a través de los microtúbulos (Boström *et al.*, 2005).



**Figura 3.** Modelo de la formación de las vacuolas lipídicas. Los lípidos neutros se sintetizan en la bicapa lipídica de la membrana del ER. La vacuola madura luego se desprende del ER como una organela independiente, limitada por una monocapa lipídica y proteínas asociadas (Figura adaptada de Martin y Parton, 2006)

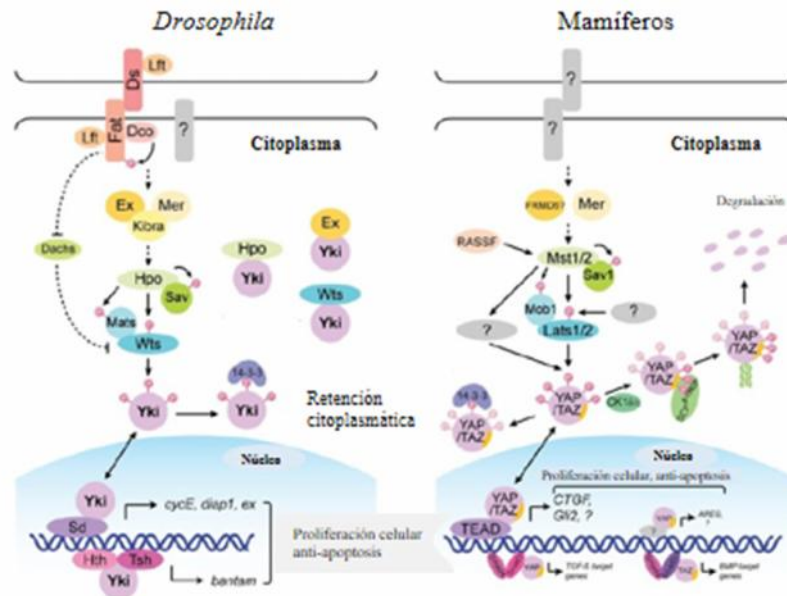
El proceso opuesto a la formación de las vacuolas lipídicas es el proceso de contracción, denominado lipólisis. Dado que los triglicéridos son insolubles, lo que impide su transporte dentro de la célula, son convertidos en productos solubles tales como ácidos grasos y monoacilglicérol. Éstos son liberados por los adipocitos como combustible para los tejidos (tales como músculo esquelético y corazón). Para ello dentro de las vacuolas lipídicas se lleva a cabo la hidrólisis de los lípidos neutros, y la misma es catalizada por la acción secuencial de tres lipasas (Young y Zechner, 2013). Estas lipasas están constitutivamente localizadas en las vacuolas lipídicas.



### 1.3 La vía de la quinasa Hippo

La vía de señalización Hippo regula diversos procesos celulares incluyendo la supervivencia, proliferación y diferenciación, por lo que es una importante reguladora del tamaño de órganos y tejidos. Esta vía fue inicialmente caracterizada en *Drosophila melanogaster* por *screenings* genéticos. Estos *screenings* identificaron inicialmente tres componentes, incluyendo dos quinasas, Hippo (Hpo) y Warts (Wts), y la proteína andamio Salvador (Sav) (Justice *et al.*, 1995, Pantalacci *et al.*, 2003, Xu *et al.*, 1995). La proteína Mats (acrónimo inglés de *Mob-astumor-supressor*) fue identificada luego como otro componente de la vía Hippo (Lai *et al.*, 2005). En diversos estudios realizados en *Drosophila* se pudo apreciar que mutaciones en algunas de las proteínas mencionadas anteriormente resultaban en el crecimiento anormal de tejidos y órganos, dando fenotipos agrandados. De ahí el nombre otorgado a esta vía de señalización, a raíz de la palabra en inglés *hippopotamus* (Staley e Irvine., 2012). Estas proteínas propagan una cascada de fosforilaciones (Zhao *et al.*, 2010) en la cual Sav y Mats median la formación del complejo entre Hpo y Wts, resultando en la fosforilación y activación de Wts por Hpo. Esto a su vez conduce a la fosforilación del regulador transcripcional Yorkie (Yki). Yki fosforilado se une a la familia de proteínas reguladoras 14-3-3 (Aitken, 2006, Bustos, 2012; ver sección 1.4), las cuales retienen a Yki en el citoplasma inhibiendo así sus funciones en el núcleo.

La vía Hippo se conserva en mamíferos, sin embargo existe un mayor nivel de complejidad, como es a menudo el caso, en comparación con la mosca. En humanos y ratones, esta vía consiste en las quinasas MST1 y MST2 (homólogas de Hpo), las cuales fosforilan y activan las quinasas LAST1 y LATS2 (homólogas de Wts). Las quinasas LATS1/2 fosforilan los reguladores transcripcionales TAZ (acrónimo inglés de *Transcriptional co activator with PDZ binding motif*) y YAP (acrónimo inglés de *Yes-associated protein*), homóloga a Yki (**Figura 4**).

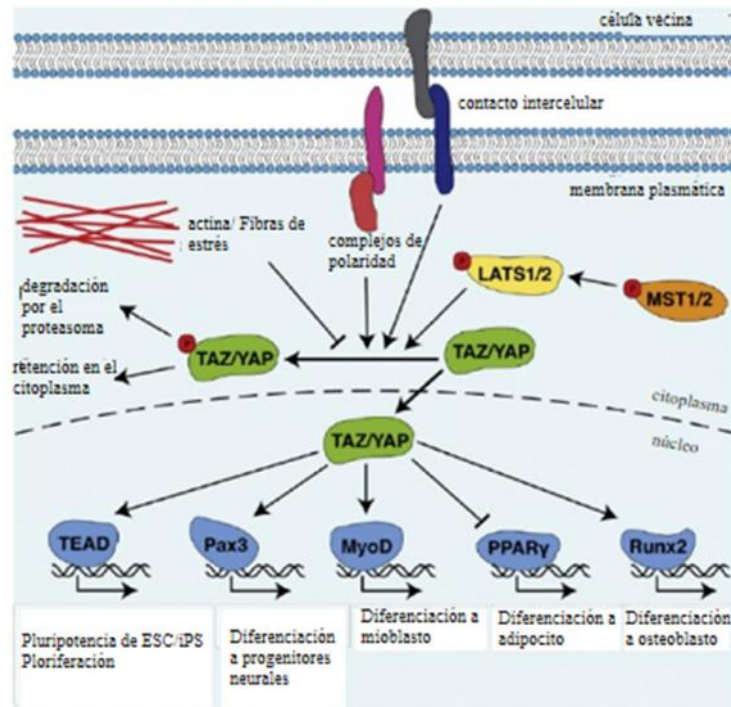


**Figura 4.** Modelos comparativos de la vía Hippo en *Drosophila* y mamíferos. Las proteínas correspondientes a genes homólogos fueron representadas con los mismos colores (Figura adaptada de Zhao *et al.*, 2010)

Mucho antes que la vía fuera descrita, los componentes de la misma fueron identificados por estar involucrados en otros procesos, como por ejemplo, MST1/2 fueron identificadas como inductores de apoptosis (Graves *et al.*, 1988, Lee *et al.*, 2001), mientras que LATS1/2 fueron inicialmente identificadas como reguladores de la progresión del ciclo celular (Hori *et al.*, 2000, Tao *et al.*, 1999). YAP fue la primera proteína identificada conteniendo un dominio de interacción WW (Sudol *et al.*, 1995); y TAZ, parálogo de YAP, fue identificada como un co-regulador transcripcional que se une a la familia de proteínas reguladoras 14-3-3 (Kanai *et al.*, 2000), cuya interacción fue de particular interés en esta tesis. Estudios posteriores revelaron que, así como en *D. melanogaster*, la función de esta familia en la vía Hippo tiene implicancias en la regulación de la localización sub-celular de ambos efectores, TAZ y YAP

y en consecuencia su actividad transcripcional. La familia de proteínas 14-3-3 tiene un rol central en la señalización celular mediada por fosforilación, ya que se une específicamente a residuos fosforilados en serina o treonina (pS/T) en sus proteínas blanco (Aitken, 2006, Bustos, 2012), afectando su localización, actividad, entre otras cosas. Para más información sobre las proteínas 14-3-3 ver sección 1.5. En humanos, el sitio de fosforilación que media la unión a 14-3-3 en TAZ es la serina 89 y en YAP la serina 127, ambos son fosforilados por LATS1-2. Mutaciones en estos sitios favorecen la localización nuclear de ambos efectores (Basu *et al.*, 2003, Kanai *et al.*, 2000). Otros sitios son fosforilados por LAST1/2 en ambas proteínas, resultando en la ubiquitinación y consecuente degradación por el proteasoma (Liu *et al.*, 2010, Zhao *et al.*, 2010). Estudios posteriores revelaron que la localización de TAZ/YAP está controlada por señales celulares mecanosensoras (Dupont *et al.*, 2011). Esta regulación depende de la actividad de proteínas RhoGTPasas y la actina del citoesqueleto, quienes responden a estímulos otorgados por la tensión física. Bajo alta tensión del citoesqueleto, TAZ y YAP se localizan en el núcleo, mientras que una baja tensión provoca que dichas proteínas se localicen en el citoplasma, por lo tanto se puede decir que la vía Hippo responde a señales mecánicas. Se sabe también que la vía Hippo tiene un rol importante en la inhibición por contacto y la regulación del crecimiento a través de las propiedades físicas de las células. Uniones adherentes y complejos cadherina-catenina activan la vía Hippo e inhiben el crecimiento celular (Kim *et al.*, 2011).

Las proteínas TAZ/YAP poseen dominios de activación transcripcional (Kanai *et al.*, 2000, Yagi *et al.*, 1999) y cuando están en el núcleo pueden regular la transcripción de numerosos genes. Sin embargo, TAZ/YAP no se unen directamente al ADN, sino que interaccionan con una variedad de factores de transcripción (**Figura 5**).



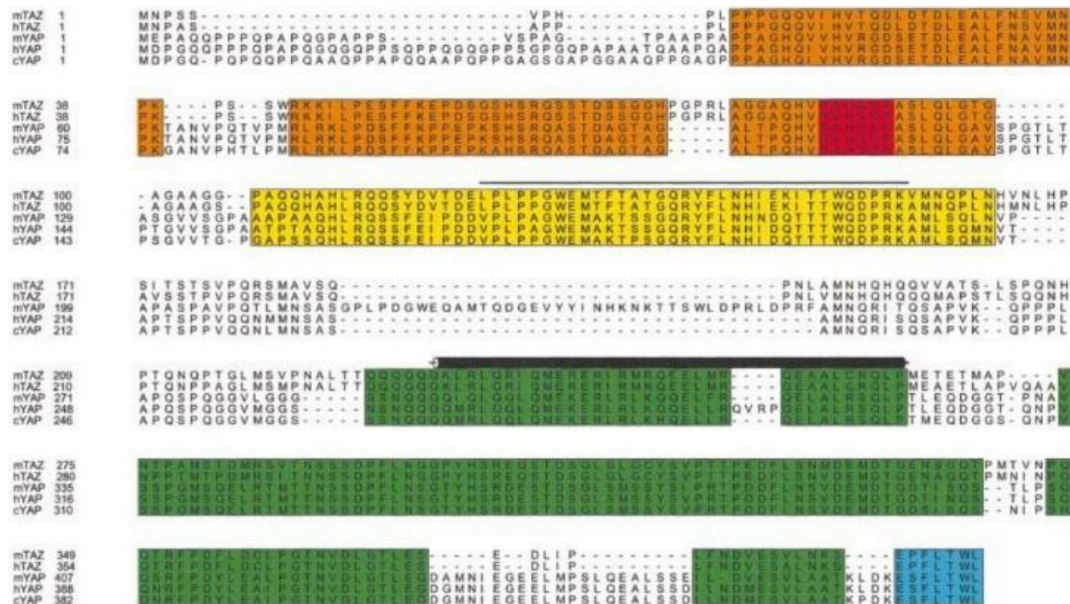
**Figura 5.** Rol nuclear de los co-reguladores transcripcionales TAZ y YAP en la biología de las células madre. TAZ y YAP se unen a diversos factores de transcripción para dirigir la auto-renovación y diferenciación de células madre embrionarias (ESC) y de células madre pluripotentes (ISC) inducidas, entre otros tipos de células madre (Figura adaptada de Hiemer *et al.*, 2013).

#### 1.4 TAZ (*Transcriptional co-activator with PDZ-binding motif*)

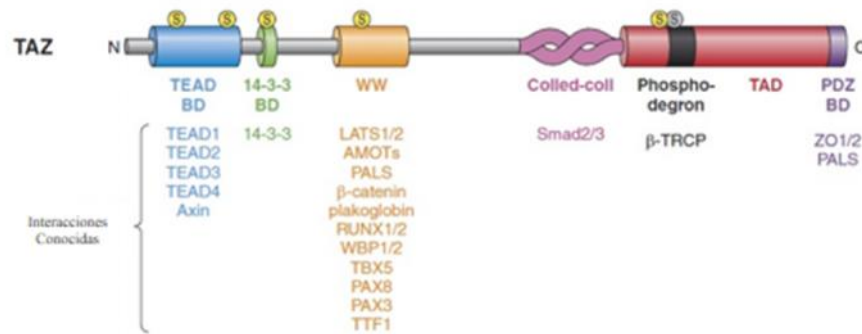
Como se mencionó anteriormente, TAZ (también llamado WWTR1, por *WW-domain transcriptional regulator 1*) es un co-activador/represor de transcripción de 45 KDa que ha sido aislado como una proteína de unión a 14-3-3 (Kanai *et al.*, 2000). Análisis de secuencias revelaron que TAZ es paróloga de YAP, presentan un 45 % de identidad en sus secuencias aminoacídicas (Kanai *et al.*, 2000) (**Figura 6**). El extremo N-terminal de ambas está compuesto por un dominio TB (TEAF/TEAD-binding) que reconoce la familia de factores de

transcripción TEAF/TEAD y un motivo de unión a 14-3-3 que es clave en la regulación de su localización sub-celular. En la región central TAZ contiene un dominio WW mediante el cual reconoce el motivo L/PPxY presente en muchos factores de transcripción (Kanai *et al.*, 2000). El extremo C-terminal contiene un dominio TA (*Transcriptional activation*) y un dominio de unión PDZ, el cual es esencial para la co-activación de la transcripción génica (Varelas, 2014) (**Figura 7**). En general TAZ co-activa la transcripción de genes relacionados con la proliferación celular, supervivencia y anti-apoptosis (Varelas, 2014). A nivel molecular, TAZ regula diversos procesos dependiendo del contexto celular: en MSC, regula la diferenciación a osteoblastos y a adipocitos. En estas células, el factor de transcripción Runx2 (acrónimo inglés de *Runt-related transcription factor 2*) conduce la diferenciación a osteoblastos, y PPAR  $\alpha$  a adipocitos. TAZ co-activa la transcripción dependiente de Runx2 al mismo tiempo que co-reprime la dependiente de PPAR  $\alpha$ . La modulación de la expresión de TAZ en MSCs altera la capacidad de diferenciación osteogénica/adipogénica en condiciones de inducción de la diferenciación (Hong *et al.*, 2005). TAZ está desregulada en muestras de cáncer de mama humano y su inhibición reduce la generación de tumores (Ramos y Camargo, 2012). Estudios recientes señalan a TAZ como posible blanco para diagnóstico, pronóstico y terapias de distintos cánceres (Zhou *et al.*, 2011), aún cáncer de mamas resistente a drogas en estados avanzados (Lai *et al.*, 2011). Se sabe también que la regulación post-transcripcional de TAZ en células humanas altera el proceso de reprogramación celular (Qin, *et al.* 2012). La disminución de los niveles de LATS2 por ARN de interferencia (RNAi) incrementa la eficiencia de reprogramación de fibroblastos humanos, sugiriendo que LATS2 es un antagonista en dicho proceso. Según fue demostrado por Qin y colaboradores el efecto de LATS2 en la reprogramación es mediado por represión de TAZ y no de YAP (Qin *et al.*, 2012). Al sobre-expresar YAP o disminuir sus niveles por RNAi no se observó efecto alguno en la reprogramación de fibroblastos humanos, incluso en aquellas células que presentaban

disminución de los niveles de LAST2, mientras que, al disminuir los niveles de TAZ por RNAi hubo disminución de la eficiencia de reprogramación. Además, el *knockdown* de TAZ suprime completamente la mejora alcanzada en la generación de iPS humanas por disminución de LAST2 (Qin *et al.*, 2012). TAZ interactúa también con la familia de factores de transcripción TEADs. Tanto *knockdown* de TEADs como la mutación en TAZ en Ser51 por alanina impide dicha interacción, disminuyendo la función de TAZ en la proliferación, migración celular y transición epitelio-mesénquima (Zhang *et al.*, 2009).



**Figura 6.** Alineamiento de secuencias de TAZ murina y humana con la secuencia de YAP murina, humana y aviar. Las regiones altamente conservadas fueron identificadas en colores: la que incluye al dominio WW (indicado con una línea) está marcada en amarillo, el dominio de activación transcripcional en verde y la región N-terminal en naranja. El sitio de unión a 14-3-3 se indica en color rojo, y el motivo de unión PDZ en azul. El dominio *coiled-coil* fue señalado con un cilindro (Figura adaptada de Kanai *et al.*, 2000).



**Figura 7.** Representación esquemática que muestra los dominios de TAZ, el mapa de interacción con otras proteínas y los residuos blanco de fosforilaciones (Figura adaptada de Piccolo *et al.*, 2014).

Si bien TAZ y YAP humanas presentan un 45 % de identidad en aminoácidos, y comparten varias características, presentan diferencias que aún están siendo estudiadas y cuyos límites no están bien definidos. Algunas de ellas incluyen diferencias en la estructura secundaria de la región N-terminal, que se ve reflejada en diferencias en la unión de factores de transcripción TEADs, específicamente TEAD4 se une a YAP y no a TAZ (Chen *et al.*, 2010). Se sabe que ratones *knockout* de YAP presentan letalidad embrionaria, mientras que los *knockout* de TAZ sobreviven hasta la adultez pero con defectos en riñones y pulmones (Hossain *et al.*, 2007, Morin-Kensicki *et al.*, 2006). Aparentemente TAZ y YAP poseen algunos roles invertidos en células de ratón y humano: YAP regula la auto-renovación de ESCs y puede incrementar la eficiencia de generación de iPS de ratón (Lian *et al.*, 2010, Tamm *et al.*, 2011), pero no hay indicios experimentales suficientes de su rol en ESCs o generación de iPS humanas. Al contrario, TAZ es importante en la auto-renovación de ESCs y generación de iPS humanas pero no en ESCs de ratón. Esta diferencia podría deberse a los distintos requerimientos en señalización de células madre de ratón y humano. Por ello sería

importante distinguir los mecanismos de señalización de TAZ y YAP en los diferentes tipos de iPS (Qin *et al.*, 2012).

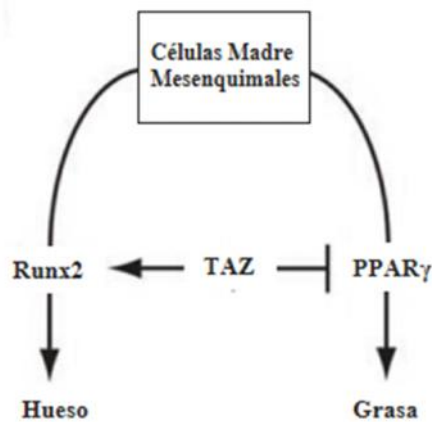
Como se mencionó anteriormente, determinados cambios en el ambiente extracelular que se traducen en modificaciones en el citoesqueleto, activan la vía Hippo desencadenando una cascada de fosforilaciones. La quinasa LATS2 fosforila a TAZ en el residuo Ser89 generando un sitio de unión a la familia de proteínas reguladoras 14-3-3. La unión a 14-3-3 retiene a TAZ en el citoplasma, lo que impide su acción nuclear, es decir inhibe la transcripción de sus genes blanco (Kanai *et al.*, 2000). Además del residuo Ser89, TAZ es fosforilada en Ser66, Ser117 y Ser311 (Lei *et al.*, 2008). Específicamente el cambio de la Ser89 por alanina en TAZ (mutante S89A) impide su unión a 14-3-3 y causa su acumulación en el núcleo (Kanai *et al.*, 2000). La fosforilación de TAZ en Ser311 promueve la ubiquitinación y degradación por el proteasoma (Liu *et al.*, 2010). PP1 (*Protein Phosphatase 1*) fue identificada inicialmente como una proteína de interacción con TAZ y luego como fosfatasa del co-regulador transcripcional. PP1A junto a otra proteína de interacción con TAZ, ASPP2, disminuyen los niveles de TAZ fosforilado e incrementan su actividad transcripcional (Liu *et al.*, 2011).

A través de la interacción con diferentes factores de transcripción, TAZ interviene en diversos procesos biológicos. Se sabe que es un regulador crucial en la diferenciación de MSC que puede promover la diferenciación a osteoblastos por activación de la transcripción génica dependiente de Runx2 y al mismo tiempo reprimir la diferenciación adipogénica dependiente de PPAR (Hong *et al.*, 2005).

*In vitro*, la densidad del cultivo afecta la localización sub-celular de TAZ. A una alta densidad celular la vía Hippo se activa y se fosforila TAZ en Ser89 y Ser311, por lo cual se inhibe la actividad nuclear de TAZ ya que se promueve su localización citoplasmática y degradación por el proteasoma. Así se libera la represión de PPAR generada por la presencia



de TAZ en el núcleo, activándose la expresión de genes involucrados en la diferenciación adipogénica (**Figura 8**). Por ello para inducir la diferenciación adipogénica *in vitro*, las células deben crecerse primero a confluencia y luego adicionar el medio de diferenciación (Hong *et al.*, 2005). También durante la diferenciación de células 3T3-L1 a adipocitos se ha encontrado que los niveles de ARNm de LATS2 se incrementan significativamente (Liu *et al.*, 2010), lo que contribuye a su vez a la retención de TAZ en el citoplasma por fosforilación en S89 y unión a 14-3-3.



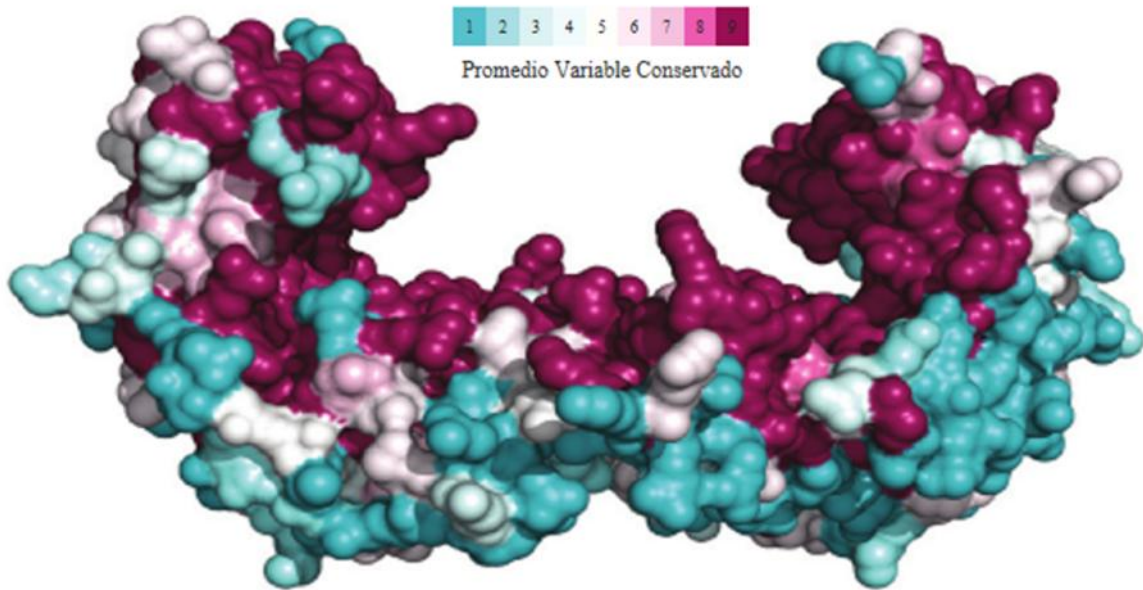
**Figura 8.** Modelo de la modulación de osteogénesis y adipogénesis por TAZ en células madre mesenquimales adultas (Figura adaptada de Hong *et al.*, 2005)

### 1.5 La familia de Proteínas 14-3-3

Las proteínas 14-3-3 constituyen una familia altamente conservada, presente en todos los eucariotas estudiados hasta el momento. En mamíferos dicha familia está compuesta por 7 parálogos denominados con las letras griegas  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\zeta$ , y  $\eta$ . Como hemos mencionado, la familia de proteínas 14-3-3 tiene un rol central en diversos procesos de señalización celular debido a su unión específica a residuos de fosfo-serina o fosfo-treonina (pS/T) en las proteínas blanco (Aitken, 2006). Cabe destacar que 14-3-3 no es un dominio sino una familia

de proteínas, lo que las diferencia de dominios de unión a proteínas fosforiladas como WD40, etc. Las proteínas de unión a 14-3-3 están involucradas en diversos procesos celulares como diferenciación, apoptosis, tráfico vesicular, transducción de señales, regulación del ciclo celular, organización del citoesqueleto, etc. (Angrand *et al.*, 2006, Morrison, 2009). Existen dos secuencias consenso de unión a proteínas 14-3-3: modo 1 (RSxpS/TxP) y modo 2 (RxY/FxpS/TxP); donde x es cualquier aminoácido. La mayoría de las proteínas que unen 14-3-3 lo hacen a través de una de las dos secuencias (Aitken, 2006, Bustos, 2012); TAZ se une a 14-3-3 mediante un típico motivo modo 1 que contiene a la Ser89 (Hong *et al.*, 2005). Una vez unidas a sus proteínas blanco, las proteínas 14-3-3 tienen diferentes efectos sobre éstas: modular la actividad, localización sub-celular (ocultando o exponiendo señales de localización), evitar la degradación o la desfosforilación, favorecer o inhibir la formación de determinados complejos, etc. (Nellist *et al.*, 2003). Según de que parálogo se trate, las proteínas 14-3-3 pueden formar homó u heterodímeros (Wilker *et al.*, 2005) (**Figura 9**). Si bien en un principio se consideraba que los diferentes parálogos eran redundantes, en los últimos años se han acumulado en la literatura estudios más detallados demostrando innumerables ejemplos de especificidad (Bustos, 2012, Sun *et al.*, 2009, Uhart y Bustos, 2013). Uno de los más interesantes es el del parálogo  $\delta$ : el gen está ausente en todos los pacientes con síndrome Miller-Dieker (Toyo-oka *et al.*, 2003), los que presentan retardo mental severo y epilepsia asociada a defectos en la migración de neuronas. En distintos tejidos, tipos o estadios celulares, los niveles relativos de los 7 parálogos de 14-3-3 son diferentes (van Hermet *et al.*, 2001). Los niveles de ARNm de 14-3-3 también cambian durante la diferenciación celular; por ejemplo en ratón, los niveles de ARNm de 14-3-3  $\delta$  son altos en células madre y mesénquima temprano y disminuyen a medida que éste se diferencia (McConnell *et al.*, 1995). Los niveles de ARNm del parálogo  $\delta$  son altos únicamente en

cerebro, en espermatoцитos en profase meiótica y en espermátides en diferenciación, lo que sugiere una rol importante de 14-3-3 en estos tejidos (Perego y Berruti., 1997).



**Figura 9.** Estructura cristalográfica del dímero de 14-3-3. Cada monómero incluye una región conservada en forma de cavidad que constituye el sitio de unión a sus proteínas ligando (Figura adaptada de Bridges y Moorhead, 2005).

Se sabe que entre las diversas proteínas que afectan la adipogénesis, Lipin1 y TAZ comparten el modo de regulación de su localización sub-celular a través de su retención en el citoplasma por fosforilación y unión a las proteínas reguladoras 14-3-3 (Kanai *et al.*, 2000, Péterfy *et al.*, 2010). Lipin1 es una proteína bifuncional involucrada tanto en la biosíntesis de triglicéridos durante la adipogénesis, a través de su actividad fosfatidato fosfatasa, como en el metabolismo de los lípidos, actuando como un co-activador transcripcional de genes involucrados en el metabolismo oxidativo (Péterfy *et al.*, 2010). Péterfy y colaboradores (Péterfy *et al.*, 2010) demostraron que la estimulación de preadipocitos 3T3-L1 resulta en un

incremento de Lipin-1 fosforilada, favoreciéndose su unión a 14-3-3 y su localización predominantemente citoplasmática.

Como se explicó previamente, la actividad de TAZ esta dinámicamente regulada por transporte núcleo-citoplasma. 14-3-3 retiene a TAZ en el citoplasma, impidiendo la co-activación/represión transcripcional. En células HeLa por ejemplo, la co-expresión de GFP-TAZ con 14-3-3 causa la acumulación de TAZ en el citoplasma (Kanai *et al.*, 2000). Ya se conoce el efecto de la interacción de TAZ con la familia de proteínas 14-3-3 en cuanto a la regulación de su localización sub-celular. Sin embargo, la información es escasa respecto a las proteínas 14-3-3 involucradas en la regulación de TAZ. Aún no se conocen los niveles relativos de los siete parálogos de 14-3-3 en células madre mesenquimales ni como varían dichos niveles pre- y post- diferenciación. Tampoco se sabe cuáles parálogos interaccionan con TAZ y regulan su localización sub-celular afectando su actividad.

Éstas y otras interacciones de 14-3-3 con proteínas relacionadas a la adipogénesis muestran la importancia de esta familia en la regulación de este proceso de diferenciación.

Teniendo en cuenta los antecedentes mencionados, nuestra hipótesis de trabajo plantea que existe una regulación del proceso de diferenciación adipogénico en células MSCs dependiente de parálogo de la familia de proteínas 14-3-3, y que la misma es -al menos en parte- a través de la interacción de ellos con el co-regulador transcripcional TAZ, ya que su unión impide la translocación de TAZ al núcleo, activándose así la expresión de genes dependientes de PPAR , uno de los factores de transcripción claves en el proceso de adipogénesis.

# *Objetivos*

El objetivo general en el que se enmarca esta tesis fue estudiar la interacción de la familia de proteínas 14-3-3 con el co-activador/represor transcripcional TAZ y su efecto en la diferenciación adipogénica de células madre mesenquimales adultas.

### *Objetivos específicos*

1. Optimizar el protocolo de diferenciación adipogénica en células madre mesenquimales adultas.
2. Estudiar los niveles relativos de los diferentes parálogos de 14-3-3 en MSCs durante la diferenciación adipogénica.
3. Producir un anticuerpo policlonal que reconozca específicamente la proteína TAZ.
4. Evaluar el efecto de la inhibición de ARNm de distintos parálogos de 14-3-3 mediante la expresión de ARN pequeños llamados *shRNAs* (del inglés *short hairpin RNAs*) sobre la localización sub-celular de TAZ.

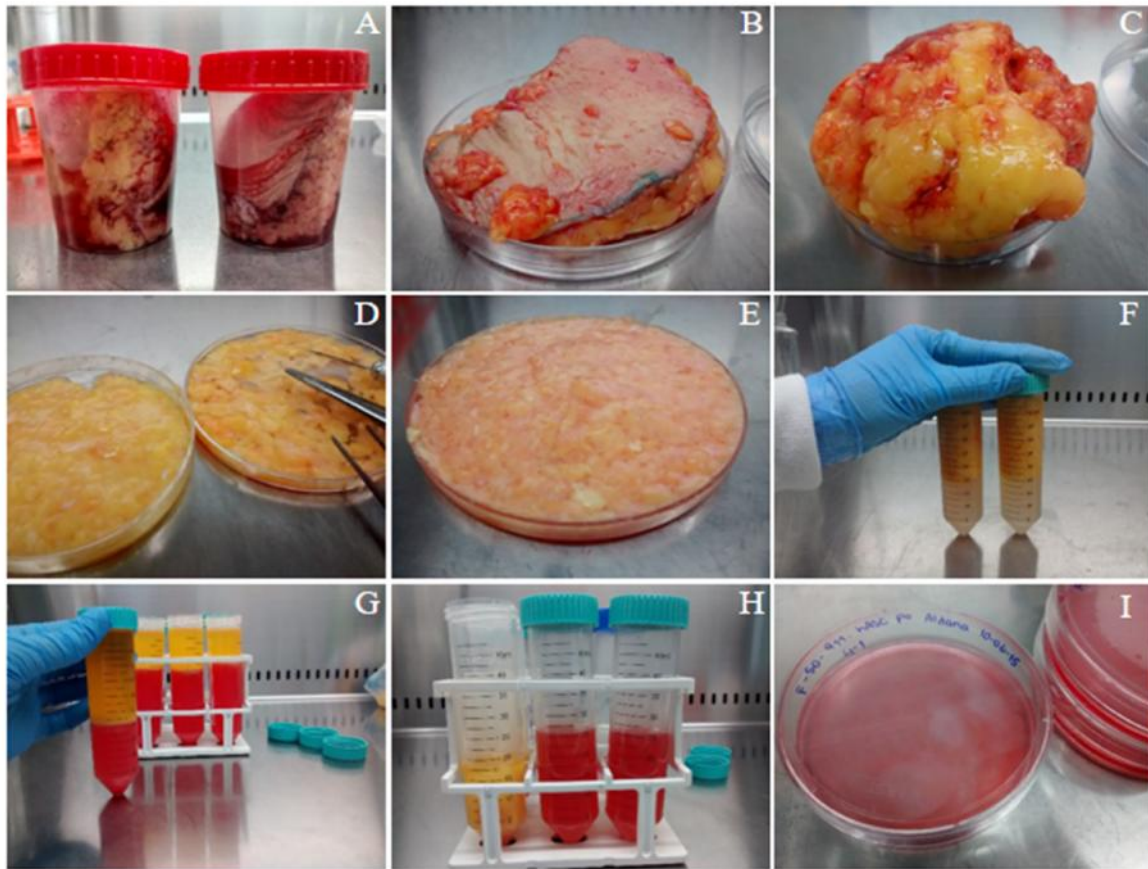
# *Materiales y Métodos*

### 3.1 Aislamiento de Células Madre derivadas de tejido adiposo humano (hASCs)

El tejido adiposo subcutáneo humano se obtuvo de cirugías estéticas, principalmente dermolipectomía abdominal, bajo responsabilidad médica y consentimiento informado por parte del paciente (Hospital Italiano de La Plata, La Plata, Pcia. de Buenos Aires; Clínica Javier Cattaneo y Hospital Luis Carlos Lagomaggiore, Mendoza, Pcia. de Mendoza; y Clínica del Prado, San Juan, Pcia. de San Juan). Aproximadamente 150 g de tejido adiposo fueron lavados con *buffer* fosfato salino (PBS, NaCl 0,13 mM, KCl 2,70 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM y KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2 mM, pH 7,00) para eliminar restos de sangre y dejar visibles los vasos sanguíneos que enervan el tejido altamente vascularizado (**Figura 10 A-C**). Posteriormente, la grasa se disgregó mediante la utilización de un bisturí y se trasvasó a un tubo cónico de 50 ml para subsecuentes lavados con PBS y centrifugaciones a 200 x g durante 3 min hasta observar absolutamente límpido el sobrenadante (sin rastros de sangre) (**Figura 10 D-F**). A continuación se incubó con el *buffer* de digestión, el cual contenía las enzimas colagenasa 0,10 % p/v (*Roche*) y tripsina 0,25 % p/v (*Gibco*) disueltas en PBS, durante 45 min en un *shaker* a 37 °C, 200 rpm. Una vez pasado dicho tiempo se neutralizaron las enzimas mediante el agregado de SFB 10% v/v (grado biotecnológico, Internegocios SA) como suplemento del medio de cultivo *Dulbecco's Modified Eagle Medium* alta glucosa (DMEM, *Gibco*). En general este medio lo utilizamos con la adición de dos antibióticos: penicilina 100 U/ml y estreptomycinina 100 µg/ml (*Gibco*) y lo llamamos DMEM **completo** al estar suplementado con SFB y antibióticos. Luego se filtró a través de una malla metálica de 1 mm de poro para separar el tejido conectivo; el líquido recuperado se trasvasó a un tubo cónico de 50 ml y se centrifugó a 300 g durante 10 min con el fin de obtener la fracción estromal vascular (FEV) (**Figura 10 G**). Durante este proceso se obtuvieron tres fases: i) una fase superior líquida amarilla compuesta por lípidos, producto de la ruptura de adipocitos durante el procesamiento; ii) una fase intermedia blanquecina que contiene adipocitos maduros y iii)



una fase inferior acuosa roja compuesta por DMEM (que le da la coloración debido a su contenido de fenolftaleína) y un precipitado o *pellet* celular que corresponde a la FEV. Ésta contiene células madres mesenquimales adultas y también células precursoras de células sanguíneas y endoteliales, entre otras. Cuidadosamente se procedió a recuperar con pipeta la fase acuosa y el *pellet* celular, los cuales se colocaron en un nuevo tubo cónico de 50 ml y se centrifugaron a 300 x g, 10 min (**Figura 10 H**). Se descartó el sobrenadante y se adicionaron 10 ml de DMEM, se volvió a centrifugar a 300 x g esta vez por 5 min. Se descartó el sobrenadante y el *pellet* se resuspendió en 10 ml de DMEM **completo** y se cultivó en una placa de 10 cm de diámetro (Pasaje 0, “P<sub>0</sub>”) a 37 °C y CO<sub>2</sub> 5 % (**Figura 10 I**). Después de 24 h se realizaron 3 lavados con PBS para eliminar los glóbulos rojos y otras células no adherentes y se agregó DMEM **completo**. Este procedimiento se repitió hasta no observar más glóbulos rojos. Las células se mantuvieron hasta llegar a 100 % de confluencia, momento en el que se las dividió para su expansión.



**Figura 10.** Aislamiento de ASCs a partir de tejido adiposo sólido humano. A) Recibimiento de muestras. B) Colocación de la muestra sobre una caja de Petri. C-E) Disgregación de la grasa. F) Lavado de la grasa con *buffer* PBS. G) Recolección post-filtrado y centrifugación. H) Separación de la FEV. I) Siembra del *pellet* celular obtenido en placa de 10 cm de diámetro con medio DMEM **completo**.

### 3.2 Expansión y criopreservación de células hASCs, 3T3-L1 y HEK293T

Para la expansión, células crecidas a 100 % de confluencia en una placa de 10 cm de diámetro en condiciones estándar (medio DMEM **completo**, a 37 °C y CO<sub>2</sub> 5 %) fueron lavadas con *buffer* PBS y levantadas mediante adición de 500 µl de tripsina e incubación a 37 °C durante 30 s. Mediante el agregado de 3 ml de DMEM **completo** se inactivó la enzima y

el volumen total se dividió en 3 placas (hASCs). Las células 3T3-L1 y HEK293T se diluyeron 1:15 para su división.

De cada aislamiento se congelaron entre 3 y 6 criotubos conteniendo hASCs en pasaje 2 (P<sub>2</sub>). Para ello células crecidas a 100 % de confluencia en una placa de 10 cm de diámetro en condiciones estándar fueron levantadas con tripsina. Seguidamente, se centrifugaron las células a 300 g durante 5 min para lavar la tripsina, se descartó el sobrenadante y las células fueron resuspendidas en medio de congelamiento (DMEM **completo** y dimetil sulfóxido (DMSO) 10 %). Para el congelamiento se utilizó un sistema de enfriamiento lento, en el que los criotubos se colocaron en una gradilla sumergida en isopropanol a -80 °C por 3 días, y luego se pasaron a un tanque con N<sub>2</sub> líquido para su almacenamiento por tiempos prolongados. Las células 3T3-L1 y HEK293T se congelaron siguiendo el mismo procedimiento anteriormente descrito, colocando primeramente los criotubos a -80 °C y luego trasasándolos a N<sub>2</sub> líquido, aunque no se empleó el sistema con isopropanol.

Para el descongelado se procedió a colocar el criovial en un baño a 37 °C, en agitación. Luego se trasvasó el contenido a un tubo cónico conteniendo 9 ml de DMEM y las células fueron centrifugadas a 300 g, 5 min, con el objetivo de lavar el crioprotector. Seguidamente se descartó el sobrenadante y las mismas se resuspendieron en 10 ml de DMEM **completo** y se sembraron en una placa de 10 cm de diámetro.

### *3.3 Caracterización de hASCs por citometría de flujo*

Para la caracterización se empleó el *kit* de análisis de células madre mesenquimales humanas (hMSC) de la empresa Becton, Dickinson & Company (*BD-Biosciences*, N° de catálogo 562245). Dicho *kit* incluye una mezcla de 3 anticuerpos (conjugados con diferentes fluoróforos) que reconocen marcadores de superficie positivos para hMSCs: FITC-CD90,

PerCP-Cy™ 5.5-CD105 y APC-CD73 (*coktail* positivo), y una mezcla de 5 anticuerpos con un único fluoróforo (PE) que reconocen marcadores de superficie negativos para hMSCs: CD45, CD34, CD11b, CD19 y HLA-DR (*coktail* negativo). Para los controles de compensación se emplearon: FITC-CD90, PE-CD44, PerCP-Cy™ 5.5-CD105 y APC-CD73. Además el *kit* incluye los correspondientes controles de isotipo. El control de isotipo es un anticuerpo primario de la misma clase que el anticuerpo utilizado para la detección, conjugado al mismo fluoróforo, pero que no tiene capacidad de reconocer el antígeno. Este control sirve como un control negativo, para discriminar todo lo que corresponda a la unión inespecífica del anticuerpo.

Células hASCs crecidas a 100 % de confluencia en una placa de 10 cm de diámetro en condiciones estándar fueron lavadas con *buffer* PBS y levantadas mediante adición de 500 µl de Acutasa (mezcla de proteasas, *BD-Biosciences*) e incubación durante 10 s a 37 °C. Luego se adicionaron 3 ml de DMEM **completo** para neutralizar las enzimas. Las células se colocaron en un tubo cónico de 15 ml y se centrifugaron a 200 x g durante 5 min, se descartó el sobrenadante y el *pellet* celular fue resuspendido en 600 µl de una solución de suero de ternera 1 % v/v en PBS (solución de lavado y marcado, SLM). Posteriormente las células se contaron en cámara de Neubauer, se colocaron un total de 50.000 células/ tubo de 1,5 ml (7 tubos fueron preparados en total) y se adicionaron los anticuerpos correspondientes (entre 0,5 y 2 µl por tubo con células). Seguidamente se incubó en oscuridad en hielo por 30 min, se adicionaron 200 µl de SLM, y se centrifugó a 200 x g durante 5 min. Luego de un segundo lavado el *pellet* celular se resuspendió en 150 µl de PBS. Cada muestra fue analizada utilizando el citómetro Accuri™ C6 de *BD-Biosciences* y el software FlowJo versión 7.6. Se consideró una población de hASCs pura cuando los marcadores mencionados se hallaron presentes en un porcentaje de células que superó el 95 % (marcadores positivos hMSCs) y fue inferior al 2 % (marcadores negativos)

### 3.4 Diferenciación adipogénica

#### *Optimización del protocolo de diferenciación.*

Preadipocitos de ratón 3T3-L1 fueron crecidos hasta alcanzar un 80 % de confluencia sobre cubreobjetos circulares de 12 mm de diámetro colocados en placa de 24 pocillos. La inducción a diferenciación adipogénica se inició mediante el agregado de medio DMEM **completo** suplementado con dexametasona 100 nM (*Sigma-Aldrich*), IBMX 0,5 mM (*Sigma-Aldrich*), en ausencia o presencia de indometacina 100  $\mu$ M (*Sigma-Aldrich*) e insulina bovina 5  $\mu$ g/ml o 10  $\mu$ g/ml (Betasint U-100, Laboratorios Beta) durante 2 días. Luego se cambió a medio DMEM **completo** con insulina bovina 5  $\mu$ g/ml o 10  $\mu$ g/ml respectivamente, removiéndolo cada 2 días, hasta el décimo día. El ensayo se finalizó mediante fijación y tinción de las células (ver sección “Tinción con *Oil red O*”). Las células no tratadas fueron cultivadas con DMEM **completo** hasta el final del experimento.

En otro ensayo dichas células fueron inducidas a diferenciación con medio DMEM **completo** suplementado con dexametasona 250 nM, IBMX 0,5 mM, en ausencia y presencia de rosiglitazona 2 y 4  $\mu$ M (Laboratorios Beta) e insulina bovina 1 o 10  $\mu$ g/ml por el período de 3 días, seguido de 2 días con medio DMEM **completo** con insulina bovina 1 o 10  $\mu$ g/ml respectivamente y luego medio DMEM **completo** hasta el final del experimento. Los días de diferenciación evaluados para este ensayo (mediante fijación y posterior tinción) fueron 5, 9, 15 y 20 días. Las células no tratadas se cultivaron con este último medio en todo momento.

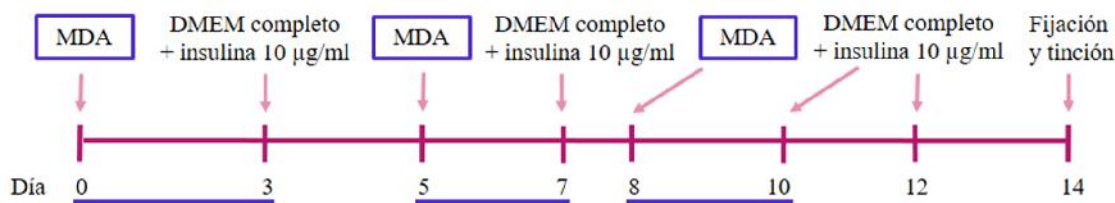
Teniendo en cuenta los resultados de los primeros ensayos, los experimentos posteriores se llevaron a cabo por un período de 7 días induciendo la diferenciación con medio DMEM **completo**, dexametasona 250 nM, IBMX 0,5 mM, rosiglitazona 2  $\mu$ M e insulina bovina 10  $\mu$ g/ml durante 3 días, seguido de 2 días con medio DMEM **completo** con 10  $\mu$ g/ml de insulina y finalmente 2 días con medio DMEM **completo** sin drogas. Las células no tratadas

fueron crecidas por 3 días en medio DMEM sin SFB y el resto de los días, con medio DMEM suplementado con SFB 2,5 % v/v.

Teniendo un protocolo eficiente y reproducible en células 3T3-L1, se prosiguió a evaluarlo en la diferenciación adipogénica de las células madre derivadas de tejido adiposo humano.

Las células hASCs fueron crecidas hasta alcanzar un 80 % de confluencia sobre cubreobjetos circulares de 12 mm de diámetro colocados en placa de 24 pocillos, utilizando DMEM suplementado con la mezcla de drogas citada en el último ensayo de diferenciación de 3T3-L1, de aquí en adelante llamada MDA (Medio de Diferenciación Adipogénica). Se ensayaron distintos tiempos de incubación de las células con este medio: por un período de 3 días se agregó medio MDA a cada pocillo; los siguientes 2 días las células se mantuvieron con medio DMEM **completo** con insulina 10 µg/ml; y los días restantes con: i) DMEM **completo**, ii) DMEM **completo** con insulina 10 µg/ml o iii) DMEM **completo** con insulina 10 µg/ml por el período de 2 días y luego una serie de ciclos de inducción, en los cuales los 2 días siguientes se cultivaron las células con medio MDA, luego se cambió el medio por DMEM **completo** con insulina 10 µg/ml por 1 día y los 2 últimos días nuevamente con las drogas (Ver **Figura 11**). Los distintos protocolos se finalizaron a días 7, 10 y 14. Para el control (células sin diferenciar) se probaron tres concentraciones diferentes de SFB: 2,5; 5 y 10 % v/v, que suplementaron el medio DMEM durante todos los días de dichos ensayos.

Los experimentos finales (para evaluar los niveles de los parálogos de 14-3-3) se realizaron con el protocolo que incluye ciclos de inducción, agregando MDA a células creciendo en placas de 10 cm de diámetro a 80 % de confluencia, y se finalizaron a día 10. Las células no tratadas fueron cultivadas en medio DMEM con SFB 5 % v/v.



**Figura 11.** Línea de tiempo representando el protocolo de diferenciación con ciclos de inducción. El medio MDA contiene DMEM **completo** suplementado con dexametasona 250 nM, IBMX 0,5 mM, rosiglitazona 2 µM e insulina bovina 10 µg/ml.

### 3.5 Tinción con *Oil red O*

Las células 3T3-L1 y hASCs diferenciadas y las no tratadas fueron teñidas con *Oil red O* (ORO). Este colorante tiñe específicamente los lípidos neutros contenidos en las vacuolas lipídicas. En los días establecidos para la fijación y tinción, las células adheridas a cubreobjetos circulares de 12 mm de diámetro fueron lavadas con PBS conteniendo CaCl<sub>2</sub> 1 mM y MgCl<sub>2</sub> 1 mM y luego fijadas por 20 min con solución de paraformaldehído (PAF) 4 % (PAF 1,33 M, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 30 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 50 mM). Una solución *stock* de ORO 0,35 % p/v en isopropanol preparada 24 horas antes fue filtrada primero por una membrana de nitrocelulosa de 0,45 µm, luego por una membrana de 0,22 µm y luego almacenada a temperatura ambiente. Al momento de cada tinción esta solución fue diluída en agua Milli-Q (en una relación 6 partes de solución *stock*: 4 partes de agua Milli-Q), filtrada por membrana

de nitrocelulosa 0,22  $\mu\text{m}$ , y adicionada a las células fijadas por un tiempo de 2 h a temperatura ambiente con agitación suave. Al cabo de este tiempo se lavó exhaustivamente con agua y los cubreobjetos se montaron en portaobjetos con Mowiol 4-88 (Sigma Aldrich) para su análisis por microscopía óptica.

En paralelo, para cuantificar la acumulación de lípidos en las células 3T3-L1 (proporcional a la tinción con ORO), se llevó a cabo la decoloración y medida espectrofotométrica de ORO de acuerdo a Ramírez-Zacarías y colaboradores (Ramírez-Zacarías *et al.*, 1992). Brevemente, el exceso de agua luego de los lavados se dejó evaporar por completo colocando las células teñidas con dicho colorante a 32 °C. A continuación se adicionaron 150  $\mu\text{l}$  de isopropanol a cada pocillo de una placa de 24 pocillos conteniendo las células teñidas para extraer todo el colorante. Este volumen se retiró al cabo de 10 min de incubación y su absorbancia se midió a 510 nm.

### *3.6 Aislamiento de ARN, síntesis de ADNc y PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR)*

El ARN total fue purificado a partir de células 3T3-L1 diferenciadas y no tratadas utilizando 1 ml de *TRIzol® Reagent (Thermo Fisher Scientific)*, a partir de una placa de 10 cm de diámetro conteniendo células a 100 % de confluencia. Una vez recolectadas, las muestras fueron incubadas 5 min a temperatura ambiente para producir la disociación completa de los complejos nucleoproteicos, y se les adicionaron 200  $\mu\text{l}$  de cloroformo. Los tubos fueron agitados vigorosamente por 15 s y se incubaron 3 min a temperatura ambiente para luego centrifugar a 12.000 x g durante 15 min a 4 °C. Se aisló la fase acuosa de cada tubo, se le agregaron 500  $\mu\text{l}$  de isopropanol y se incubó 10 min a temperatura ambiente, tras lo cual se centrifugó por 10 min a 12.000 x g a 4 °C para obtener un *pellet* conteniendo el ARN



precipitado. Luego de la centrifugación se descartó el sobrenadante y el *pellet* fue lavado con 1 ml de etanol 75 %, se centrifugó nuevamente a 7.500 x g durante 5 min a 4 °C, se retiró el sobrenadante y el ARN precipitado se secó al aire durante 10 min. Luego, se adicionaron 50 µl de H<sub>2</sub>O ultrapura (*Life Technologies*) libre de ARNasas, y se incubó por 10 min a 55-60 °C para una completa disolución del ARN.

La integridad del ARN fue verificada por electroforesis en gel de agarosa 1,1 % p/v en *buffer* TAE (Tris 40 mM, acetato 20 mM y EDTA 1 mM), adicionando GelRed (Biotium) para visualizar por fluorescencia el ARN. Se sembró 1 µg de muestra de ARN previo calentamiento de la misma a 70 °C con el fin de desnaturalizar el ARN, minimizando la formación de estructuras secundarias. Se utilizó un gel de agarosa 1,10 % p/v ya que el mismo permite la visualización de dos bandas discretas correspondientes al ARNr 28S y 18S, teniendo la primera una intensidad aproximada del doble que la segunda (Relación 2:1 - 28S:18S-) en el caso que la muestra analizada esté íntegra; la ausencia de dichas bandas o una relación muy inferior a 2 indica degradación. Confirmada la integridad se llevó a cabo la síntesis de ADNc, realizando primero un tratamiento de la muestra con DNAsa I, a fin de eliminar el ADN genómico que pudiera haber quedado remanente luego de la extracción. Para ello 1 µg de ARN se incubó con 1 U de DNAsa I y 1 µl del *buffer* correspondiente a la enzima (*Thermo Fisher Scientific*). Se incubó 30 min a 37 °C y luego a 65 °C por 10 min con el agregado de EDTA 4,5 mM, para asegurar la inactivación de la DNAsa I. Posteriormente se llevó a cabo la reacción de retrotranscripción, para la cual se adicionaron al tubo tratado con DNAsa I, hexaoligonucleótidos al azar 0,03 µg/µl (Qiagen) y H<sub>2</sub>O ultrapura (cantidad necesaria para un volumen final de 15 µl). La mezcla se desnaturalizó a 70 °C durante 5 min y se enfrió rápidamente en hielo, para minimizar la formación de estructuras secundarias en el ARN que impidan su retrotranscripción. Seguidamente se agregaron los demás componentes para llevar a cabo la retrotranscripción: 200 U de la enzima transcriptasa

reversa derivada del virus de la leucemia murina de Moloney (*Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase*, M-MLV-RT -Promega-), 5  $\mu$ l de *buffer* de reacción de la enzima y dNTPs 0,60 mM en un volumen final de 25  $\mu$ l. La reacción se realizó a 37 °C durante 60 min. El ADNc obtenido fue guardado a -20 °C hasta su utilización.

Las reacciones de qPCR se llevaron a cabo empleando 3 muestras biológicas y 3 réplicas técnicas. Cada tubo de reacción contenía 1  $\mu$ l de una dilución 1:3 de la muestra de ADNc, *primers forward* y *reverse* 0,35  $\mu$ M (c/u), 9  $\mu$ l de *SYBER Green Mastermix* (Roche) y H<sub>2</sub>O ultrapura en cantidad necesaria para un volumen final de 20  $\mu$ l. Se utilizó un equipo *Rotorgene 6000* (Corbett Life Science) con el siguiente programa: 1 paso de 10 min a 95°C, y 35 ciclos que incluyen 1 paso de 15 s a 95 °C (desnaturalización) y 2 pasos de 1 min ambos a 60 °C (hibridación y elongación). Los *primers* usados fueron diseñados de manera altamente específica para cada parálogo de 14-3-3, teniendo en cuenta que por sus secuencias hibridan en exones a ambos lados de un intron (*intron spanning*). Esto nos permitió asegurar que todo amplicón resultante tuvo como molde ADNc y no ADN genómico contaminante que pudiera haber quedado remanente luego de la purificación y el tratamiento con DNAsa I. Asimismo, en el diseño de los *primers* se tuvo en cuenta que el tamaño de los amplicones fuera lo más uniforme posible para que todas los parálogos fuesen detectados bajo las mismas condiciones de qPCR. Como gen normalizador se empleó *Peptidylprolyl isomerase A* (*PPIA*) de acuerdo a información publicada previamente (Fink *et al.*, 2008), y como gen marcador de diferenciación adipogénica *fatty acid binding protein 4* (*FABP4*) (Hong *et al.*, 2005). Las secuencias de todos los *primers* utilizados se muestran en la **Tabla 1**. Para cada gen se realizaron diluciones seriadas del ADNc (tanto de células diferenciadas como control) con el fin de calcular la eficiencia de la reacción en cada caso. La eficiencia (E) de cada gen se calculó a partir de la gráfica lineal de los valores umbrales de ciclo (Ct, acrónimo inglés de *threshold cycle*) en función de la concentración de ADNc, de la cual se extrajo el valor de la

pendiente, y se empleó en el cálculo de acuerdo a la ecuación  $E = 10^{[-1/\text{pendiente}]}$ . La relación de expresión relativa (R) de un gen blanco se calculó en base a la E y la desviación del Ct de una muestra desconocida frente a un control, y se expresó en comparación con un gen de referencia. Nuestros resultados fueron analizados de acuerdo al modelo matemático planteado por Pfaffl (Pfaffl, 2001).

Genes / Proteínas	Secuencia
YWHAB / 14-3-3	F= 5'-AGGCAGAACTGCAGGACATC-3'
	R= 5'-ATGCCACTTCAGAAAGATACC-3'
YWHAE / 14-3-3	F= 5'-TCTGGTGTACCAGGCGAAG-3'
	R= 5'-CCATCCCTGCTACTTTCTTC-3'
YWHAH / 14-3-3	F= 5'-CTATGAAGGCGGTGACAGAG-3'
	R= 5'-GCCTGGCACCAACCACATT-3'
YWHAG / 14-3-3	F= 5'-GCGAGCAACTGGTGCAGAAA-3'
	R= 5'-CGACAGTGGCTCATTTCAGCT-3'
SFN / 14-3-3	F= 5'-ATCAGCAAGAAGGAGATGCC-3'
	R= 5'-TGGCGATCTCGTAGTGGAAG-3'
YWHAQ / 14-3-3	F= 5'-CCTCATCATGCAGTTGCTTAG-3'
	R= 5'-TAGTTTTTCAGCCCCTTCTGC-3'
YWHAZ / 14-3-3	F= 5'-GGCCCTTAACTTCTCTGTG-3'
	R= 5'-TCAAGTTCAGCAATGGCTTC-3'
FABP4/ aP2	F= 5'-GTGGGAACCTGGAAGCTTGTC-3'
	R= 5'-CTTCACCTTCCTGTCGTCTGC-3'
Gen Normalizador	
PPIA	F= 5'-TCCTGGCATCTTGTCATG-3'
	R= 5'-CACCACATGCTTGCCATCC-3'

**Tabla 1.** Secuencias de los *primers forward* (F) y *reverse* (R) utilizados en las reacciones de qPCR (sintetizados por la empresa Eurofins MWG operon).

### 3.7 Lisados celulares totales y análisis por Western Blot (WB)

Los lisados totales de células 3T3-L1 y hASCs diferenciadas y no tratadas se realizaron empleando *buffer* RIPA (Tris-HCl 50 mM, pH 7,50; NaCl 150 mM; NP-40 1 % v/v; deoxicolato de Na<sup>+</sup> 0,50 % p/v y SDS 0,10 % p/v -3T3-L1- o 1 % p/v -hASCs-) a partir de una placa de 10 cm de diámetro con células crecidas a 100 % de confluencia. Las células fueron recolectadas mediante la utilización de un *scraper* y centrifugadas a 200 x g. El *pellet* celular se resuspendió en *buffer* RIPA conteniendo fluoruro de fenilmetilsulfonilo 0,10 mM (PMSF) y ortovanadato de Na<sup>+</sup> 1 mM. Se incubó en hielo por 30 min con agitación en vortex cada 10 min, y se sonicó durante 1 min con pulsos 15 s *ON* / 10 s *OFF*, para romper el ADN genómico y otros restos celulares. Se centrifugó a 13.000 x g, 10 min, a 4 °C. Se recuperó el sobrenadante y se preservó a -20 °C hasta su utilización.

A diferencia de los lisados de 3T3-L1, los cuales fueron utilizados sin ningún tratamiento posterior, los lisados de hASCs debieron ser precipitados para eliminar la interferencia ocasionada por el tipo y la cantidad de lípidos que contienen (Kessler y Fanestil, 1986). Dicha precipitación se realizó agregando ácido tricloroacético 5 % p/v e incubando 30 min a 4 °C. Se centrifugó a 15.000 x g durante 10 min, eliminando el sobrenadante sin dejar absolutamente nada del mismo. Luego se realizaron dos lavados del *pellet* con éter etílico-etanol, en proporción 3:1, con centrifugaciones intermedias de 2 min cada una a máxima velocidad. El *pellet* se dejó secar por completo y luego se resuspendió en *buffer* RIPA conteniendo NaOH 90 mM.

#### 3.7.1 Medida de concentración de proteínas

La medida de concentración de proteínas totales se realizó utilizando el kit *Pierce*<sup>TM</sup> *BCA Protein Assay Kit* (*Thermo Fisher Scientific*), basado en el método del ácido bicinconínico

(BCA) para la detección y cuantificación colorimétrica de proteínas. Este método combina la reducción de  $\text{Cu}^{+2}$  en forma de  $\text{CuSO}_4$  a  $\text{Cu}^{+1}$  ante la presencia de proteínas en medio alcalino (reacción de Biuret) con la detección altamente sensible y selectiva del catión  $\text{Cu}^{+1}$ . La cantidad de ion cúprico reducido es proporcional a la cantidad de proteínas presentes en la solución. El producto de reacción de color púrpura de este ensayo se debe al secuestro de un ión cuproso por dos moléculas de BCA, exhibiendo este complejo un máximo de absorbancia a 562 nm. El ensayo es lineal en un rango de concentración de proteínas entre 20-2000  $\mu\text{g/ml}$  (Smith *et al.*, 1985).

Se preparó la solución de trabajo mezclando el reactivo de BCA con una solución de  $\text{CuSO}_4$  4 % en proporción 50:1 y se adicionaron 200  $\mu\text{l}$  de la misma a pocillos de una placa de 96 pocillos conteniendo las muestras proteicas a determinar y muestras del estándar, albúmina sérica bovina (BSA, del inglés *Bovine Serum Albumin*) de concentración conocida, en diluciones seriadas de concentraciones comprendidas entre 0 y 1 mg/ml. Se incubó a 37 °C durante 30 min y se leyó la absorbancia en un lector de placas *Multiskan FC, Thermo Fisher Scientific*. Con los valores obtenidos para las distintas diluciones del estándar se confeccionó una curva de calibración a la cual se le realizó una regresión lineal, obteniéndose así los valores de la ordenada al origen y la pendiente. Con dichos valores se pudo proceder al cálculo de la concentración para las respectivas muestras de lisados celulares totales empleándose un volumen tal de muestra que no excediera los límites de linealidad de la curva.

### 3.7.2 Electroforesis en geles desnaturalizantes de poliacrilamida

Los extractos proteicos correspondientes a las células 3T3-L1 se analizaron por electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS, es decir en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE).

Los geles fueron preparados entre placas de vidrio utilizando el sistema de electroforesis *Cleaver Scientific*. El gel separador se preparó con una solución de acrilamida 12 % p/v, bisacrilamida 0,30 % p/v en Tris-HCl 0,38 M pH 8,80 conteniendo SDS 0,10 % p/v, glicerol 13,40 % v/v, tetrametiletilenediamina (TEMED) 0,04 % v/v y persulfato de amonio (APS) 0,05 % p/v. El gel concentrador fue preparado a concentraciones finales de acrilamida 7,40 % p/v, bisacrilamida 0,20 % p/v en Tris-HCl 0,13 M pH 6,80, SDS 0,10 % p/v, TEMED 0,10 % v/v y APS 0,10 % p/v. Las muestras a sembrar en los geles fueron preparadas en solución de siembra conteniendo Tris-HCl 0,20 M pH 6,80, SDS 2 % p/v, glicerol 10 % v/v, -mercaptoetanol 5 % v/v y azul de bromofenol 0,10 % p/v, e incubadas a 100 °C por 4 min para su completa desnaturalización. La electroforesis fue llevada a cabo a 4 °C en solución *buffer* Tris-HCl 25 mM pH 8,30, glicina 192 mM y SDS 0,10 % p/v aplicando un voltaje constante de 120 V.

Los extractos proteicos correspondientes a las células hASCs se analizaron por electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (NuPAGE Bis-Tris) utilizando el mismo sistema de electroforesis. El gel separador se preparó con una solución de acrilamida 12 % p/v, bisacrilamida 0,30 % p/v en bis-Tris-HCl 1,25 M pH 6,50 conteniendo TEMED 0,04 % v/v y APS 0,05 % p/v. El gel concentrador fue preparado a concentraciones finales de acrilamida 7,40 % p/v, bisacrilamida 0,20 % p/v en bis-Tris-HCl 1 M pH 6,50, TEMED 0,10 % v/v y APS 0,10 % p/v. Las muestras a sembrar en los geles fueron preparadas en la solución de siembra detallada más arriba y calentadas de igual manera que antes. La electroforesis fue llevada a cabo a 4 °C en solución *buffer* MOPS-Tris 50 mM, EDTA 1 mM y SDS 0,1 % p/v aplicando un voltaje constante de 120 V.

### 3.7.3 Electrotransferencia de proteínas y detección por el método de WB

Una vez finalizada la electroforesis, los extractos proteicos fueron inmediatamente electrotransferidos a una membrana de nitrocelulosa en solución *buffer* conteniendo Tris-HCl 25 mM pH 8,30, glicina 192 mM, SDS 0,10 % p/v y metanol 20 % v/v, a 10 V constantes durante toda una noche. Una vez finalizada la electrotransferencia la membrana se dejó secar por 10 min a temperatura ambiente. La visualización de las proteínas transferidas a la membrana se llevó a cabo sumergiendo la misma en una solución de *Ponceau S* (*Ponceau S* 2 % p/v en ácido tricloroacético 30 % p/v y ácido sulfosalicílico 30 % p/v) durante 10 min. Se removió el colorante no unido a las proteínas con H<sub>2</sub>O bidestilada (lavado) y aquel unido a ellas con PBS (decoloración). Para los WB se realizó el bloqueo con leche descremada 5 % p/v disuelta en PBS y se incubó con el anticuerpo primario en la dilución correspondiente (ver **Tabla 2**) en la misma solución de bloqueo por 1 h a temperatura ambiente. Se realizaron 3 lavados con PBS-Tween 0,01 % v/v (PBSTw) de 5 min cada uno, se incubó el anticuerpo secundario conjugado a la enzima peroxidasa (*Horseradish peroxidase*, HRP) en leche 5 % p/v disuelta en PBSTw por 1 h a temperatura ambiente. Se hicieron 3 lavados con PBSTw y 1 con PBS de 5 min cada uno. La detección de proteínas reconocidas por los anticuerpos se realizó por quimioluminiscencia utilizando el kit *Pierce™ ECL Western Blotting Substrate* de *Thermo Fisher Scientific*. Dicho *kit* está compuesto por dos reactivos: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y luminol (sustrato para la enzima peroxidasa), los cuales se mezclaron en proporción 1:1 y fueron adicionados a la membrana de nitrocelulosa. Se incubó durante 1 min, se retiró el excedente y se realizó la detección utilizando el equipo *ImageQuant LAS-4000 Chemiluminescence & Fluorescence Imaging System* de *Fujitsu Life Sciences*. Los datos fueron analizados empleando el programa ImageJ, mediante el cual se determinó la intensidad de píxeles para cada banda del WB. Estos valores fueron analizados estadísticamente utilizando la prueba de suma de rangos de Wilcoxon.

Para detectar las proteínas 14-3-3 se emplearon anticuerpos específicos que reconocen la región divergente amino-terminal de cada uno de los parálogos de mamífero (Martin *et al.*, 1994), los cuales fueron amablemente cedidos por el Dr. A. Aitken (Universidad de Edimburgo, Escocia, Reino Unido). Como controles de carga se utilizaron anticuerpos monoclonales que reconocen  $\alpha$ -tubulina y  $\alpha$ -actina en las diluciones explicitadas en la **Tabla 2**.

Anticuerpos Primarios	Dilución	Origen y número de catálogo
anti-14-3-3	1:1000	Cedidos por Dr.Aitken
anti-14-3-3	1:750	
anti-14-3-3	1:3000	
anti-14-3-3	1:5000	
anti-14-3-3	1:100	<i>Santa Cruz Biotechnology, sc1019</i>
anti-14-3-3	1:100	<i>Santa Cruz Biotechnology, sc732</i>
anti- $\alpha$ -tubulina	1:300	<i>Sigma Aldrich, 9026</i>
anti- $\alpha$ -actina	1:4000	<i>Sigma Aldrich, A5316</i>
<b>Anticuerpos secundarios</b>		
anti-IgG de ratón	1:2000	<i>Vector Laboratories, PI200</i>
anti-IgG de conejo	1:5000	<i>Promega, W4011</i>

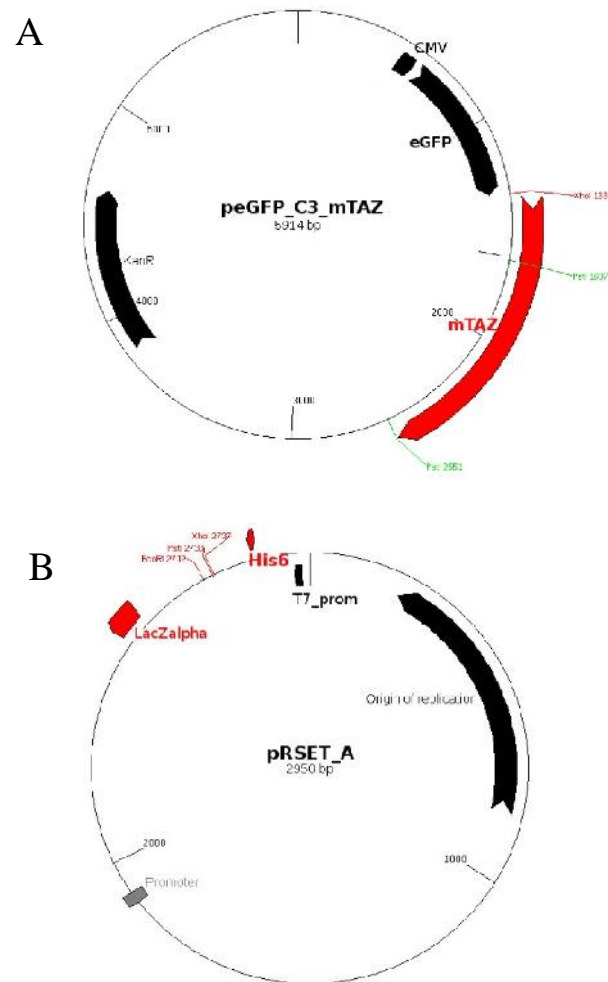
**Tabla 2.** Anticuerpos primarios y secundarios empleados en los ensayos de WB, con las respectivas diluciones utilizadas, origen y número de catálogo.

### 3.8 Producción de anticuerpo policlonal contra la proteína TAZ

En primer lugar se procedió al sub-clonado de un fragmento de la región amino-terminal de TAZ de ratón, de 98 aminoácidos, en el vector de expresión *pRSET-A* corriente abajo de una etiqueta de histidina (His x 6). Para ello, se digirió el plásmido *peGFP-mTAZ*, en el cual el gen de TAZ de ratón se halla río abajo del gen GFP y el promotor constitutivo CMV, con las



enzimas de restricción *XhoI* y *PstI*, liberándose un inserto de 298 pb (**Figura 12A**). El mismo posteriormente se subclonó en el vector de expresión *pRSET-A* digerido con las mismas enzimas (**Figura 12B**). Ambas digestiones se llevaron a cabo incubando el sustrato (500 ng) a 37 °C por 3 h con 5 U de cada enzima, 2 µl de *buffer* de reacción correspondiente y H<sub>2</sub>O ultrapura en cantidad necesaria para un volumen final de 20 µl. Luego de la digestión del plásmido aceptor, se prosiguió con la desfosforilación del mismo empleando 1 U de enzima fosfatasa alcalina (*Antartic Phosphatase, New England Biolabs*) y 6 µl de *buffer* de dicha enzima, incubándose 15 min a 37 °C. La digestión de ambos plásmidos se verificó por electroforesis en gel de agarosa 1 % p/v en *buffer* TBE (Tris-borato 45 mM y EDTA 1 mM), incluyendo el colorante para ADN *GelRed (Biotium)*. Por último, se llevó a cabo la reacción de ligación del amplicón con el vector destino en una relación 3:1 (según la ecuación que se muestra en la **Figura 13**). Se utilizaron 3 U de T4 DNA ligasa (*Promega*), 1 µl de *buffer* de reacción y H<sub>2</sub>O en cantidad necesaria para un volumen final de 10 µl, durante 2 días a 4 °C. Con la ligación se transformaron bacterias *OmniMAX2 (Thermo Fisher Scientific)*. Las colonias resultantes se seleccionaron mediante el uso de antibióticos y luego se procedió a la extracción del ADN plasmídico en pequeña escala (MINIPREP) utilizando el kit de purificación *QIAprep Spin Miniprep (Qiagen)*.



**Figura 12.** Mapas de los plásmidos empleados para el sub-clonado de la región N-terminal de TAZ. A) Mapa del plásmido donador *peGFP-mTAZ*. B) Mapa del plásmido aceptor *pRSET-*

A.

$$\frac{50 \text{ ng vector} \times \text{inserto (kb)}}{\text{vector (kb)}} \times \frac{3}{1} = \text{ng inserto}$$

**Figura 13.** Ecuación de ligación utilizada para calcular la masa de inserto a ligar con 50 ng de vector.

El ADN plasmídico de cada colonia fue analizado por digestión con enzimas de restricción, empleándose las enzimas *XhoI* y *EcoRI* y verificando por electroforesis en gel de agarosa la presencia de un fragmento de 323 pb. Finalmente se corroboró por secuenciación.

Para la expresión, se procedió a transformar bacterias *BL21(DE3)pLysS* con el vector resultante. Dicho ensayo se llevó a cabo en condiciones estándar: se tomaron muestras pre- y post-inducción con IPTG 1 mM para confeccionar una curva y evaluar los niveles de expresión a distintos tiempos, analizándose la misma mediante SDS-PAGE. La purificación del péptido se realizó por columna de  $\text{Co}^{+2}$  en condiciones desnaturalizantes. Realizada la inducción, el *pellet* celular fue resuspendido en *buffer* de lisis (Tris-HCl 50 mM, pH 8, NaCl 500 mM, glicerol 5 %, urea 6 M) y luego se sonicó durante 1 min con pulsos 15 s *ON* / 10 s *OFF*. Seguidamente se llevó a cabo el clarificado centrifugando a 12.000 x *g* durante 15 min. El sobrenadante recolectado fue colocado en la columna, previo equilibrado de la misma con el *buffer* de lisis. Se realizaron lavados de la columna con *buffer* de lavado (Tris-HCl 50 mM, pH 8, NaCl 500 mM, urea 6 M) sin imidazol ya que incluso una mínima cantidad provocaba la elución del péptido. Finalmente, tras los lavados, se procedió a la elución del péptido para lo cual se adicionó a la columna *buffer* de elución (Tris-HCl 50 mM, pH 8, NaCl 500 mM, urea 6 M, imidazol 250 mM). El eluato obtenido fue analizado por SDS-PAGE. Paso siguiente se dializó antes de la inmunización del conejo.

Se inmunizó 3 veces un conejo de aproximadamente 45 días, con diferencia de 14 días entre inyecciones, siendo las mismas por vía subcutánea. Previamente a inyectar el péptido se le extrajo sangre al conejo para separar el suero preinmune. El suero obtenido por punción cardíaca, al final de la producción, se verificó mediante WB con dos cantidades diferentes de péptido puro. El suero además se evaluó por su capacidad de reconocer TAZ endógena en células 3T3-L1, HEK293T y hASCs (por WB los dos primeros tipos celulares y por IFI el último), como así también TAZ recombinante. En este último caso se verificó mediante WB de un extracto proteico de células HEK293T transfectadas con el plásmido *peGFP-mTAZ*. Para todos estos ensayos se utilizó como control el suero preinmune.

### *3.9 Inmunofluorescencia Indirecta (IFI)*

Células crecidas en condiciones estándar en cubreobjetos circulares de 12 mm de diámetro colocados en placa de 24 pocillos, fueron fijadas con paraformaldehído 4 % p/v durante 20 min, luego de lavar con PBS conteniendo  $\text{CaCl}_2$  1 mM y  $\text{MgCl}_2$  1 mM.

Dependiendo de la proteína a detectar por esta técnica se siguieron diferentes protocolos de permeabilización, bloqueo, incubación con anticuerpos y lavados.

#### *3.9.1 IFI del co-regulador transcripcional "TAZ"*

Las células hASCs y 3T3-L1 fueron crecidas a baja confluencia (aproximadamente 20 a 30 %), dado que TAZ es degradada a alta confluencia celular (Dupont *et al.*, 2011), siguiendo el protocolo desarrollado por el Dr. Piccolo (Universidad de Padua, Padua, IT). Una vez fijadas las células, las mismas se permeabilizaron por el agregado de una solución Tritón X-100 0,30 % v/v en *buffer* PBS por 10 min a temperatura ambiente. Seguidamente se procedió a realizar

el bloqueo luego de haber lavado con *buffer* PBS por tres veces. La solución de bloqueo fue BSA 10 % p/v, Tritón X-100 0,10 % v/v en PBS (PBST) por 1 h 30 min a temperatura ambiente. Se hicieron tres lavados con PBST y se incubó una noche a 4 °C ya sea con el anticuerpo primario producido en esta tesis en una dilución 1:10 o con el anticuerpo monoclonal anti-TAZ (número de catálogo 560235, *BD Biosciences*) en una dilución 1:200. Nuevamente se realizaron lavados con PBST (4 lavados de 1, 2, 3 y 6 min) y se llevó a cabo la incubación con el anticuerpo secundario en una dilución 1:200 (anticuerpo Alexa Fluor® 488 anti-IgG de ratón, número de catálogo A-21202, *Thermo Fisher Scientific*) a temperatura ambiente. Por último, se realizaron 4 lavados de 3 min cada uno con PBST antes de montar las células con medio de montaje con 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI, *Vector*) para marcar fluorescentemente el ADN de las células. Se realizaron los siguientes controles: i) control negativo, las células son incubadas únicamente con el anticuerpo secundario omitiéndose el agregado de anticuerpo primario (agregándose en su lugar BSA 3 % p/v) y ii) control de isotipo, incubando las células con IgG “normal” de ratón en lugar del anticuerpo primario.

### 3.9.2IFI de los parálogos de 14-3-3

La técnica de inmunofluorescencia para detectar los parálogos 14-3.3 y se realizó en células hASCs diferenciadas y no tratadas, luego de la tinción de las mismas con solución de ORO. La fijación y tinción se llevó a cabo como lo explicado en el apartado 3.5 de esta misma sección. La permeabilización se realizó utilizando una solución de saponina 0,05 %, BSA 0,2 %, en PBS (200 µl) durante 20 min a temperatura ambiente. Se lavó con PBS 3 veces y se bloqueó con 300 µl de una solución conteniendo SFB 3 % v/v y BSA 6 % p/v en PBS por 30 min. Se incubó con los anticuerpos primarios durante 1 h a temperatura ambiente en solución de BSA 3 % p/v. El anticuerpo anti-14-3-3 se usó en una dilución 1:100 y el

anticuerpo anti-14-3-3 en una dilución 1:200. Estos anticuerpos policlonales, cuya especificidad ha sido validada (Martin *et al.*, 1994), reconocen las regiones amino-terminales de cada parólogo, que son las regiones más variables dentro de esta familia de proteínas. Luego de 3 lavados con PBS, se incubó con el anticuerpo secundario (Alexa Fluor® 488 anti-IgG de conejo, número de catálogo A-11008, *Thermo Fisher Scientific*) por 1 h a temperatura ambiente. Por último se lavó con PBS igual que antes y se montaron las células con medio de montaje conteniendo DAPI. Para los respectivos controles, células hASCs diferenciadas y no tratadas fueron incubadas con IgG normal de conejo (número de catálogo I 1000, *Vector Laboratories*), en una dilución 1:400, en lugar del anticuerpo primario como control de isotipo, y con el anticuerpo secundario sólo como control negativo.

Las inmunofluorescencias para evaluar la eficacia del silenciamiento de los parálogos de 14-3-3 estudiadas, como así también el comportamiento del co-regulador TAZ ocasionado por dicho silenciamiento, fueron realizadas en células 3T3-L1 previamente infectadas con las partículas lentivirales (48 hs previas a la inmunomarcación). Se siguió el mismo protocolo descrito en los párrafos anteriores, pero empleando como anticuerpo secundario Alexa Fluor® 594 anti-IgG de conejo y Alexa Fluor® 594 anti-IgG de ratón (números de catálogos A-11012 y A-21203 respectivamente, *Thermo Fisher Scientific*). Este cambio en el fluoróforo se debió a que las células infectadas presentan fluorescencia verde debido a la expresión de *ZsGreen* dada la integración del genoma viral en el genoma de la célula.

Todos los preparados fueron visualizados en un microscopio de epifluorescencia Nikon Upright 80i y un microscopio confocal Olympus F11000 con objetivos de 40 y 60X. Las imágenes correspondientes a la detección de los parálogos 14-3.3 y , antes y durante la diferenciación adipogénica, fueron analizadas empleando el programa ImageJ, mediante el cual se determinó la intensidad de fluorescencia y área para cada célula presente en dicha imagen.

### 3.10 Silenciamiento de los parálogos de 14-3-3 a través de *shRNA*

La estrategia que utilizamos para el silenciamiento de los parálogos de 14-3-3 fue la expresión de ARN pequeños llamados *shRNAs* (del inglés *short hairpin RNAs*). Éstos inhiben la expresión genética de dichos parálogos dentro de la célula y se encuentran bajo el control del promotor del *small nuclear RNA (snRNA)* U6 para su expresión por la ARN polimerasa III (Paddison *et al.*, 2004). Para ello, se diseñaron en el laboratorio *shRNAs* específicos para cada uno de los parálogos sobre una región en la cual la identidad entre cada uno es menor o igual al 20 %. A las secuencias seleccionadas se les agregaron secuencias parciales del microRNA (miRNA) 30 (ver **Tabla 3**) (aumentando así la potencia de la inhibición). Dichas combinaciones de promotor U6 y *shRNAs* se subclonaron en el vector viral *pHAGE2-FulleF1 -ZsGreen-WPRE*, diseñado y cedido amablemente por el Dr. Gustavo Mostoslavsky (Universidad de Boston, Massachusetts, EUA), río abajo del gen marcador *ZsGreen*.

#### 3.10.1 Subclonado de los *shRNAs* en vectores virales

Los *shRNAs* para cada uno de los parálogos de 14-3-3 de ratón clonados en el vector *pENTR-U6-shRNA* fueron subclonados en el vector *pHAGE2-FulleF1 -ZsGreen-WPRE* con el fin de obtener el plásmido viral *pHAGE2-FulleF1 -ZsGreen-U6-shRNA14-3-3-WPRE*. Para ello primero se diseñaron oligonucleótidos que contienen una porción de secuencia específica que reconocen los primeros 17 pb del promotor U6 y una porción de secuencia que reconoce los últimos 19 pb de la secuencia en la cual están inmersos los *shRNAs* (secuencia parcial del microARN 30), común en todos ellos. Esto nos permitió independizarnos de tener un oligonucleótido específico para cada *shRNA* (*primer forward* y *reverse* respectivamente). Estos oligonucleótidos contienen los sitios de restricción para las enzimas *Bam*HI y *Bgl*II respectivamente (ver **Tabla 4**). Se realizaron reacciones de PCR para amplificar cada uno de

los *shRNAs*. Se utilizaron 100 ng de ADN molde pENTR-U6-shRNA, *primer forward* y *reverse* 0,10  $\mu$ M, 5  $\mu$ l de *buffer* de la enzima, dNTPs 0,20 mM, *Pfu* ADN polimerasa 2 U de *Thermo Fisher Scientific* y H<sub>2</sub>O ultrapura en cantidad necesaria para un volumen final de 50  $\mu$ l. Se utilizó el siguiente programa: 1 paso de 2 min a 95 °C, 30 ciclos con los siguientes pasos: 30 s a 95 °C, 30 s a 58 °C, 1 min a 72 °C y por último 1 paso de 10 min a 72 °C.

El resultado de la amplificación se verificó por medio de electroforesis en gel de agarosa 1 % p/v en *buffer* TBE, incluyendo el colorante para ADN *GelRed*. Para la purificación del amplicón se utilizó el kit de purificación de PCR *QIAquick (Qiagen)* de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Aquellas amplificaciones que resultaron en más de una banda detectable en el gel fueron aisladas directamente del gel, empleando el kit de extracción de gel *QIAquick (Qiagen)* según las instrucciones del fabricante.

A continuación se digirieron 5  $\mu$ g de plásmido *pHAGE2-FulleF1 -ZsGreen-WPRE* con la enzima *BamHI* y los amplicones con las enzimas *BamHI* y *BglIII*. El uso de *BglIII* permitió distinguir aquellas construcciones en las que el clonado resultó eficiente y distinguir cuáles de ellas contenía el inserto en la orientación deseada. El sitio de *BglIII* no se encuentra en el vector destino, pero los extremos cohesivos son compatibles con los generados por la digestión con *BamHI*. De acuerdo al sentido que hubiese ingresado el inserto se esperaban distintos tamaños de fragmentos al digerir con las enzimas *BamHI* y *KpnI* (**Figura 14**). Dichas digestiones se realizaron incubando el sustrato a 37 °C por 3 h con 10-20 U de enzima, 6  $\mu$ l de *buffer* de reacción de la enzima a emplear, BSA 0,10 mg/ml y H<sub>2</sub>O ultrapura en cantidad necesaria para un volumen final de 60  $\mu$ l.

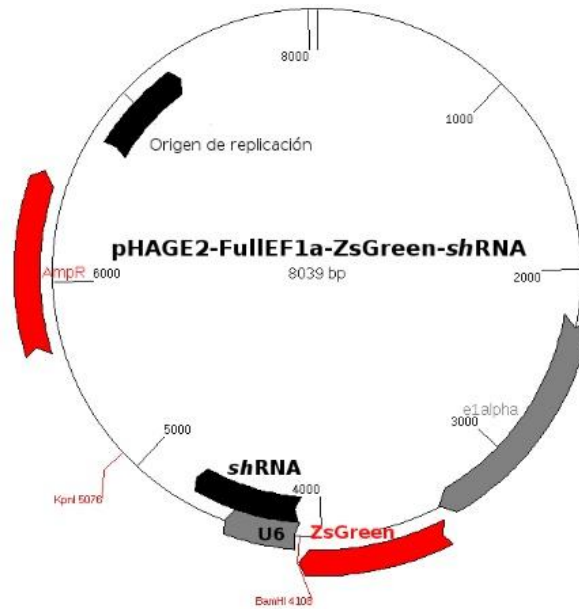


Parálogo	Secuencia de <i>shRNA</i>
14-3-3	5'-TGCTGTTGACAGTGAGCGCGGGCTGTGTCACCACAATAAATAGTGAAG CCACAGATGTATTTATTGTGGTGACACAGCCCATGCCTACTGCCTCGGA- 3'
14-3-3	5'-TGCTGTTGACAGTGAGCGCGGAATTAACATTAACCTTAAATAGTGAAG CCACAGATGTATTTAAGTTTAATGTTAATTCCATGCCTACTGCCTCGGA- 3'
14-3-3	5'-TGCTGTTGACAGTGAGCGCGCAAATCCAGGTGATGGTAATTAGTGAAGC CACAGATGTAATTACCATCACCTGGATTTGCTTGCCTACTGCCTCGGA- 3'
14-3-3	5'-TGCTGTTGACAGTGAGCGCTGCTACTACTGCAGTCTTTATTAGTGAAGCC ACAGATGTAATAAAGACTGCAGTAGTAGCATTGCCTACTGCCTCGGA- 3'
14-3-3	5'- TGCTGTTGACAGTGAGCGCGCCATGGACATCAGCAAGAATAGTGAAG CCACAGATGTATTCTTGCTGATGTCCATGGCCTTGCCTACTGCCTCGGA- 3'
14-3-3	5'-TGCTGTTGACAGTGAGCGCCCTGGAATTGTTGGATAAGTATAGTGAAGC CACAGATGTATACTTATCCAACAATTCCAGGATGCCTACTGCCTCGGA- 3'
14-3-3	5'-TGCTGTTGACAGTGAGCGCCCTGCTGTTTGTCTTTCATTATTAGTGAAGCC ACAGATGTAATAATGAAAGCAAACAGCAGGTTGCCTACTGCCTCGGA- 3'

**Tabla 3.** Secuencias (5'- 3') de los *shRNAs* utilizados para el silenciamiento de cada uno de los parálogos de 14-3-3.

<i>Primers</i>	Secuencia
<i>shRNA BamHI</i> (F)	5'-AAATAAGGATCCAGGTCCGGGCAGGAAGAG-3'
<i>shRNA BglIII</i> (R)	5'-GGTGCAGATCTAAAAAATCCGAGGCAGTAG-3'

**Tabla 4.** Secuencias de los *primers forward* (F) y *reverse* (R) utilizados para amplificar los *shRNAs* y sub-clonarlos en el vector viral (sintetizados por *Integrated DNA Technologies* – IDT).



**Figura 14.** Mapa de la construcción obtenida tras el sub-clonado de la secuencia del shRNA del parálogo 14-3-3 en el vector *pHAGE2-FulleF1a-ZsGreen-WPRE*.

Luego de la digestión del plásmido se prosiguió con la desfosforilación del mismo empleando 1 U de enzima fosfatasa alcalina (*Antartic Phosphatase, New England Biolabs*) y 6  $\mu$ l de *buffer* de dicha enzima, incubándose 15 min a 37 °C. La digestión se verificó por electroforesis en gel de agarosa 1 % p/v en *buffer* TBE y se purificó utilizando el kit de extracción de gel antes mencionado.

Por último, se llevó a cabo la reacción de ligación del amplicón con el vector destino en una relación 3:1 (según la ecuación que se muestra en la **Figura 13**, sección 3.8). Se utilizaron 3 U de ADN ligasa del fago T4 (*Promega*), 1  $\mu$ l de *buffer* de reacción y H<sub>2</sub>O en cantidad necesaria para un volumen final de 10  $\mu$ l, durante 2 días a 4 °C. Se transformaron con cada ligación bacterias *OmniMAX2*, se seleccionaron colonias correspondientes a cada sub-clonado mediante el uso de antibiótico y se procedió a la extracción del ADN plasmídico

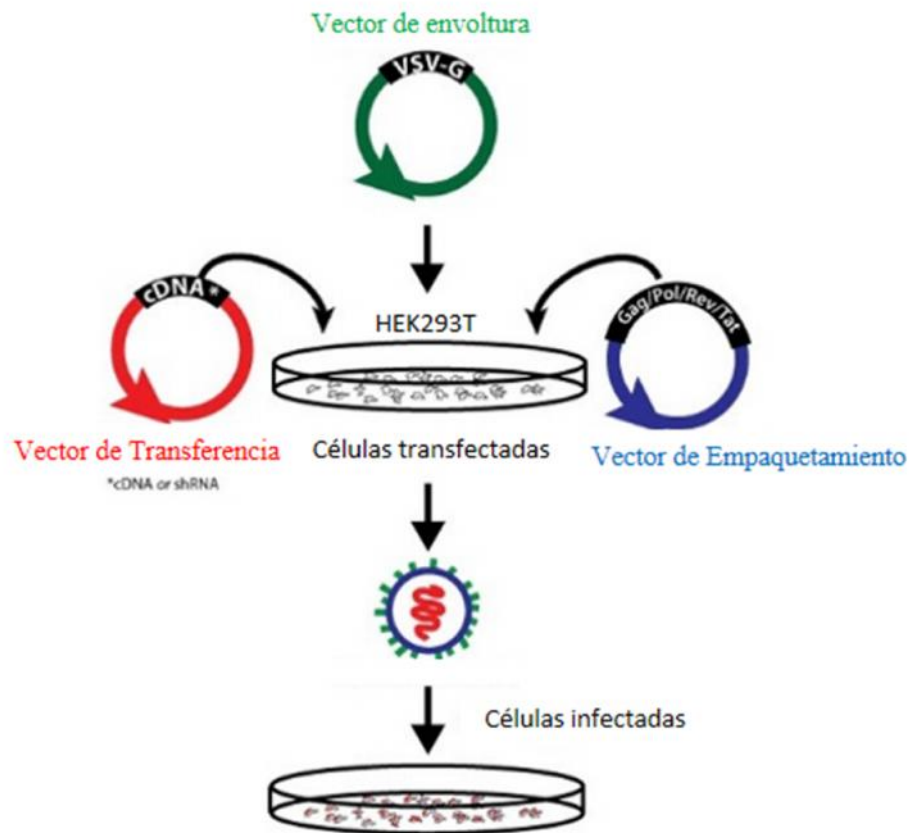
(MINIPREP) utilizando el kit de purificación *QIAprep Spin Miniprep (Qiagen)*. Cada clon fue analizado por restricción, para lo cual se emplearon las enzimas *BamHI* y *KpnI*. Si el subclonado había sido efectivo se esperaba la liberación de un fragmento de 966 pb, mientras que si el mismo no había sucedido, el fragmento resultante tenía un tamaño esperado de 598 pb. Realizada la digestión enzimática se visualizó el resultado por electroforesis en gel de agarosa como fue detallado más arriba. Como control negativo se sembró en el mismo gel el vector vacío digerido con las mismas enzimas.

### 3.10.2 Producción de lentivirus

La producción de las partículas lentivirales se llevó a cabo en células HEK293T, crecidas a un 80 % de confluencia en placas de 10 cm de diámetro en condiciones estándar, mediante un sistema de plásmidos lentivirales de 3<sup>o</sup> generación. Dichas células se transfectaron con los 5 plásmidos entre los cuales se encuentra dividido el genoma viral: 10 µg *pHAGE2-FulLEF1 - ZsGreen-U6-shRNA14-3-3-WPRE*, 0,50 µg *tat*, 0,50 µg *rev*, 0,50 µg *gag/pol* y 1 µg *vsv-g* (Dull *et al.*, 1998) (**Figura 15**). Para realizar dicha transfección se colocaron 700 µl de DMEM en un tubo *Eppendorf* de 1,5 ml y se adicionaron lentamente 38 µl del reactivo de transfección *TransIT®-293* de *Mirus Bio* (el volumen a usar corresponde a tres veces la masa de ADN empleada) agitando con un *vortex* a medida que se agrega el reactivo. Luego se incubó por 10 min a temperatura ambiente. Pasado dicho tiempo, se agregó la mezcla de ADN agitando de igual manera que antes y se dejó reposar por 15 min a temperatura ambiente. Por último se agregaron la mezcla de ADN y el reactivo de transfección a la placa que contenía 7,30 ml de DMEM **completo**. Luego de dos días y medio se realizaron 4 recolecciones separadas entre sí por un período de 10-15 h. En cada una de ellas se retiró el

sobrenadante (medio de cultivo conteniendo partículas virales) y se colocó nuevo medio a las células para la próxima recolección y así sucesivamente.

El sobrenadante recolectado se filtró por membrana de nitrocelulosa de 0,45  $\mu\text{m}$  y concentró por centrifugación a 49.000 x g por 1h 30 min a 4 °C. El sobrenadante posterior a la centrifugación fue descartado, dejando aproximadamente un volumen de 300  $\mu\text{l}$  junto al *pellet* en hielo por 2 h. Finalmente se resuspendió el mismo en dicho volumen y se prepararon alícuotas que fueron preservadas a -80 °C.



**Figura 15.** Esquema representativo de producción de lentivirus de tercera generación.

### 3.10.3 Infección de células 3T3-L1 con lentivirus

Células 3T3-L1 crecidas a un 90 % de confluencia sobre cubreobjetos circulares de 12 mm de diámetro colocados en placa de 24 pocillos en condiciones estándares fueron infectadas con las partículas lentivirales para cada uno de los *shRNAs* de los parálogos de 14-3-3. La infección se realizó en presencia de polibreno (*hexadimethrine bromide*) 5 µg/ml para favorecer el ingreso de las partículas virales a la célula aumentando la eficiencia de transducción. Se adicionaron a cada pocillo 250 µl de DMEM **completo** con polibreno y 8 µl de partículas virales previamente mezcladas con 250 µl de DMEM **completo**. Se centrifugó la placa a 730 x g por 1 h. Al cabo de 24 h se retiró el medio de transducción y las células fueron cultivadas en condiciones estándares durante 24 h más.

### 3.11 Producción de bacterias electrocompetentes y transformación

Para llevar a cabo los sub-clonados para la expresión del péptido de TAZ y los mencionados anteriormente se produjeron bacterias *OmniMAX2* (*Thermo Fisher Scientific*) y *BL21(DE3)pLysS* (*Promega*) electrocompetentes (ver genotipos en **Tabla 5**). Para dicho proceso se inocularon con anza 5 ml de medio LB (*Luria Broth*) con bacterias tomadas del *stock* preservado en glicerol 50 % v/v a -80 °C, en presencia del antibiótico tetraciclina 100 µg/ml, y se cultivó a 37 °C toda la noche. Al día siguiente este inóculo fue adicionado a un volumen de 500 ml de LB y se cultivó a 37 °C hasta llegar a una densidad óptica (D.O.) de 0,60, medida en espectrofotómetro a una longitud de onda = 600 nm. A partir de este momento se recolectó el cultivo y se centrifugó a 2.500 x g a 4 °C por 10 min resuspendiéndose el *pellet* resultante en 250 ml de H<sub>2</sub>O Milli-Q estéril fría para nuevamente centrifugar en iguales condiciones. Los pasos siguientes consistieron en resuspender el *pellet* celular en 100 y 50 ml de glicerol 10 % v/v con una centrifugación luego de cada agregado

como las realizadas anteriormente. Por último se empleó 1 ml de glicerol 10 % v/v para resuspender el *pellet* bacteriano, el cual se dividió en alícuotas de 50 µl en tubos *Eppendorf* que fueron almacenadas a -80 °C para posteriores transformaciones.

Para transformar se adicionó al tubo de bacterias entre 0,20 - 0,50 µl de ADN, se incubó por 10 min en hielo y trasvasó el contenido en una cuba de electroporación de 0,10 cm de espesor. Se utilizó el equipo de electroporación *Bio Rad Gene Pulser II Electroporation System* y se realizó la misma a 200 ohm de resistencia, 25 µF de capacitancia y 1,64 V de corriente. A continuación las bacterias se resuspendieron en 200 µl de LB y se incubaron a 37 °C entre 30 - 60 min para su recuperación. Se sembró la mitad del volumen en una placa con LB-agar con el antibiótico cuya resistencia correspondía al gen contenido en el plásmido transfectado y se incubó a 37 °C toda la noche.

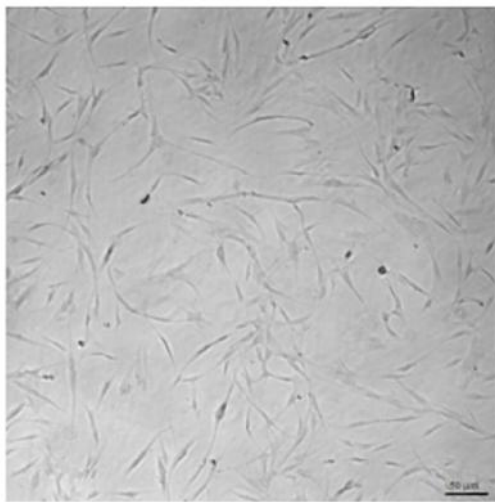
Cepa	Genotipo
<i>OmniMAX2</i>	<i>F- 80lacZ M15 (lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17(rk-, mk+) phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1 -</i>
<i>BL21(DE3)pLysS</i>	<i>B F<sup>-</sup> ompT gal dcm lon hsdS<sub>B</sub>(r<sub>B</sub><sup>-</sup>m<sub>B</sub><sup>-</sup>) (DE3 [lacI lacUV5-T7p07 ind1 sam7 nin5]) [malB<sup>+</sup>]<sub>K-12</sub>(<sup>S</sup>) pLysS[T7p20 ori<sub>p15A</sub>](Cm<sup>R</sup>)</i>

**Tabla 5.** Genotipo de las cepas empleadas en este trabajo: *OmniMAX2* y *BL21(DE3)pLysS*.

## *Resultados*

#### *4.1 Aislamiento de Células Madre derivadas de tejido adiposo y caracterización*

Se aislaron células madre mesenquimales adultas a partir de tejido adiposo subcutáneo donado por pacientes de sexo femenino y de edades comprendidas entre 25 y 65 años. Tras un procedimiento de cirugía estética denominado dermolipectomía se recolectaron aproximadamente 100 g de tejido. El mismo fue donado bajo consentimiento informado firmado por el paciente. Se realizó el aislamiento obteniéndose un rendimiento aproximado de  $1 \times 10^4$  células/g. Nuestro protocolo está basado en el descrito por Zuk y colaboradores y consiste en digestiones enzimáticas, seguidas de centrifugación y siembra del *pellet* celular (FEV) obtenido (Zuk *et al.*, 2001). Durante los primeros días de cultivo se realizaron varios lavados con PBS para ir eliminando células que no tienen capacidad de adhesión al plástico, entre ellas los glóbulos rojos que son las más abundantes. Una vez crecidas a 100% de confluencia las células se expandieron, así la población celular fue adquiriendo la morfología fusiforme típica (**Figura 16**).

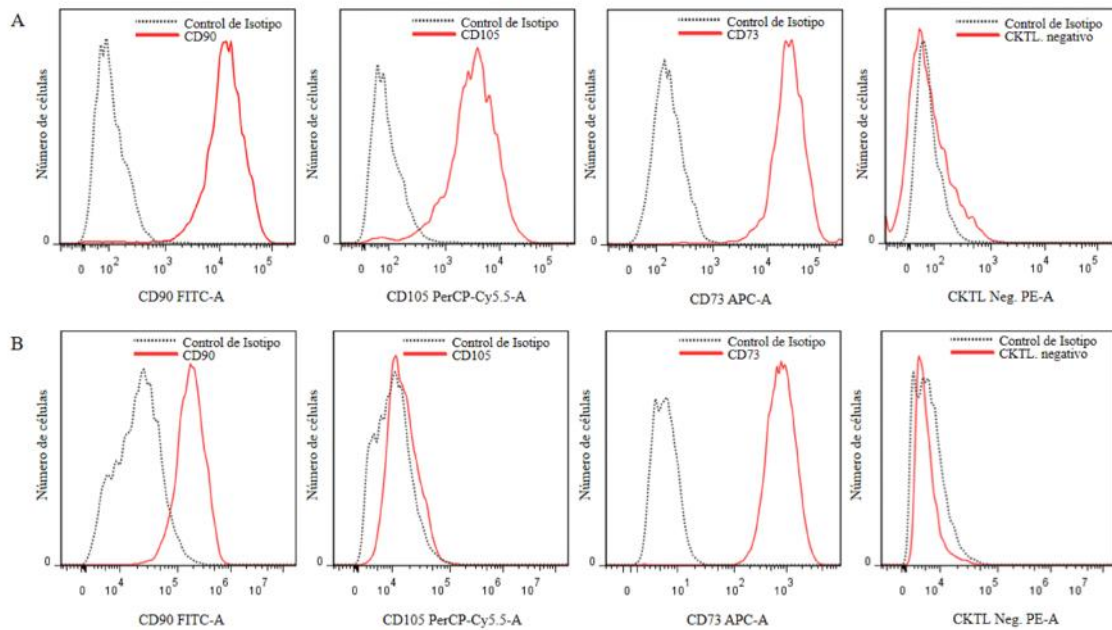


**Figura 16.** Imagen obtenida por microscopía de contraste de fases de la población de células madre mesenquimales aisladas de tejido adiposo humano. Aumento 4X.



Dado que la FEV contiene, además de un alto porcentaje de células de linaje estromal, otros linajes, principalmente de origen endotelial, hematopoyético y pericítico, se llevó a cabo la caracterización de las poblaciones obtenidas por análisis inmunofenotípico. Se utilizaron anticuerpos que reconocen marcadores que se expresan en células madre (positivos) y marcadores que se expresan en otros tipos celulares como los mencionados, pero no se expresan en las células madre (negativos). Los marcadores positivos para hASCs analizados fueron CD90, CD105 y CD73 (reconocidos por anticuerpos conjugados a FITC, PerCP-Cy5.5 y APC respectivamente) y los marcadores negativos fueron las proteínas de superficie CD34, CD11b, CD19, CD45 y HLA-DR (reconocidos por anticuerpos conjugados al fluoróforo PE).

Para determinar la expresión de los antígenos mencionados se emplearon células en un pasaje de cultivo inferior al sexto que fueron crecidas a 100 % de confluencia en placas de 10 cm de diámetro. Se levantaron dichas células utilizando Acutasa, una mezcla de enzimas con actividad proteolítica y colagenolítica, y se incubó posteriormente con los anticuerpos. Las muestras se analizaron mediante la técnica de citometría de flujo. Las mismas provenían de cinco pacientes y resultaron en poblaciones con un promedio mayor a 95 % CD90+ (en promedio  $98,38 \pm 0,44$  %) y CD73+ (en promedio  $98,74 \pm 0,32$  %) y un promedio inferior a 2 % CD34+, CD11b+, CD19+, CD45+ and HLA-DR+ (en promedio  $1,48 \pm 0,09$  %) (**Figura 17A**). En cuanto al marcador CD105 tuvimos dos tipos de resultados promedios:  $98,17 \pm 0,49$  y  $1,75 \pm 0,35$  de células que lo expresaban (**Figura 17B**).

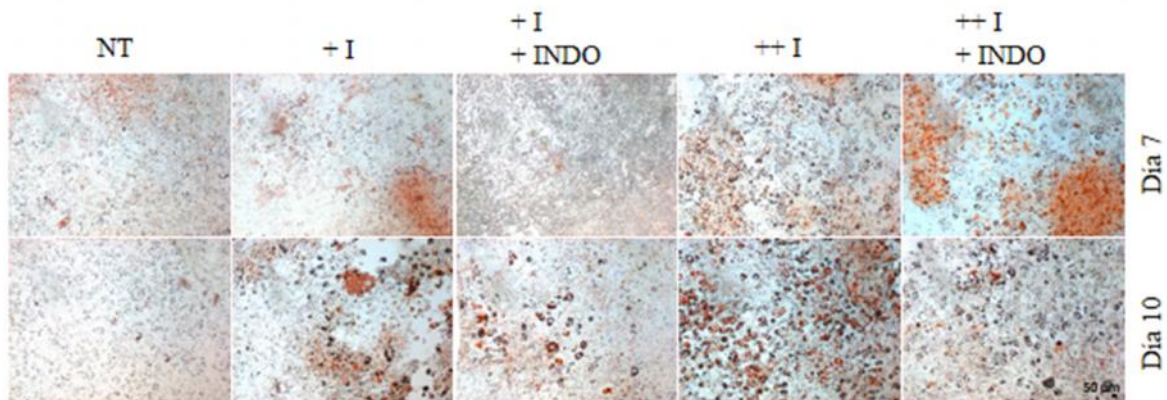


**Figura 17.** Caracterización de células madre derivadas de tejido adiposo humano. Análisis representativo de la caracterización por citometría de flujo de hASCs. Los histogramas indican el número de células para cada anticuerpo o *cocktail* de anticuerpos específicos. A) Gráficas representativas de una población de células CD105+. B) Gráficas representativas de una población de células CD105-.

#### 4.2 Diferenciación adipogénica

Diversas mezclas de drogas que inducen adipogénesis, de composición variable, aparecen reportadas en literatura como aquellas utilizadas durante la diferenciación de células 3T3-L1 y hASCs. Sin embargo, debido a diferencias en su eficiencia, se optimizaron las formulaciones y protocolos.

En primer lugar se evaluaron cuatro formulaciones que incluían dos concentraciones de indometacina (0 y 100  $\mu\text{M}$ ) y dos de insulina bovina (5 y 10  $\mu\text{g/ml}$ ) para células 3T3-L1. La eficiencia de estas mezclas fue analizada por tinción de las vacuolas lipídicas con ORO a día 7 y 10 luego de la inducción. El agregado de indometacina no favoreció la diferenciación, mientras que con la máxima concentración de insulina (y sin indometacina, ++I) se obtuvo un mayor porcentaje de células con vacuolas lipídicas respecto a lo obtenido con el resto de las formulaciones (**Figura 18**).



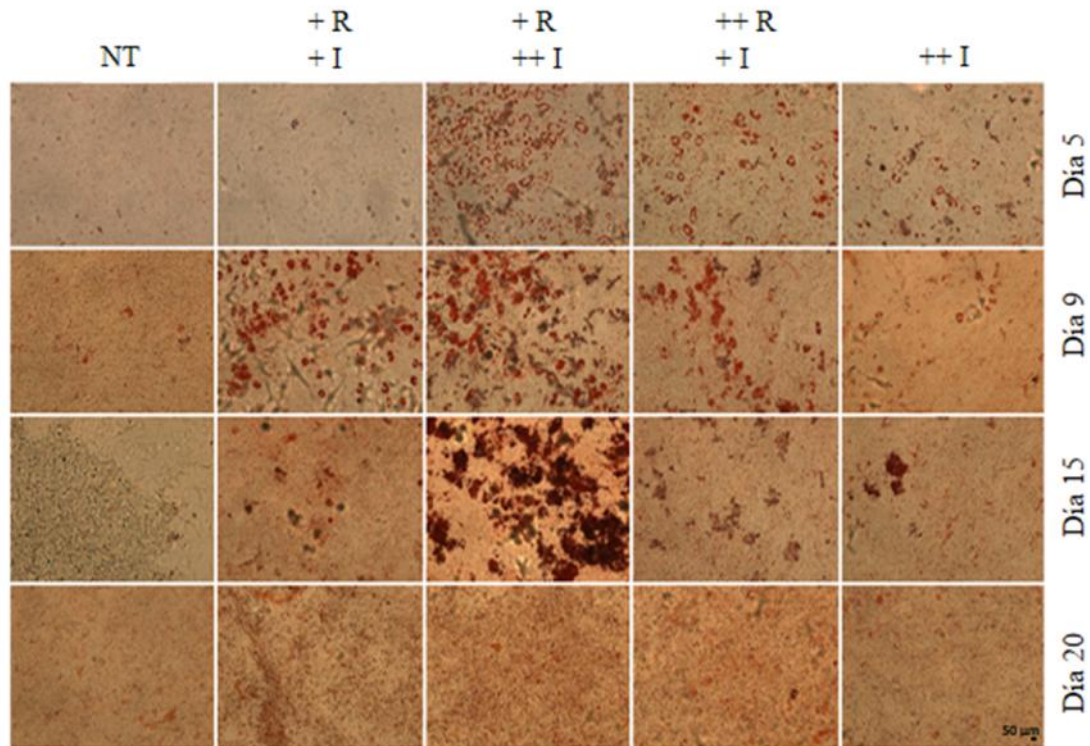
**Figura 18.** Evaluación de diferentes *coktails* de drogas inductoras de la diferenciación adipogénica. Imágenes de microscopía óptica de células 3T3-L1 control (NT) e inducidas a diferenciación adipogénica utilizando cuatro formulaciones diferentes. Dichas formulaciones incluyen (+INDO) o no indometacina 100  $\mu\text{M}$ , IBMX 0,5 mM, dexametasona 100 nM y dos concentraciones de insulina, 5 y 10  $\mu\text{g/ml}$  (+I y ++I). La eficiencia de las mezclas de drogas de diferenciación se evaluó por tinción con ORO a día 7 y 10 post-inducción. Las imágenes fueron tomadas en campo claro con aumento 10X.

Pese a ello, el porcentaje de células diferenciadas no superaba el 50%, por lo que se probó adicionar a la mezcla la droga rosiglitazona (agonista de PPAR ), en base a un trabajo previo de Zebisch y colaboradores (Zebisch *et al.*, 2012).

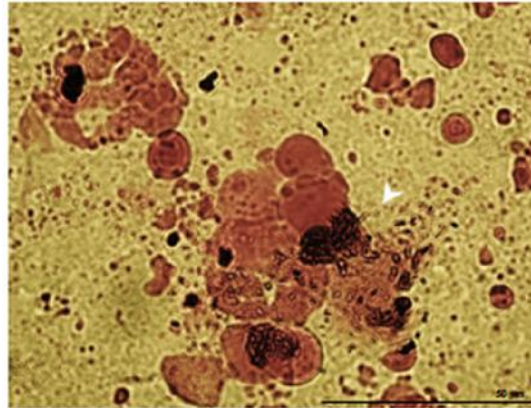
Se ensayaron otras cuatro formulaciones que contenían insulina bovina en concentraciones de 1 y 10  $\mu\text{g/ml}$  y rosiglitazona en concentraciones de 0, 2 y 4  $\mu\text{M}$  (además de IBMX 0,5 mM y dexametasona 250 nM). La eficiencia se evaluó de igual manera que los experimentos anteriores a día 5, 9, 15 y 20 post-inducción. Se observó que la mezcla de drogas de mayor eficiencia contenía dexametasona 250 nM, IBMX 0,5 mM, rosiglitazona 2  $\mu\text{M}$  e insulina bovina 10  $\mu\text{g/ml}$  (+R, ++I) (**Figura 19**). La acumulación de vacuolas dentro de las células diferenciadas se incrementó hasta el día 7 luego de la inducción. Posteriormente las vacuolas comenzaron a liberar su contenido (**Figura 20**) y la monocapa de células comenzó a levantarse desde la periferia del pocillo hacia el centro, hasta quedar por completo en suspensión. Por esta razón se decidió finalizar los experimentos a día 7, evitando la ruptura de las vacuolas y/o el levantamiento de la monocapa celular (Gojanovich *et al.*, 2016).

En los primeros ensayos de diferenciación adipogénica de preadipocitos 3T3-L1 se observó que las células no tratadas con drogas (NT), crecidas en medio DMEM **completo** (DMEM con SFB 10 % v/v), se diferenciaban, aunque en menor grado que las células tratadas. Esta diferenciación no ocurre durante el mantenimiento de rutina de los cultivos ya que no se permite que las células permanezcan al 100 % de confluencia en presencia de SFB 10 % v/v por más de 2 días. Durante los ensayos de diferenciación adipogénica, las células NT suelen llegar a 100 % de confluencia, especialmente cuando el medio está suplementado con SFB 10 % v/v, y las mismas se cultivan durante el tiempo total del ensayo por lo que las células generan algunas vacuolas y dejan de ser un control negativo. Debido a esto, el control sin diferenciar se realizó con un porcentaje de suero inferior (2,5 % v/v) a aquel empleado en condiciones estándar de cultivo. En estas condiciones las células NT no se diferenciaron.

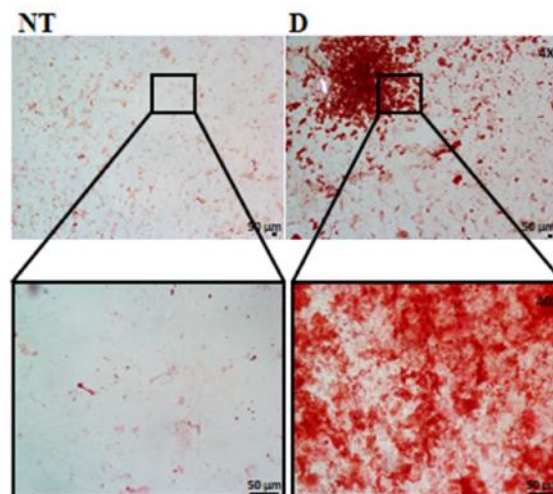
El análisis por microscopía óptica de células 3T3-L1 diferenciadas teñidas con ORO evidenció grupos de células diferenciadas dispersos entre células no diferenciadas (**Figura 21**). La cuantificación medida por absorbancia de ORO fue significativamente más alta ( $p < 0,05$ ) en células diferenciadas (**Figura 22A**). Consistentemente, la expresión relativa del gen marcador de adipogénesis *FABP4* medida por qPCR fue 450 veces superior luego de 7 días de diferenciación en células diferenciadas respecto a aquellas no tratadas (**Figura 22B**) (Gojanovich *et al.*, 2016).



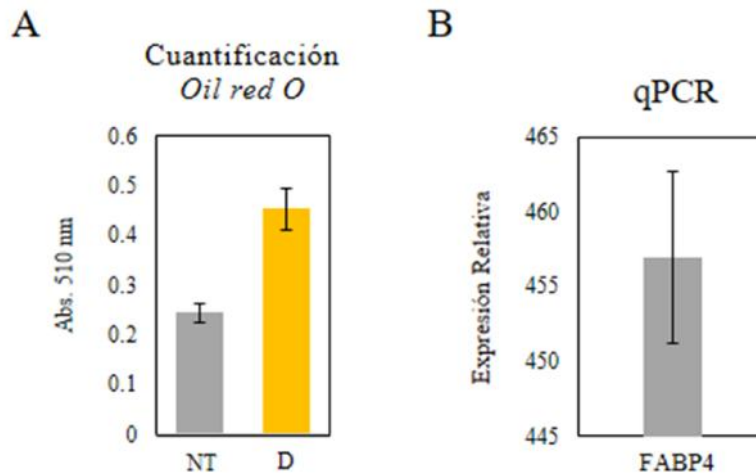
**Figura 19.** Determinación de la concentración óptima de rosiglitazona e insulina en la mezcla de inducción de adipogénesis. Imágenes de microscopía óptica de células 3T3-L1 control (NT) e inducidas a diferenciación adipogénica empleando cuatro formulaciones que incluyen ausencia y presencia de rosiglitazona 2 y 4  $\mu\text{M}$  (+R, ++R) y dos concentraciones de insulina bovina, 1 y 10  $\mu\text{g/ml}$  (+I, ++I), además de IBMX 0,5 mM y dexametasona 250 nM. La eficiencia de estas formulaciones se evaluó por tinción con ORO a día 5, 9, 15 y 20 post-inducción. Las imágenes fueron tomadas con un microscopio en campo claro con un aumento 10X.



**Figura 20.** Ruptura de una vacuola lipídica en células 3T3-L1 inducidas a diferenciación adipogénica por un período de 9 días. La imagen fue tomada con un microscopio en campo claro con un aumento 100X.



**Figura 21.** Diferenciación adipogénica de células 3T3-L1. Imágenes de microscopía óptica de preadipocitos 3T3-L1 sin tratar (NT) e inducidos a diferenciación adipogénica (D) por 7 días utilizando la mezcla de diferenciación conteniendo dexametasona 250 nM, IBMX 0,5 mM, rosiglitazona 2 μM e insulina bovina 10 μg/ml. La monocapa de células fue fotografiada en microscopio de campo claro en aumentos 4 y 40X (escala 50 μm), posteriormente a la tinción de las vacuolas lipídicas con ORO.



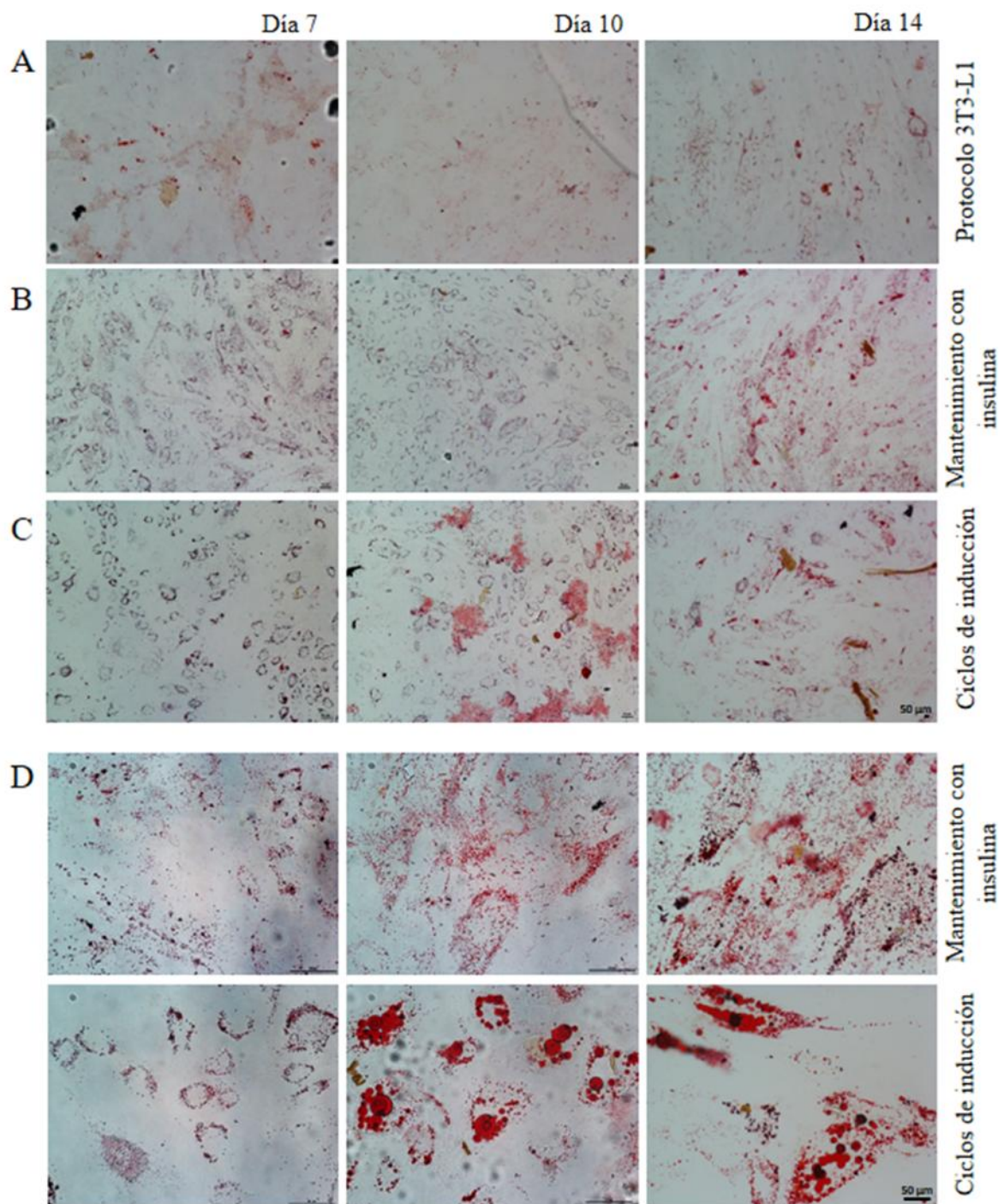
**Figura 22.** Nivel de diferenciación adipogénica de células 3T3-L1. A) Cuantificación de la acumulación de lípidos por medida de absorbancia de ORO a 510 nm en preadipocitos 3T3-L1 control (NT) e inducidas a diferenciación adipogénica durante 7 días (D) ( $p = 0,05$ ). B) Expresión relativa del gen *FABP4* medida por qPCR luego de 7 días de diferenciación adipogénica de células 3T3-L1. Las barras representan los promedios de la media de los datos de tres réplicas biológicas y técnicas de ambos ensayos.

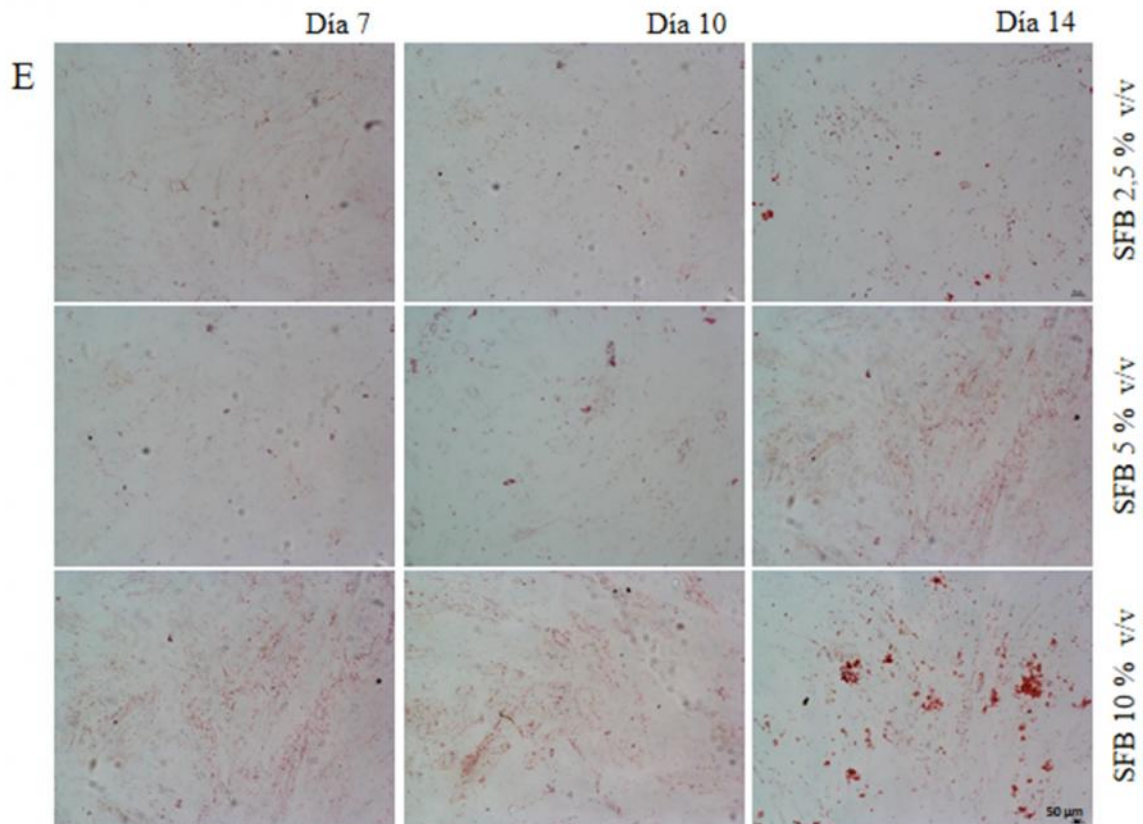
Al igual que los preadipocitos 3T3-L1, las células hASCs fueron inducidas a diferenciación durante 7 días manteniendo la misma formulación de la mezcla de inducción e igual protocolo. Sin embargo, no resultó eficiente para dichas células (sólo se obtuvo alrededor de un 10 % de células diferenciadas) (**Figura 23A**) por lo que se hicieron ciertas modificaciones. Primeramente se evaluó extender a día 10 y 14 la diferenciación, teniendo como resultado un aumento del número de células que presentaban vacuolas lipídicas a medida que pasaban los días, aunque el mayor porcentaje de células conteniendo vacuolas lipídicas alcanzado no superó el 30 % (a día 14, **Figura 23A**). Seguidamente se evaluó utilizar un medio de mantenimiento que incluyera insulina (10  $\mu\text{g/ml}$ ) hasta los días 7, 10 y 14 post-inducción (en contraste con el protocolo previo, en el cual las células eran cultivadas

con insulina 10  $\mu\text{g/ml}$  solo durante dos días luego de la inducción y posteriormente con medio DMEM **completo**). Se observó una considerable mejora en el porcentaje de células que presentaban vacuolas lipídicas (40 %, 50 % y 60 % para los días 7, 10 y 14 respectivamente) (**Figura 23B**). Por último, se llevaron a cabo una serie de ciclos de inducción, en los cuales se adicionó la mezcla de drogas a día 5 y a día 8 post-inducción (en forma adicional al agregado inicial). Cada vez que se agregó la mezcla de drogas, las células se incubaron con la misma por un período de 2 días. Se evaluó la acumulación de vacuolas lipídicas por tinción con ORO a día 7 (con un agregado de drogas) y a día 10 y 14 (con un segundo agregado). En este último protocolo se observó un alto número de células que contenían en su interior muchas vacuolas, la mayoría de gran tamaño (a diferencia del protocolo anterior donde había una gran número de vacuolas pero pequeñas), con un porcentaje de células diferenciadas alrededor de 40 % a día 7 y un 80 y 90 % a días 10 y 14 respectivamente (**Figura 23C**). Dados estos resultados, y para los experimentos posteriores se decidió llevar a cabo la diferenciación adipogénica de hASCs mediante un protocolo de inducción cíclico a día final 10. Dado que nuestro interés era que las células simplemente presenten el fenotipo típico del linaje adipogénico, aunque no llegaran a convertirse en un adipocito maduro, y considerando que las células conteniendo vacuolas de gran tamaño son difíciles de fotografiar por microscopía como así también difíciles de manipular (por el riesgo de ruptura de dichas organelas) se eligió finalizar los ensayos a día 10 en lugar de a día 14. Imágenes de microscopía óptica de células hASCs diferenciadas y control teñidas con ORO evidenciaron que la mayoría de las células de la monocapa habían al menos iniciado el proceso de diferenciación, encontrándose células con acumulación de vacuolas lipídicas distribuidas de manera homogénea en toda la superficie del cubreobjeto bajo las condiciones elegidas.



Para los controles sin diferenciar de hASCs se probaron tres concentraciones de SFB: 2,5; 5 y 10 % v/v, a días finales 7, 10 y 14. Con la menor concentración de SFB se observó una disminución en la viabilidad celular y un porcentaje despreciable de diferenciación. En cambio con la máxima concentración de SFB ensayada, si bien no se vió alterada la viabilidad, un porcentaje significativo de las células se diferenciaron. Por ello se optó por la concentración intermedia, SFB 5 % v/v, para suplementar el medio de cultivo de las células no tratadas (**Figura 23E**).





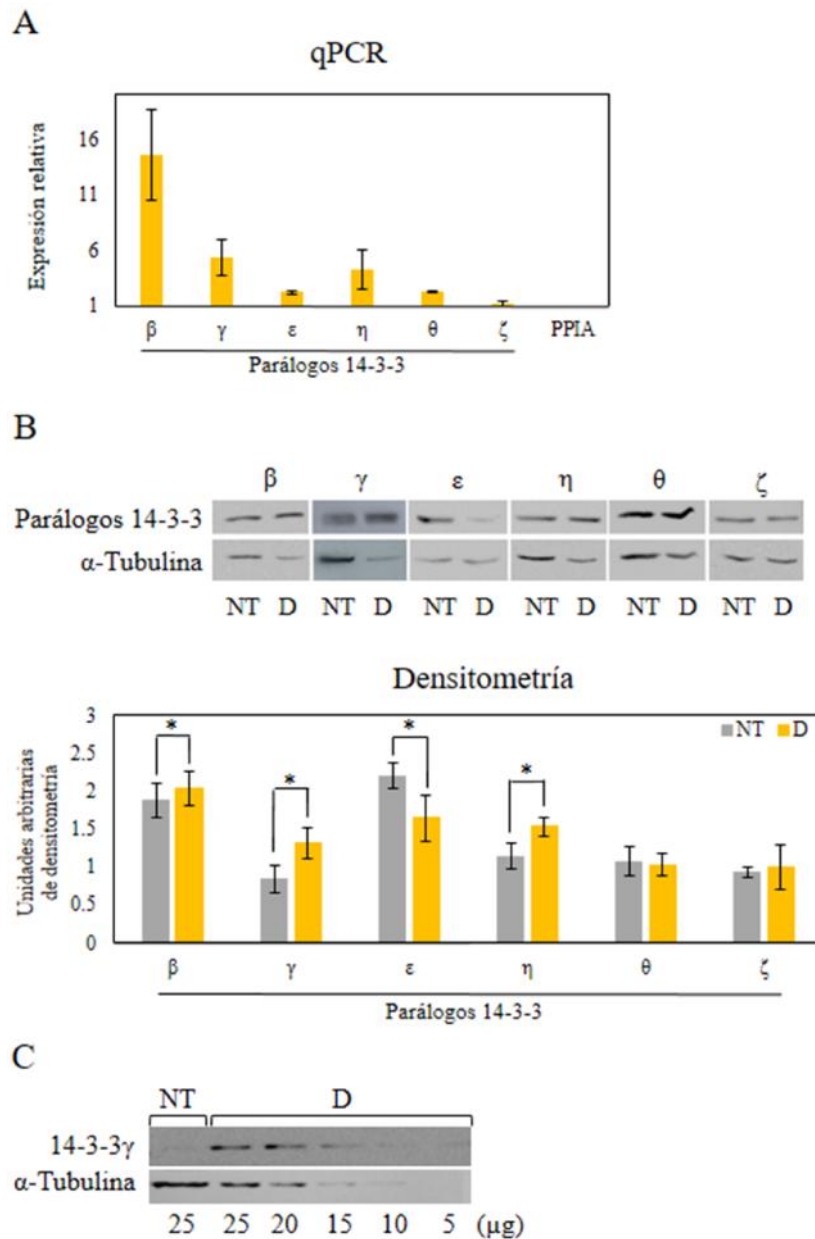
**Figura 23.** Optimización del protocolo de diferenciación adipogénica de células hASCs. Imágenes de microscopía en campo claro de células diferenciadas y control teñidas con ORO luego de 7, 10 y 14 días de diferenciación con aumentos 10X y 40X. A) Células hASCs diferenciadas empleando el mismo protocolo utilizado para la diferenciación de preadipocitos 3T3-L1 (ver leyenda **Figura 19**). B) Células hASCs diferenciadas utilizando en el medio de mantenimiento insulina bovina 10 µg/ml hasta el día en que se fijaron las células. C) Células hASCs diferenciadas utilizando un protocolo de inducción cíclico con agregado adicional de la mezcla de drogas de diferenciación a día 5 y día 8 post-inducción inicial. D) Células hASCs diferenciadas utilizando en el medio de mantenimiento insulina bovina 10 µg/ml hasta el día en que se fijaron las células y utilizando un protocolo de inducción cíclico. Imágenes con aumento 40X. E) Células hASCs control cultivadas en presencia de DMEM suplementado con SFB 2,5, 5 y 10 % v/v.

#### *4.3 Niveles relativos de ARNm y proteína de los parálogos de 14-3-3 en células no tratadas y diferenciadas*

Dado que la familia de proteínas 14-3-3 regula varias proteínas implicadas en la diferenciación celular, se evaluaron los niveles de ARNm y proteínas de cada uno de los siete parálogos de dicha familia en células no tratadas y diferenciadas.

Durante la diferenciación de preadipocitos 3T3-L1 se hallaron diferencias significativas en los niveles de ARNm de tres de los seis parálogos evaluadas por qPCR (**Figura 24A**). 14-3-3 presentó la mayor diferencia, con un incremento promedio de 14 veces en células diferenciadas durante 7 días respecto de células no tratadas. 14-3-3 y 14-3-3 también mostraron mayores niveles de ARNm en células diferenciadas, aunque esta diferencia fue menos pronunciada (5,30 y 4,20 veces respectivamente) que aquella observada para 14-3-3 (**Figura 24A**, Gojanovich *et al.*, 2016).

Coincidiendo con lo observado a nivel de ARNm, los niveles de proteína de 14-3-3, y también fueron mayores en células 3T3-L1 diferenciadas respecto de células control, aunque en este caso el nivel más alto correspondió al parálogo . En contraste, los niveles de proteína de 14-3-3 disminuyeron luego de la diferenciación, mientras que los niveles de y permanecieron constantes (**Figura 24B**). Debido a que 14-3-3 mostró la mayor diferencia a nivel proteico, con el objetivo de cuantificar este incremento relativo en células diferenciadas, se analizaron por WB cantidades decrecientes de extractos proteicos totales de dichas células, desde 25 a 5 µg. Así se comprobó un aumento de 2,50 veces en células diferenciadas respecto de células no tratadas (**Figura 24C**). 14-3-3 fue el único parálogo cuyos niveles de ARNm y proteína no fueron detectados en células 3T3-L1.

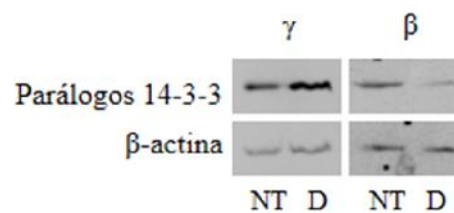


**Figura 24.** Niveles relativos de proteínas 14-3-3 en células 3T3-L1 diferenciadas (D) y control (NT). A) Expresión relativa de las isoformas de 14-3-3 y el gen normalizador *PPIA* medida por qPCR luego de 7 días de diferenciación adipogénica de células 3T3-L1. Las barras representan los promedios de la media de tres réplicas biológicas y técnicas de qPCR. B) 40 μg de extracto celular total de células 3T3-L1 diferenciadas y control fueron cargados por pocillo y separados por SDS-PAGE. Las membranas fueron divididas para la reacción con anticuerpos específicos contra cada uno de los diferentes parálogos de 14-3-3 y  $\alpha$ -tubulina como control de carga. Las barras en el gráfico representan la media  $\pm$  DE, de los valores obtenidos en 3 experimentos, cuantificados por densitometría y expresados relativos a los valores de  $\alpha$ -tubulina. Los asteriscos indican diferencias significativas entre muestras (usando la prueba de suma de rangos de Wilcoxon,  $p < 0,05$ ). C) Mismo ensayo que en B usando anticuerpo anti-14-3-3  $\gamma$  y  $\alpha$ -tubulina. Cantidades decrecientes de extractos totales de células diferenciadas fueron cargadas por pocillo.

Teniendo en cuenta los resultados previos en 3T3-L1, en los cuales 14-3-3  $\gamma$  y  $\beta$  presentaron las mayores variaciones tanto a nivel de ARNm como de proteína, se decidió evaluar específicamente estos dos parálogos antes y durante la diferenciación adipogénica de hASCs.

Al diferenciar al linaje adipogénico células hASCs por el término de 10 días se observaron diferencias significativas en los niveles de ARNm, evaluados por qPCR, tanto de 14-3-3  $\gamma$  como de 14-3-3  $\beta$ . Ambos parálogos, a diferencia de lo obtenido en 3T3-L1, presentaron igual variación en células diferenciadas respecto de las células control, siendo este incremento de 5,40 veces para ambas proteínas. Se evaluó la expresión relativa del gen marcador de adipogénesis *FABP4* por qPCR, el cual fue 31 veces superior luego de 10 días de diferenciación en células diferenciadas respecto a aquellas no tratadas.

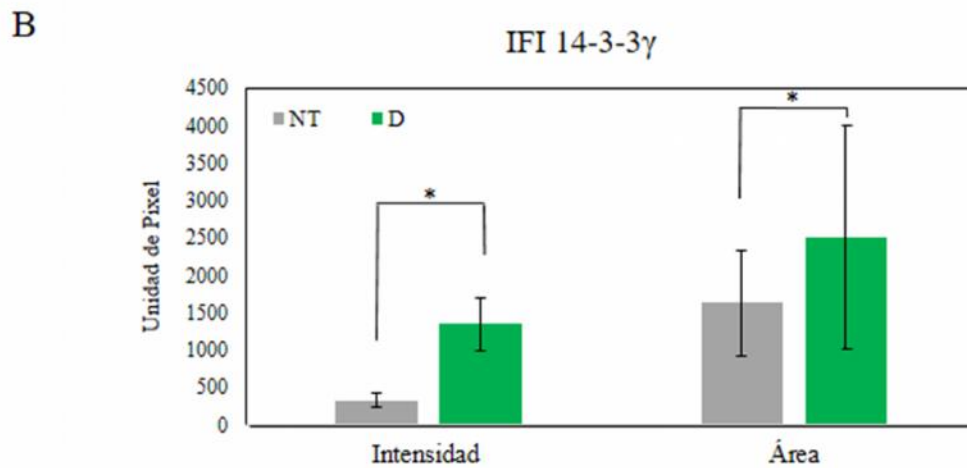
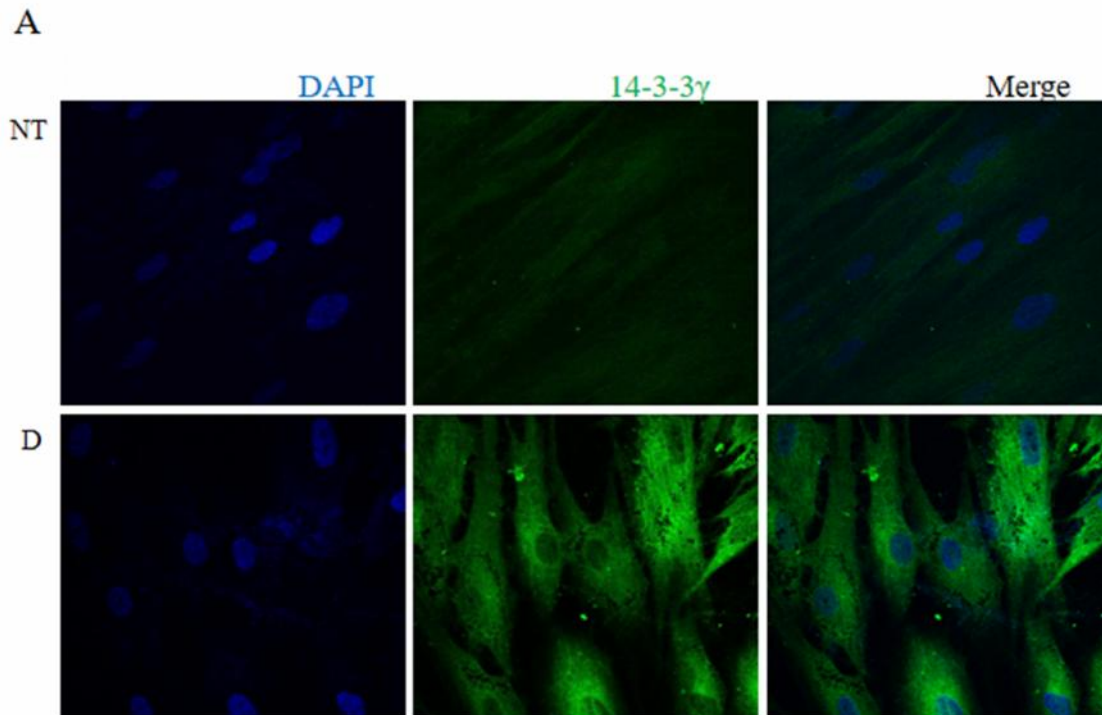
En discrepancia con los resultados obtenidos de los ARNm, los niveles proteicos de 14-3-3  $\gamma$  disminuyeron luego de la diferenciación. En cambio los niveles de proteína de 14-3-3  $\beta$  mantuvieron la misma tendencia que los niveles de ARNm, comprobándose un aumento de 5 veces en células diferenciadas respecto de células no tratadas (**Figura 25**).



**Figura 25.** Niveles relativos de proteínas 14-3-3 en células hASCs diferenciadas al linaje adipogénico (D) y control (NT). Fueron cargados por pocillo y separados por SDS-PAGE 40  $\mu$ g de extractos celulares totales de células hASCs diferenciadas y control. Las membranas fueron divididas para la reacción con anticuerpos específicos contra 14-3-3  $\gamma$  y  $\beta$ , y  $\beta$ -actina como control de carga.

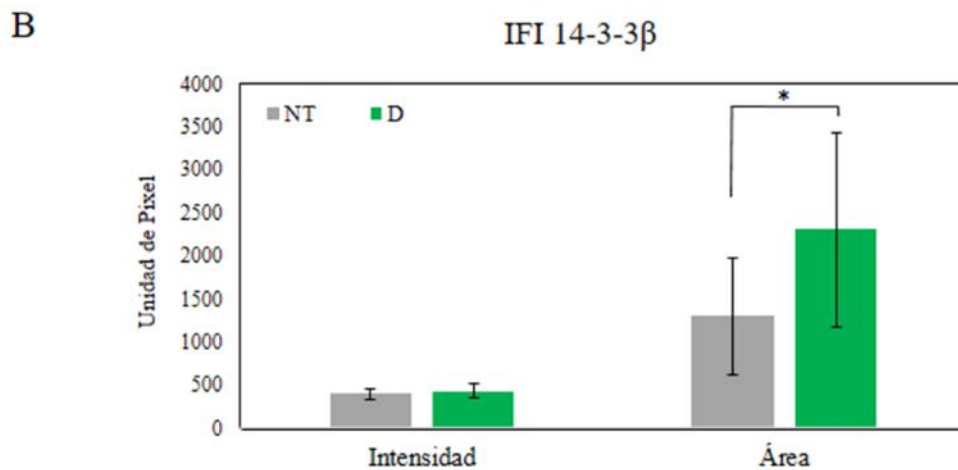
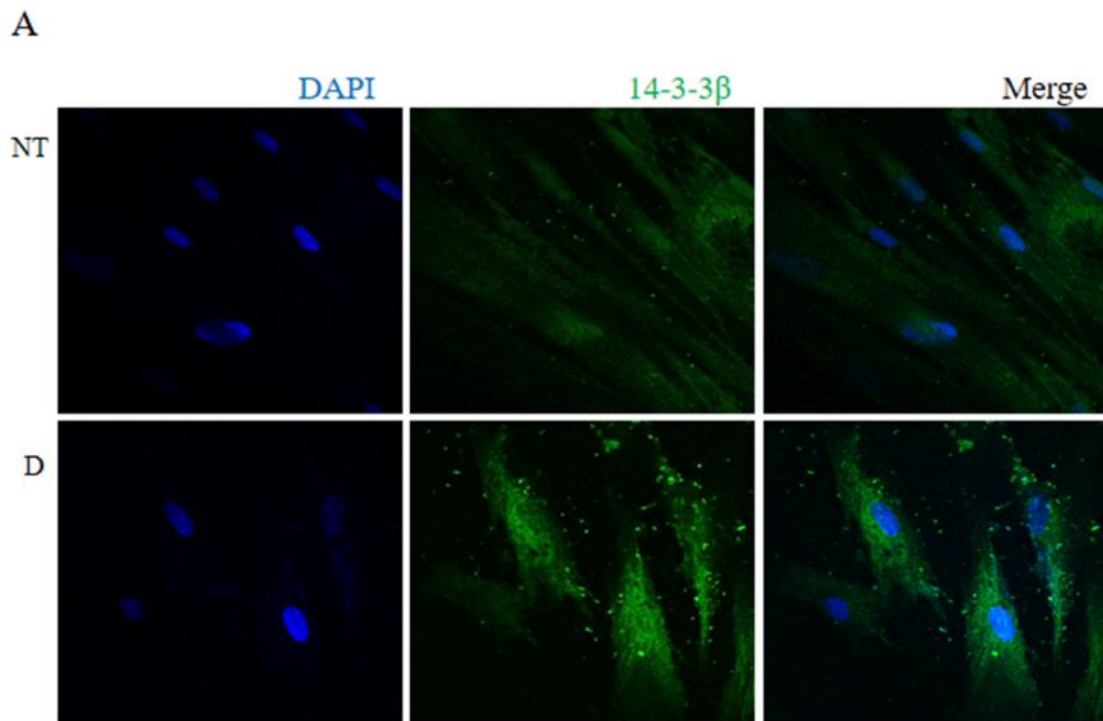
---

Mediante la técnica de IFI se detectaron los parálogos 14-3-3 y en células hASCs diferenciadas y no tratadas. Se encontraron variaciones significativas en la cuantificación de fluorescencia total para 14-3-3 ( $p = 0,05$ ) (**Figura 26A y B**) y no así para 14-3-3, cuya señal fluorescente permaneció constante en células diferenciadas respecto del control (**Figura 27A y B**). La intensidad de fluorescencia de 14-3-3 se incrementó en promedio 4 veces en células diferenciadas respecto de las células sin tratar, concordando esto con los resultados hallados en el análisis de los niveles proteicos por la técnica de WB (**Figura 26B**). Sin embargo, no se puede decir lo mismo para el parálogo 14-3-3, cuyo resultado difiere con lo determinado por WB (**Figura 27B**). Antes y durante la diferenciación el área de las células presentó diferencias significativas ( $p = 0,05$ ). Tanto el control de IgG normal de conejo como el control de incubación de las células sólo con el anticuerpo secundario, no presentaron señal.



**Figura 26.** Detección por inmunofluorescencia indirecta de 14-3-3 en células hASCs control (NT) y diferenciadas al linaje adipogénico (D). A) Imágenes de microscopía confocal de fluorescencia en aumento 60X muestran: células hASCs que presentan en azul los núcleos marcados con DAPI y en verde la proteína 14-3-3. B) Valores de intensidad de fluorescencia media y de área de la célula antes y después de la diferenciación adipogénica representados en gráficas de color gris y verde respectivamente. Las barras representan los promedios de la media de los datos de 10 imágenes analizadas (sumando en total 23 células). Las diferencias significativas fueron indicadas mediante un asterisco ( $p < 0,05$ ).





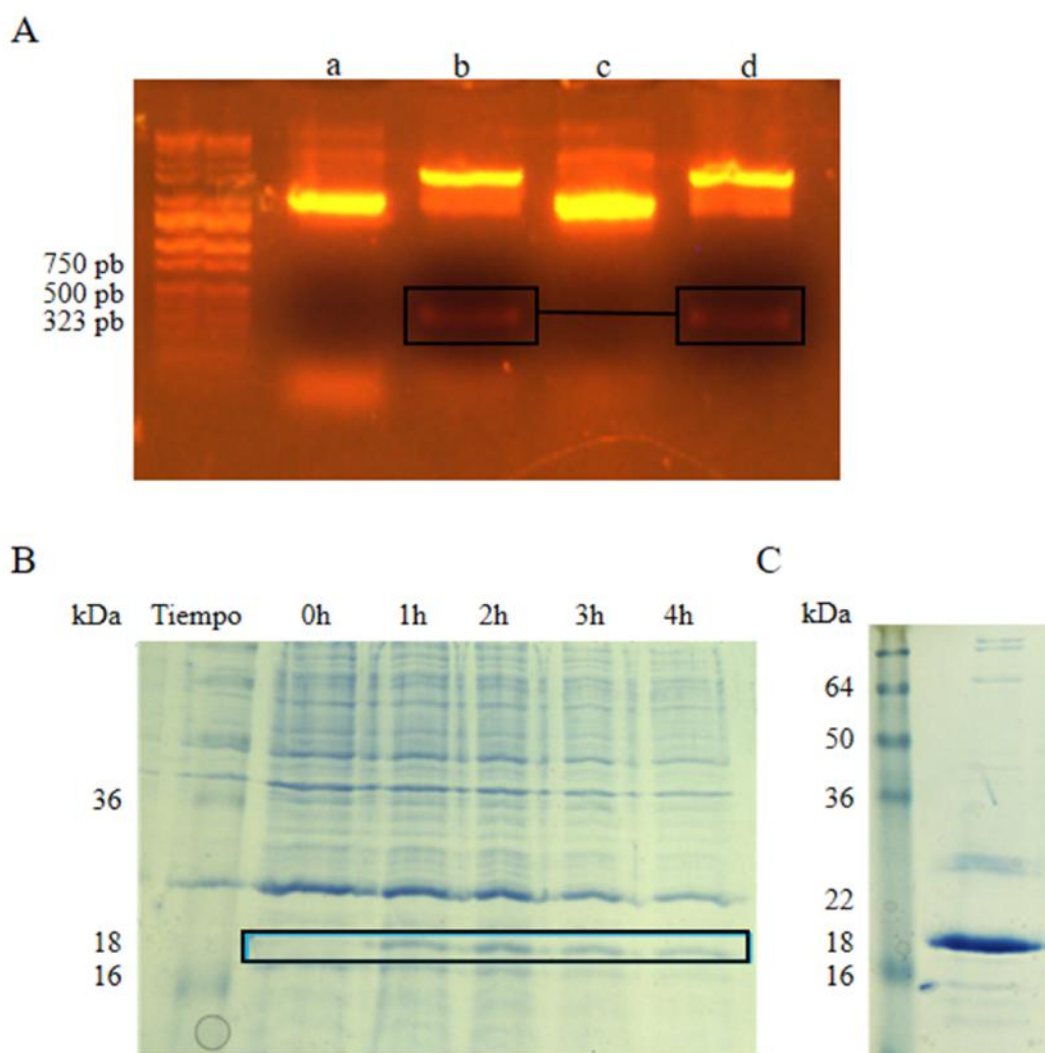
**Figura 27.** Detección por inmunofluorescencia indirecta de 14-3-3 en células hASCs control (NT) y diferenciadas al linaje adipogénico (D). A) Imágenes de microscopía confocal de fluorescencia en aumento 60X muestran: células hASCs que presentan en azul los núcleos marcados con DAPI y en verde la proteína 14-3-3. B) Valores de intensidad de fluorescencia media y de área de la célula antes y después de la diferenciación adipogénica representados en gráficas de color gris y verde respectivamente. Las barras representan los promedios de la media de los datos de 10 imágenes analizadas (sumando en total 13 células). Las diferencias significativas fueron indicadas mediante un asterisco ( $p < 0,05$ ).

#### 4.4 Producción de anticuerpo policlonal contra la proteína TAZ

Para la producción de un anticuerpo policlonal contra la proteína TAZ, se sub-clonó un fragmento de la región amino-terminal de TAZ de ratón, de 95 aminoácidos, en el vector de expresión pRSET-A corriente abajo de una etiqueta de histidina (His x 6). Se transformaron bacterias *OmniMAX2*, las colonias resultantes se seleccionaron mediante el uso de antibióticos y luego se procedió a la extracción del ADN plasmídico. Se analizó por digestión con enzimas de restricción el ADN plasmídico de dos de las colonias seleccionadas, empleándose las enzimas *XhoI* y *EcoRI*, y se verificó por electroforesis en gel de agarosa la presencia de un fragmento de 323 pb (**Figura 28A**).

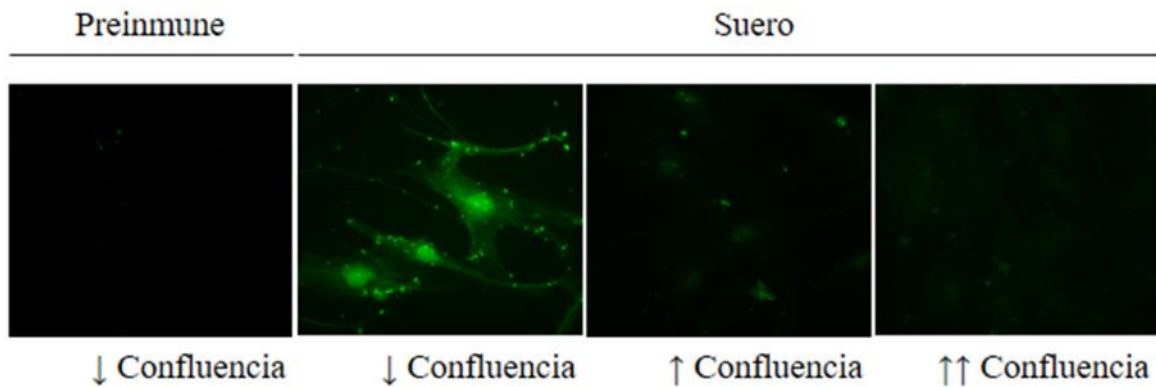
Para la expresión, se transformaron bacterias *BL21(DE3)pLysS* y se evaluaron los niveles de expresión a distintos tiempos post-inducción (**Figura 28B**). Se obtuvo un máximo de expresión a las 3 h luego de la inducción. El péptido se purificó por columna de  $\text{Co}^{+2}$ , obteniéndose un eluato que presenta una única banda intensa a la altura de 18 kDa (**Figura 28C**), acorde a lo estimado teóricamente por la secuencia del péptido resultante expresado.

Se inmunizó un conejo (según protocolo descrito en la sección 3.8 de Materiales y Métodos de este trabajo, CICUAL (Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de Experimentación) tramitado por la Universidad Nacional de San Martín), y el suero obtenido al cabo de 6 semanas se analizó por las técnicas de WB e IFI. Se pudo observar que el suero reconoce al péptido puro, mientras que el suero preinmune, a igual dilución, no presentó señal (**Figura 29A**). Se verificó además que este suero reconoce TAZ endógena en extracto total de células 3T3-L1 a diferentes diluciones (**Figura 29B**) y en extracto total de células HEK293T, siendo capaz a su vez de reconocer TAZ recombinante (TAZ fusionada a GFP, GFP-TAZ) en extractos de estas mismas células (**Figura 29C**). Mediante IFI se observó que dicho suero puede reconocer a TAZ en estado nativo en células hASCs crecidas a diferentes porcentajes de confluencia, mientras que el suero preinmune no mostró señal (**Figura 30**).



**Figura 28.** Expresión heteróloga de péptido de la región N-terminal de TAZ. A) Electroforesis en gel de agarosa de muestras de ADN plásmidico (pRSET-A-insertoTAZ) sin digerir proveniente de dos colonias individuales I y II (a y b respectivamente) y digerido con las enzimas *XhoI* y *EcoRI* (c y d respectivamente). B) Análisis por SDS-PAGE de extractos celulares de bacterias *BL21(DE3)pLysS* tomados a diferentes tiempos post-inducción. C) Análisis por SDS-PAGE del eluato recuperado luego de la inducción de bacterias *BL21(DE3)pLysS* por un período de 3 h y posterior purificación por columna de  $\text{Co}^{+2}$ .





**Figura 30.** Detección por inmunofluorescencia indirecta de TAZ en células hASCs crecidas a distintos porcentajes de confluencia. Imágenes de microscopía de fluorescencia en aumento 40X muestran: células hASCs que presentan en verde la señal proveniente de la incubación de las células con el suero recolectado al final de la inmunización del conejo con el péptido de TAZ. El suero preimmune y el suero recolectado tras la inmunización se emplearon en una dilución 1/10 y las células fueron crecidas a baja confluencia ( ↓ confluencia) e incubadas con cada uno de los sueros mencionados, y a confluencia media ( ↑ confluencia) y alta confluencia ( ↑↑ confluencia) e incubadas solo con el suero recolectado luego de 6 semanas de inmunización del conejo.

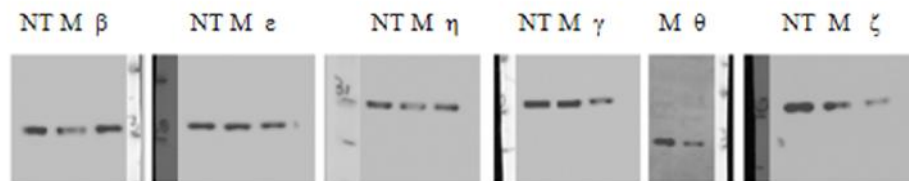
#### *4.5 Silenciamiento de isoformas de 14-3-3 a través de shRNA y evaluación de la localización sub-celular de TAZ*

Se realizaron los sub-clonados correspondientes de los *shRNAs* para cada parálogo de 14-3-3 en el vector viral *pHAGE2-FulIEF1-ZsGreen-WPRE*. Todos los *shRNAs* diseñados fueron previamente evaluados por transfección de células 3T3-L1 en nuestro laboratorio. Se realizaron extractos proteicos de dichas células y se analizaron por WB obteniéndose una disminución de la señal para los parálogos 14-3-3 , y . Aquellas construcciones que no presentaron disminución de la señal fueron descartadas, probándose con nuevos diseños de

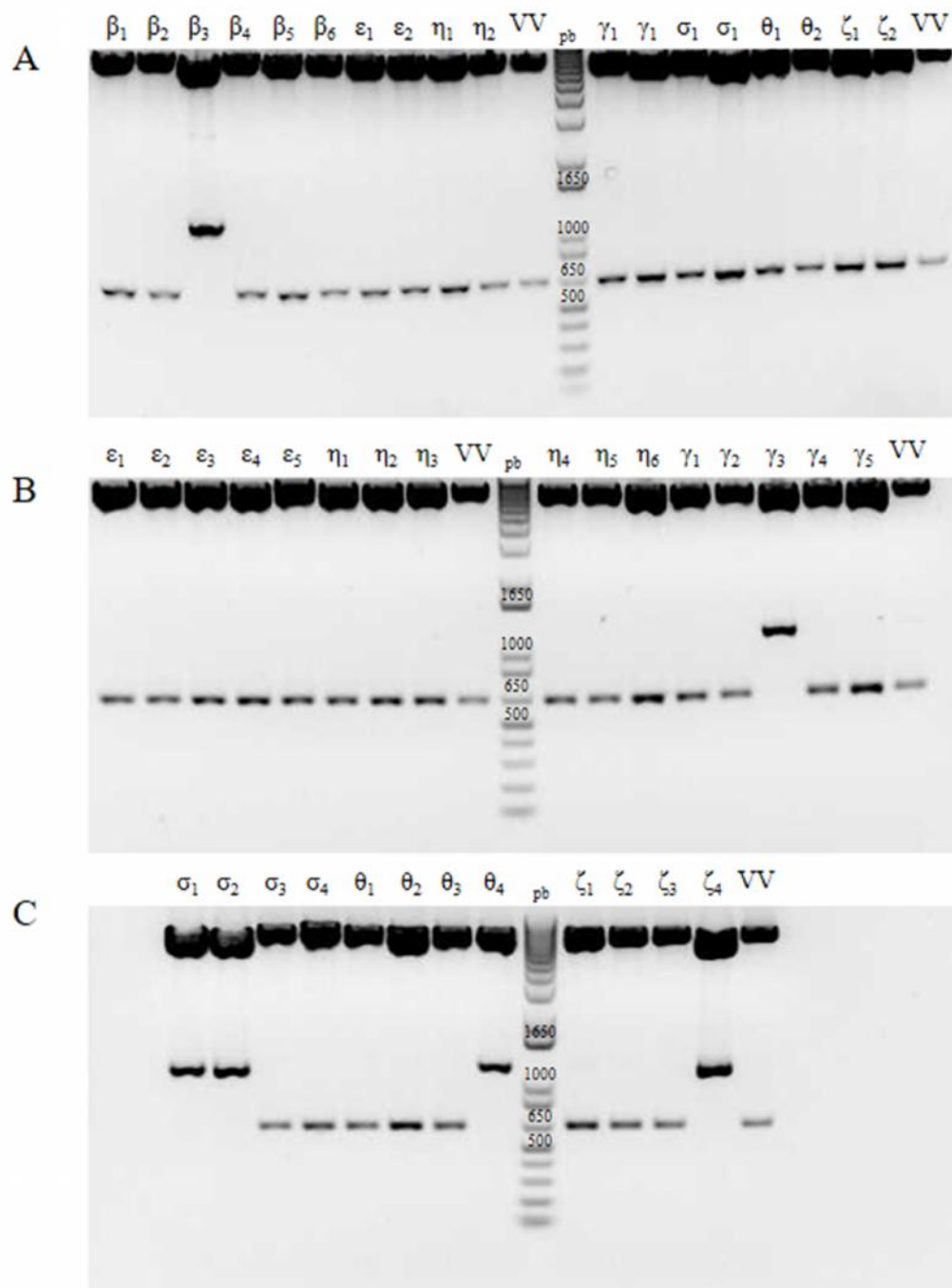
los *shRNAs* para esos parálogos (**Figura 31**). Para los sub-clonados se transformaron con cada ligación bacterias *OmniMAX2*, se seleccionaron colonias correspondientes a cada sub-clonado mediante el uso de antibiótico y se procedió a la extracción del ADN plasmídico. Cada clon fue analizado por restricción empleándose las enzimas *Bam*HI y *Kpn*I. Se verificó por electroforesis en gel de agarosa 0,80 % la presencia de un fragmento de 966 pb en el caso que el clon contuviera la construcción resultante del sub-clonado o caso contrario, la presencia de un fragmento de 598 pb si el clon presentaba solo el vector sin el *shRNA*. Así se analizaron distintos números de colonias hasta dar con al menos un clon positivo para los 7 parálogos: 14-3-3 (Figura 32A), 14-3-3 (Figura 32B), 14-3-3 , , (Figura 32C), 14-3-3 (Figura 32D) y 14-3-3 (Figura 32E). Seguidamente se llevó a cabo la producción de partículas virales conteniendo los *shRNAs* para silenciar los parálogos 14-3-3 y (teniendo en cuenta los resultados obtenidos en los análisis de expresión de estos parálogos y sus variaciones durante la adipogénesis), y se infectaron células 3T3-L1 y hASCs. Luego en las células 3T3-L1 (las hASCs no sobrevivieron a la infección) se utilizó la técnica de IFI, empleando un anticuerpo comercial (hecho en ratón) que reconoce la proteína TAZ, para poder visualizar así su localización sub-celular luego de haber silenciado uno de los parálogos de 14-3-3. Estos últimos se visualizaron mediante los mismos anticuerpos (hechos en conejo, Martin *et al.*, 1994) utilizados previamente en los WB para evaluar los niveles proteicos de los parálogos de 14-3-3 (**Figura 24B**) y su silenciamiento (**Figura 31**).

Las células infectadas se detectaron por expresión del gen reportero ZsGreen (fluorescencia verde). Se observó que las células infectadas con el *shRNA* que silencia 14-3-3 , presentaron más señal nuclear del co-regulador transcripcional TAZ (fluorescencia roja) que células vecinas que no habían sido infectadas. Aquellas células no infectadas mostraron una localización principalmente citoplasmática con poca señal nuclear (**Figura 33**). En células infectadas con el *shRNA* que silencia 14-3-3 no se observaron diferencias en la localización

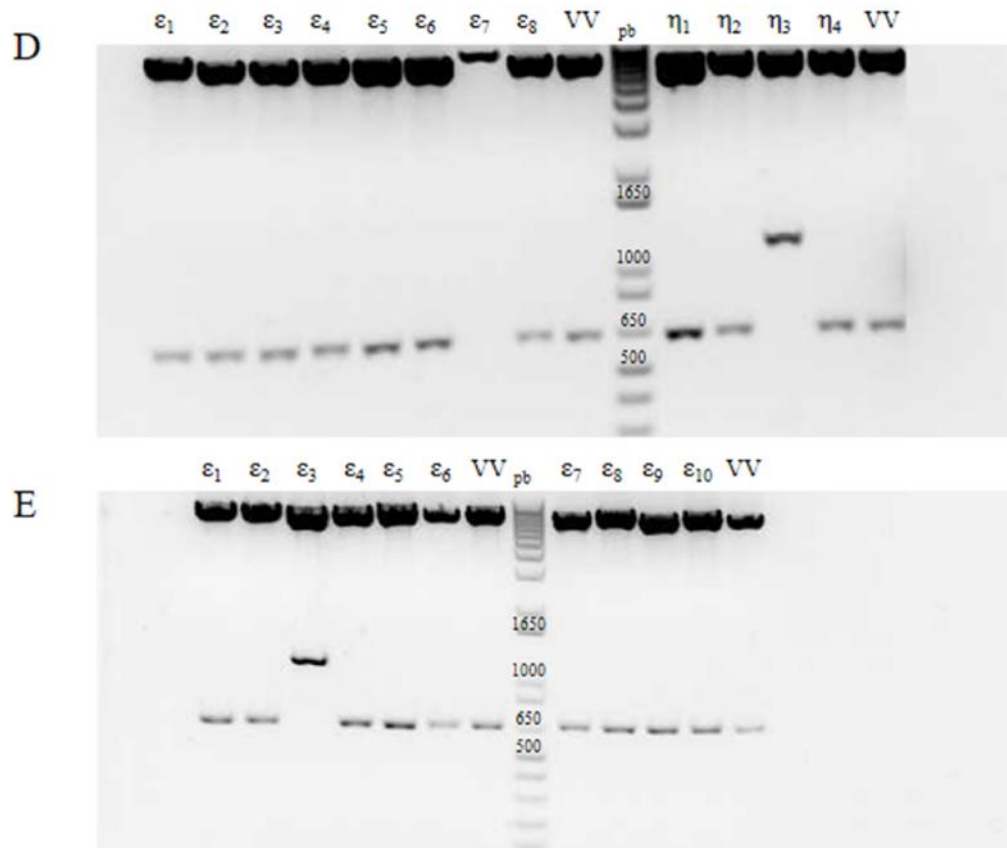
sub-celular de TAZ en comparación con las células no infectadas (**Figura 34**). Tanto el control de IgG normal de ratón como el control de incubación de las células sólo con el anticuerpo secundario, no presentaron señal.



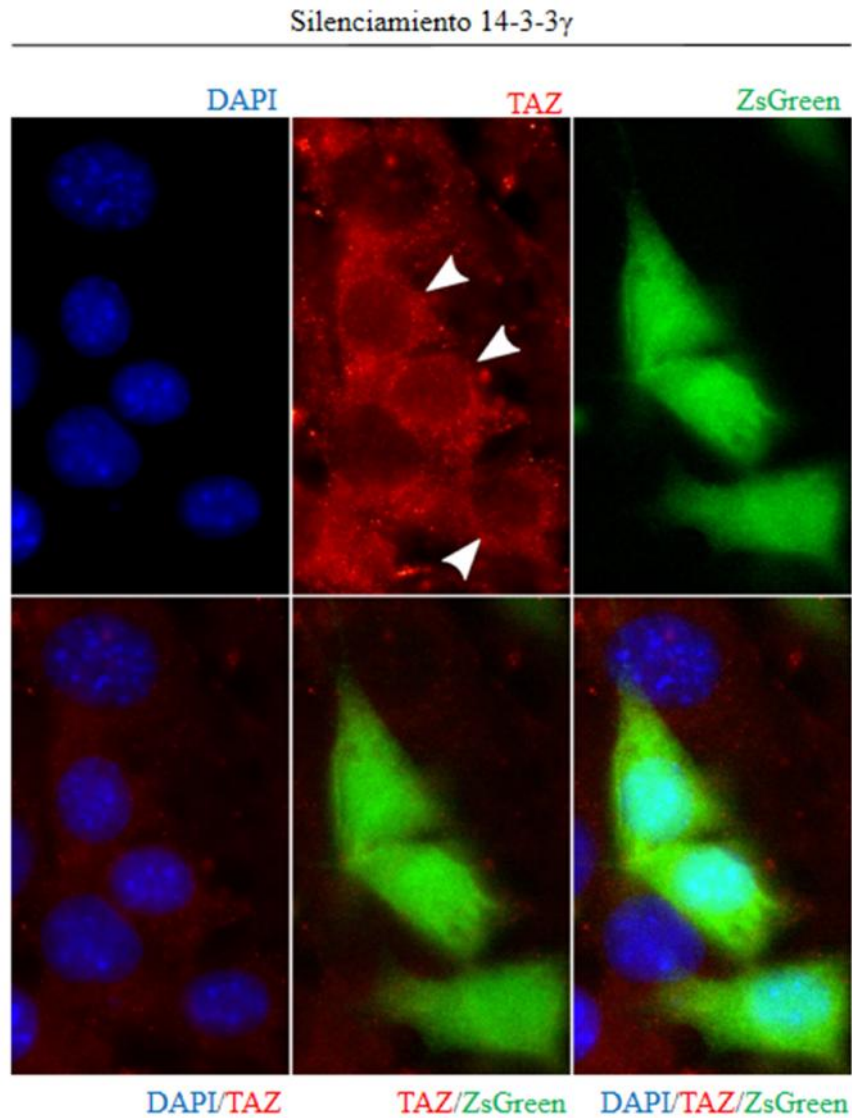
**Figura 31.** Evaluación del silenciamiento de cada *shRNAs* para la familia de proteínas 14-3-3. Ensayo de WB donde se sembraron iguales cantidades de extracto total de células 3T3-L1 en cada pocillo correspondiente al control sin transfectar (NT), al control sin ADN plasmídico, pero sí con el reactivo de transfección (M) y a aquel transfectado con el *shRNA* para un determinado parálogo. Se detectó la presencia de cada parálogo empleándose anticuerpos específicos para cada uno de ellos.



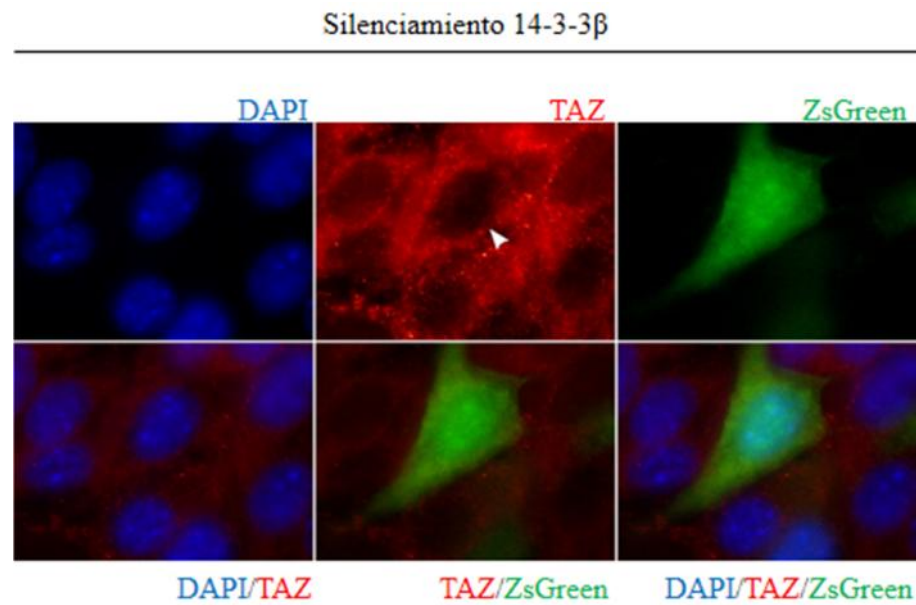




**Figura 32.** Sub-clonado de los *shRNAs* correspondiente a cada parólogo de 14-3-3 en el vector lentiviral *pHAGE2-FulleF1-ZsGreen-WPRE*. Electroforesis en gel de agarosa 0,80 % de muestras de ADN plasmídico, producto del sub-clonado de los *shRNAs* en el vector lentiviral para cada parólogo de la familia de proteínas 14-3-3, digeridas con las enzimas *Bam*HI y *Kpn*I al igual que el vector sin *shRNA* empleado como control de restricción (VV, vector vacío). A) Análisis de restricción de los clones correspondientes a los *shRNAs* para silenciar 14-3-3 , , , , y . B) Análisis de restricción de los clones correspondientes a 14-3-3 , y . C) Análisis de restricción de los clones correspondientes a 14-3-3 , y . D) Análisis de restricción de los clones correspondientes a 14-3-3 y . E) Análisis de restricción de los clones correspondientes a 14-3-3 .



**Figura 33.** Silenciamiento del parólogo 14-3-3 en células 3T3-L1. Imágenes de microscopía de fluorescencia en aumento 60X muestran: células 3T3-L1 que presentan en azul los núcleos marcados con DAPI, en verde la expresión de la proteína ZsGreen (que corresponde a las células infectadas con las partículas lentivirales) y en rojo el co-regulador transcripcional TAZ.



**Figura 34.** Silenciamiento del parólogo 14-3-3 en células 3T3-L1. Imágenes de microscopía de fluorescencia en aumento 60X muestran: células 3T3-L1 que presentan en azul los núcleos marcados con DAPI, en verde la expresión de la proteína ZsGreen (que corresponde a las células infectadas con las partículas lentivirales) y en rojo el co-regulador transcripcional TAZ.

## *Discusión*

Las MSCs se caracterizan por su capacidad de auto-renovación y de diferenciación a otras células del linaje mesenquimal, incluyendo adipocitos, osteoblastos, condrocitos y miocitos (Pittenger *et al.*, 1999). Esta característica relevante junto a su elevada capacidad proliferativa y capacidad de adherencia al plástico para formar colonias tipo fibroblastoides, han convertido a las MSCs en blanco deseable en el campo de la medicina regenerativa y la terapia celular. Como se ha mencionado al principio de este trabajo, las MSCs pueden ser extraídas de diversos tejidos tales como médula ósea, cordón umbilical, corazón, pulmón, placenta, pulpa dental y tejido adiposo, entre otros. En los últimos años la atención se ha enfocado en las MSCs aisladas de tejido adiposo, denominadas ASCs. Estas células tienen mayor capacidad de proliferación y diferenciación *in vitro* que las MSCs aisladas de médula ósea (Zhu *et al.*, 2008). Para su extracción se emplea un procedimiento simple, se selecciona tejido adiposo subcutáneo de fácil acceso, obteniéndose buenos rendimientos. Muy diferente del procedimiento empleado para la extracción de MSCs de médula ósea, en el cual el número de células obtenidas es bajo. Incluso el protocolo de aislamiento de MSCs a partir de tejido adiposo también es sencillo.

Dado que las MSCs han generado un gran interés debido a su uso potencial en medicina regenerativa y terapia de tejidos, durante los últimos 50 años se ha intentado avanzar en la comprensión de los mecanismos moleculares que gobiernan y regulan el proceso de diferenciación de las MSCs a los distintos linajes. Sin embargo, muchos aspectos importantes relacionados con la biología de estas células aún permanecen desconocidos.

La diferenciación a adipocitos es un proceso altamente controlado que ha sido extensamente estudiado en los últimos 25 años. En el año 2005, Hong y colaboradores demostraron que el balance de diferenciación adipogénica/osteogénica de MSCs está determinado por el co-regulador transcripcional TAZ y la familia de proteínas 14-3-3. Junto a su parólogo YAP, TAZ es uno de los principales efectores de la vía de señalización Hippo. Al activarse esta vía,

TAZ puede ser fosforilado en diferentes residuos de Ser/Thr. La fosforilación en el residuo Ser89 genera un sitio de unión a las proteínas 14-3-3 y esta unión retiene a TAZ en el citoplasma, impidiéndose su acción nuclear, es decir inhibiéndose la transcripción de sus genes blanco (Kanai *et al.*, 2000). En MSCs, el factor de transcripción Runx2 conduce la diferenciación a osteoblastos, y PPAR  $\alpha$  a adipocitos. TAZ co-activa la transcripción dependiente de Runx2 al mismo tiempo que co-reprime la dependiente de PPAR  $\alpha$ . Por lo tanto, la unión de TAZ a la familia de proteínas 14-3-3 induce los genes implicados en la adipogénesis y reprime aquellos implicados en la osteogénesis (Hong *et al.*, 2005). La familia de proteínas 14-3-3, en mamíferos, está compuesta por 7 parálogos denominados con las letras griegas  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\zeta$ ,  $\eta$ ,  $\theta$ , y  $\iota$  (Aitken, 2006). Si bien en un principio se consideraba que las diferentes parálogos eran redundantes, en los últimos años se han acumulado en la literatura estudios más detallados demostrando innumerables ejemplos de especificidad (Bustos, 2012, Sun *et al.*, 2009, Uhart y Bustos, 2013, Uhart y Bustos, 2016). En cuanto a la regulación antes mencionada, se desconoce cuál o cuáles de estos 7 parálogos se unen a TAZ fosforilado, como así también se desconocen los niveles relativos de cada una de ellos en células madre mesenquimales adultas antes y después de la diferenciación adipogénica y osteogénica.

En el presente trabajo se procedió a trabajar con tejido adiposo humano donado por pacientes de sexo femenino de edades comprendidas entre 25 y 65 años, sometidas a cirugías estéticas del tipo dermolipectomía. A partir de este tejido se procedió a aislar MSC, se obtuvo un rendimiento aproximado de  $1 \times 10^4$  células/g. El mismo se encuentra dentro del rango obtenido en aislamientos similares realizados por otros investigadores. Se han obtenido rendimientos comprendidos entre  $0.5 \times 10^4$  y  $2 \times 10^5$  células/g, variando estos valores de acuerdo al procedimiento de aislamiento utilizado y del paciente del que deriva la muestra (Baer y Geiger, 2012). Las mismas fueron expandidas (**Figura 16**) y caracterizadas, ya que el tejido adiposo incluye diversos tipos celulares además de las ASCs, como preadipocitos,

adipocitos, fibroblastos, células endoteliales y monocitos residentes, células de músculo liso o pericitos, linfocitos y macrófagos (Schäffler *et al.*, 2007). Sin embargo, la adherencia de estas células al plástico es la característica que permite separarlas físicamente de la mayoría de los tipos celulares mencionados. La caracterización se realizó por citometría, empleando un *kit* que contiene anticuerpos conjugados a múltiples fluoróforos, permitiendo el análisis simultáneo y rápido de un gran número de marcadores de superficie. Nuestros resultados mostraron del total de cultivos analizados, producto de aislamientos individuales de paciente único, un promedio igual a  $98,56 \pm 0,09$  % de células que expresaban CD90, CD73 y un promedio de  $1,48 \pm 0,09$  % de células que expresaban CD34, CD11b, CD19, CD45 y HLA-DR. En cuanto al marcador CD105 tuvimos dos tipos de resultados: los que consideramos positivos con promedio  $98,17 \pm 0,49$  y los que consideramos negativos con promedio  $1,75 \pm 0,35$  de células que lo expresaban (**Figura 17**). Se sabe que existen poblaciones de células madre mesenquimales que no expresan la proteína endoglina (CD105), pero aún no se conoce con certeza la causa de esta variación. Algunas publicaciones han demostrado que la expresión puede variar dependiendo del tipo de tejido del cual se extraen las células mesenquimales (médula ósea, tejido adiposo, cordón umbilical, placenta), el tiempo que las células permanecen en cultivo y que la ausencia del mismo puede afectar la capacidad de diferenciación (Jiang *et al.*, 2010, Jin *et al.*, 2009, Kern *et al.*, 2006). Dentro de los tipos celulares encontrados en el tejido adiposo, los fibroblastos son células adherentes al igual que las hASC, misma morfología fusiforme y expresan exactamente los mismos marcadores de superficie utilizados. Sin embargo, se sabe que las hASC difieren de los fibroblastos en su capacidad de formación de colonias y potencial de diferenciación (Alt *et al.*, 2011). Por ello es que en la actualidad aún se siguen utilizando los criterios mínimos establecidos por la IFATS y la ISCT (Bourin *et al.*, 2013) en la caracterización de ASCs. En nuestro laboratorio, en el contexto de otros proyectos de investigación, se induce la diferenciación de dichos

cultivos a osteoblastos y condrocitos, mientras que en este trabajo las células fueron diferenciadas a adipocitos, bajo condiciones determinadas de diferenciación, cumpliendo así con todos los requisitos mínimos de caracterización.

Se indujo la diferenciación adipogénica *in vitro* de las hASCs obtenidas. Dado que en la literatura encontramos diversos protocolos de diferenciación adipogénica, que incluyen diferentes combinaciones de drogas y distintas proporciones de ellas mismas, se optó por optimizar este *coktail* basándonos inicialmente en dichos trabajos. Para llevar a cabo esta optimización se eligió trabajar con una línea modelo de estudio de la adipogénesis que es la línea de preadipocitos de ratón 3T3-L1 (Green y Meuth, 1974). Los ensayos de diferenciación adipogénica se iniciaron con esta línea, en lugar de llevarse a cabo directamente empleando las hASCs, dado que las células 3T3-L1 poseen una rápida tasa de crecimiento (su tiempo de duplicación es de 18 h, <https://www.atcc.org/products/all/CL-173.aspx#characteristics>), fácil manipulación y relativamente corto tiempo de diferenciación a adipocitos (aproximadamente 7 días). Las hASCs, por el contrario, tardan más tiempo en crecer (su tiempo de duplicación es de 40 h, Lotfy *et al.*, 2014) y en diferenciarse (aproximadamente 14 días). Además, cabe mencionar que la disponibilidad de tejido durante el año no es constante, sino que hay épocas en las que el número de cirugías disminuye a tal punto de existir períodos en los cuales no se realizan aislamientos. Las drogas empleadas en estos ensayos fueron SFB, insulina, dexametasona, IBMX, rosiglitazona e indometacina. En los primeros ensayos, utilizándose la combinación SFB, insulina, IBMX, dexametasona e indometacina, el porcentaje de células diferenciadas, visualizadas por microscopía óptica luego de la tinción de las vacuolas lipídicas con ORO, no superó nunca el 50 % (**Figura 18**). Este porcentaje fue alcanzado cuando se empleó la mayor concentración de insulina (sin agregado de indometacina), y el tiempo final fue de 10 días. Luego se procedió a ensayar el agregado de rosiglitazona, agonista de PPAR , en lugar de indometacina en base a un trabajo



previo de Zebisch y colaboradores (Zebisch *et al.*, 2012). Se encontró que la mezcla de drogas que produjo una mayor acumulación de vacuolas contenía dexametasona 250 nM, IBMX 0,5 mM, rosiglitazona 2  $\mu$ M e insulina bovina 10  $\mu$ g/ml (**Figura 19**). El efecto adipogénico de las tiazolidinedionas (como la rosiglitazona) es bien conocido. Son ligandos de PPAR , y al unirse a este receptor son capaces de activar eventos críticos para la inducción de la diferenciación adipogénica (Spiegelman, 1998). Dicho resultado se correlacionó con lo demostrado por Wabitsch y colaboradores, siendo 2  $\mu$ M la concentración más eficiente (Wabitsch *et al.*, 2001). Los ensayos de diferenciación de células 3T3-L1 fueron finalizados por fijación de las células al cabo de 7 días, ya que a días posteriores, las vacuolas comenzaron a liberar su contenido (**Figura 20**), y la monocapa de células comenzó a levantarse desde la periferia del pocillo hacia el centro, hasta quedar por completo en suspensión. Los adipocitos en condiciones *in vitro* flotan sobre el medio (Zhang *et al.*, 2000). Para cada uno de los ensayos de diferenciación, en paralelo se realizó el control correspondiente al cual no se le agregó ninguna de las drogas mencionadas, únicamente medio DMEM con SFB (NT). Durante los primeras pruebas de los diferentes protocolos se observó que al crecer las células NT en presencia de medio completo (medio DMEM suplementado con SFB 10 % v/v) durante el total de días que duraba el ensayo, las mismas se diferenciaban espontáneamente, aunque en menor grado que las células tratadas. Se sabe que el SFB proporciona elementos básicos requeridos para el cultivo celular (Brunner *et al.*, 2010). Dada la presencia de estos componentes la tasa de proliferación de las células aumenta respecto de aquellas cultivadas en ausencia de ellos. A su vez el contacto célula-célula desencadena la activación de mecanismos que inducen marcadores de diferenciación adipogénica temprana (Tong *et al.*, 2001). Por lo tanto, para los siguientes experimentos de diferenciación empleando 3T3-L1, se disminuyó la cantidad de suero a 2,5 % v/v de manera tal de tener un crecimiento controlado de las células, evitándose que lleguen tan

tempranamente a confluencia y que se mantengan con el mínimo grado de diferenciación posible hasta el final del ensayo. Por ello la diferencia en el porcentaje de SFB usado en el control y en el diferenciado se considera parte del *coktail* de inducción junto al resto de las drogas empleadas. Durante la diferenciación de 3T3-L1 llevada a cabo en este trabajo, se observaron grupos de células diferenciadas dispersos entre células sin diferenciar (**Figura 21**). Nan y colaboradores observaron el mismo fenómeno previamente, posiblemente debido a la diferenciación por contacto intercelular (Nan *et al.*, 2003). En este trabajo se midieron los niveles de ARNm del gen marcador de adipogénesis FABP4 en células diferenciadas y sin diferenciar (NT) obteniéndose un aumento de 450 veces luego de 7 días de diferenciación en células diferenciadas respecto del control (**Figura 22**). La expresión de FABP4 se encuentra altamente inducida durante la diferenciación adipogénica y transcripcionalmente controlada por agonistas de PPAR , dexametasona e insulina (Cook *et al.*, 1988, Gojanovich *et al.*, 2016, Melki y Abumrad, 1993).

Se determinó la capacidad de la mezcla de diferenciación más efectiva para preadipocitos 3T3-L1 (denominada medio MDA), de inducir la diferenciación en las células hASCs. Tales células fueron diferenciadas durante el mismo período de tiempo. Sin embargo, no se observó el resultado alcanzado en la diferenciación de la línea de preadipocitos de ratón, siendo considerablemente menor el número de células que presentaban vacuolas lipídicas (**Figura 23A**). Era esperable que esto sucediera ya que la diferenciación adipogénica de las células madre incluye primero la fase de determinación, en la cual dichas células se convierten en preadipocitos, para luego continuar en la fase conocida como diferenciación terminal (fase que atraviesan por igual ambos tipos celulares) (Rosen y MacDougald, 2006). Dada la diferencia a partir de la fase en la cual comienzan las 3T3-L1 y hASCs su proceso de diferenciación, se evaluó extender el tiempo de finalización del ensayo a días 10 y 14. Se observó un aumento en el número de vacuolas, pero pese a esto, la cantidad de células que las

acumulaban eran pocas (**Figura 23A**). Entonces se evaluó emplear un medio de mantenimiento (post-inducción) que contuviera insulina a igual concentración que en el medio MDA, en contraste con el protocolo previo en el cual el medio de mantenimiento contenía DMEM **completo** sin insulina y se utilizaba después de la inducción hasta finalizar el ensayo. La unión de la insulina a su receptor desencadena cascadas de fosforilaciones (PI3K y MAPK) que activa la expresión de genes responsables de la diferenciación adipogénica y aumenta el transporte de glucosa del medio al interior celular, ya que promueve la translocación del transportador de glucosa GLUT-4 de compartimentos intracelulares a la membrana plasmática (Myers y White, 1996, McCarthy *et al.*, 2007). El porcentaje de células diferenciadas obtenido fue levemente mayor (**Figuras 23B y D**). Teniendo en cuenta que las hASCs pueden dar cualquier tipo celular derivado del linaje mesodérmico pensamos que la incorporación reiterada de drogas estimulantes de la adipogénesis al medio de cultivo favorecería el compromiso de la célula madre con el linaje adipocitario. Por ello se optimizó el protocolo agregando medio MDA de manera adicional al primer agregado, a los días 5 y 8 post-inducción, manteniendo el mismo durante 2 días, y realizando las tinciones con ORO a los días 7, 10 y 14 (**Figuras 23C y D**). Efectivamente, con la incorporación de la mezcla de drogas en más de una oportunidad se obtuvo un aumento del número de células diferenciadas. A nuestro saber ninguno de los protocolos de diferenciación de hASCs publicados utilizan agregados sucesivos de medio de diferenciación como el nuestro. Algunos de ellos consisten en tres días de inducción y posteriormente, el mantenimiento de las células con DMEM **completo** e insulina, o DMEM **completo** con insulina y sólo algunas de las drogas del *cocktail*, hasta el final del ensayo. En contraste con los resultados observados en 3T3-L1, la mayoría de las células de la monocapa habían al menos iniciado el proceso de diferenciación, encontrándose células con acumulación de vacuolas lipídicas distribuidas de manera homogénea en toda la superficie cultivada. Dichas

vacuolas fueron aumentando en número y tamaño a medida que los días transcurrían. Debido a que a día 14 las vacuolas presentes en las células poseían un alto contenido lipídico se optó por realizar todos los ensayos correspondientes para este trabajo a día final 10, para evitar la interferencia que los lípidos pudieran ocasionar en las técnicas utilizadas.

Dados los resultados previos en 3T3-L1, el control de diferenciación adipogénica (NT) correspondiente a los ensayos de diferenciación de hASCs, fue cultivado bajo tres condiciones diferentes de suero: 2,5; 5 y 10 % v/v. Se eligió la concentración intermedia en la cual la viabilidad celular no se vio disminuida y en la que el porcentaje de diferenciación resultó ser despreciable.

La familia de proteínas 14-3-3 es reguladora de diversos procesos celulares mediados por fosforilaciones. Entre las diversas proteínas que afectan la adipogénesis, Lipin1 y TAZ comparten el modo de regulación de su localización sub-celular a través de su retención en el citoplasma por fosforilación y unión a las proteínas reguladoras 14-3-3 (Kanai *et al.*, 2000, Péterfy *et al.*, 2010). En este trabajo nos enfocamos en el análisis de los niveles de ARNm y de proteínas de la familia 14-3-3 en la diferenciación adipogénica de hASCs. Dado que la línea de investigación del laboratorio que abarca la comprensión de los mecanismos moleculares que regulan la biología de las MSCs se inició con el desarrollo del presente trabajo, fue necesaria la optimización del trabajo con hASCs. Por ello en primera medida se determinaron los niveles antes mencionados en células 3T3-L1, para luego realizar los experimentos con mayor facilidad en hASCs, que si bien las células madre son fácilmente cultivables, son más frágiles, más difíciles de obtener y crecen más lento que una línea celular como lo son las 3T3-L1. Nuestros resultados demostraron que 14-3-3 y 14-3-3 fueron los parálogos que presentaron mayores cambios, tanto en los niveles de ARNm como de proteína, durante la diferenciación a adipocitos de células 3T3-L1 (**Figuras 24**). Sus mayores niveles podrían deberse a la presencia de sitios de unión de factores de transcripción

relacionados con la adipogénesis en sus regiones promotoras. Como se desarrolló en la sección 1.2 de la introducción, PPAR y la familia de factores C/EBP son los encargados claves de la inducción de genes implicados en la diferenciación adipogénica. Ambos parálogos de 14-3-3 son los únicos que presentan una combinación de sitios de unión en sus regiones promotoras que incluyen los dos tipos de factores de transcripción antes mencionados (Gojanovich *et al.*, 2016). Esto podría explicar los altos niveles relativos de ARNm de 14-3-3 y . El hecho de que 14-3-3 tuviera niveles superiores a los de 14-3-3 bajo inducción adipogénica se explicaría en base a que su promotor presenta dos sitios de unión para C/EBP (Gojanovich *et al.*, 2016). Notablemente, el tejido adiposo humano es, después del cerebro, el segundo en expresión relativa de 14-3-3 , mientras que con respecto a la abundancia relativa de otros parálogos este tejido ocupa el quinto puesto o más (Aghazadeh y Papadopoulos, 2016). En relación a 14-3-3 , previamente Yang y colaboradores habían demostrado que células 3T3-L1 presentaban un máximo de nivel de ARNm a día 8 (células completamente diferenciadas) y el nivel de proteína alcanzaba una meseta a día 4 después de la inducción adipogénica. De hecho, 14-3-3 ha sido recientemente identificada como una proteína de interacción con seipina, proteína de la membrana del ER, importante regulador en el desarrollo del adipocito. Seipina regula la homeostasis lipídica al prevenir la formación de vacuolas lipídicas en células que no son adipocitos, pero promueve dicho proceso en la adipogénesis. Yang y colaboradores propusieron un modelo en el cual 14-3-3 es reclutada por seipina luego de la detección de altos niveles de lípidos en la célula. 14-3-3 traduce la señal lipídica guiada por seipina desde el ER al citoplasma, dirigiendo la reorganización del citoesqueleto mediado por cofilina-1, la cual es necesaria para la diferenciación de los preadipocitos (Yang *et al.*, 2014). Teniendo en cuenta toda esta información y los resultados previos obtenidos en 3T3-L1, decidimos enfocarnos únicamente en los parálogos 14-3-3 y y evaluar los niveles de ARNm y de proteína de ambos en la

diferenciación adipogénica de células hASCs. En estas células 14-3-3 presentó aumento durante la diferenciación en los niveles de ARNm y en los de proteína, detectados tanto por WB como por IFI (**Figuras 25 y 26**). En cambio los niveles de ARNm de 14-3-3 aumentaron levemente, y por el contrario los de proteína disminuyeron (**Figura 25**). Esto fue observado por WB, aunque el ensayo de IFI reveló la constancia de los niveles proteicos de 14-3-3 durante la diferenciación (**Figura 27**). Esta discrepancia en los niveles de proteína de 14-3-3 obtenidos en la diferenciación de 3T3-L1 y hASCs podría deberse al estadio de diferenciación en el cual se encontraban dichos tipos celulares al momento de finalizar el ensayo y realizar la detección. Como mencionamos antes, las células 3T3-L1 ya son preadipocitos y solo deben atravesar la fase de diferenciación terminal para convertirse en adipocitos, mientras que las células hASC deben primero convertirse en preadipocito y luego transitar la conversión a adipocitos. Haciendo referencia al trabajo de Yang y colaboradores donde muestran que el nivel de proteína de 14-3-3 alcanza una meseta a día 4 de diferenciación en células 3T3-L1 (Yang *et al.*, 2014), tal vez en hASCs ese nivel se alcance a días mayores que día 10. La otra posibilidad es que en hASC los niveles proteicos de 14-3-3 no se incrementen durante la diferenciación, y que existan diferencias en ratón y humano respecto a la expresión de este parálogo. Esto podría ser factible, dadas las citadas diferencias entre estas especies en cuanto a los roles de TAZ y su parálogo YAP. En cuanto a la discrepancia encontrada en los resultados de WB e IFI en la expresión relativa de 14-3-3, si bien ambas técnicas involucran la detección de la proteína de interés por el mismo anticuerpo, la primera da resultados promedio a nivel poblacional, es decir la banda observada corresponde a la expresión promedio de la proteína en 60000 células. En contraste en la técnica IFI se tomaron 10 imágenes de aproximadamente una decena de células en cada una, por lo que la cuantificación corresponde a la expresión en promedio de menos de un centenar de células. Los resultados obtenidos en referencia a los niveles de proteína de 14-3-

3 indicaron un aumento de 5 veces por WB mientras que por IFI un aumento de intensidad de fluorescencia de aproximadamente 4 veces. Esto nos confirma la idea que posiblemente 14-3-3 tenga una participación relevante en el proceso de adipogénesis.

Recientemente, Park y colaboradores reportaron que 14-3-3 y regulan diferencialmente la actividad transcripcional del receptor PPAR 2 en células de cultivo primario de hepatocitos de ratón y células HepG2. Aunque 14-3-3 y competitivamente interactúan con el mismo residuo de serina de PPAR 2, 14-3-3 incrementa la actividad transcripcional de PPAR 2 mientras que 14-3-3 la disminuye (Park *et al.*, 2015). En el presente trabajo se observó que en células 3T3-L1 diferenciadas a adipocitos, tanto 14-3-3 como incrementan sus niveles (**Figura 24**), sugiriendo que 14-3-3 podría, como seipina, tener roles opuestos en el metabolismo de lípidos de células sin diferenciar y células diferenciadas a adipocitos (Yang *et al.*, 2014), o su expresión podría ser regulada río arriba como parte de un mecanismo de retroalimentación negativa.

A nuestro conocimiento, no hay reportes sobre el rol en el metabolismo de lípidos de 14-3-3 y . Nuestros resultados mostraron aumento de los niveles de ARNm y proteína de 14-3-3 , y una disminución de los niveles de proteína de 14-3-3 , en células 3T3-L1 (**Figura 24**). Esto sugiere que ambos podrían probablemente tener roles regulatorios opuestos en el proceso de diferenciación.

Después de la diferenciación adipogénica de células 3T3-L1, no observamos cambios en los niveles de ARNm y proteína de 14-3-3 . De hecho está reportado en la literatura, que el gen que codifica para 14-3-3 (YWHAZ) fue identificado como un gen poco variable apto para la normalización en ensayos de qPCR de experimentos de diferenciación adipogénica, osteogénica y condrogénica de MSCs. La región promotora de 14-3-3 , a diferencia de sus parálogos 14-3-3 y , no presenta sitios de unión para ninguno de los tipos de factores de

transcripción que son críticos en el programa de transcripción adipogénico (C/EBPs y PPAR ), lo cual podría ser la causa de sus niveles de ARNm constantes en células diferenciadas (Gojanovich *et al.*, 2016). 14-3-3 fue el único parálogo que no se pudo detectar en células 3T3-L1, tanto antes como después de la diferenciación, por lo que no fue sorprendente encontrar que es el único parálogo de la familia 14-3-3 que no contiene en su región promotora sitios de unión para la mayoría de los factores de transcripción implicados en la adipogénesis (Gojanovich *et al.*, 2016). Estos resultados eran esperables ya que se conoce que este parálogo se expresa específicamente en células epiteliales (Moreira *et al.*, 2008).

El hecho que siete parálogos de 14-3-3 hayan sido retenidos evolutivamente en todas las especies de mamíferos es un tema intrigante que ha llevado a numerosas investigaciones por años en el campo de la familia de proteínas 14-3-3 (Uhart y Bustos, 2013). En nuestro laboratorio previamente se encontró, mediante estudios bioinformáticos, que las redes de interacción proteína-proteína de los parálogos de 14-3-3 son estadísticamente diferentes. Entre otras diferencias, ciertos dominios están sobre-representados en las proteínas de unión a 14-3-3 de un parálogo específico, pero ausente en otros. Tal es el caso del dominio del receptor de la lipoproteína de baja densidad LDLR (acrónimo inglés de *Low density Lipoprotein Receptor*), el cual se encuentra enriquecido específica y exclusivamente en la red de interacción de 14-3-3 (Uhart y Bustos, 2013). En efecto, Skogsberg y colaboradores mostraron que la unión de la proteína apoB100-LDL a adipocitos, vía el receptor de LDL, inhibe la lipólisis intracelular inducida por noradrenalina en dichas células (Skogsberg, 2008). Aunque la relación entre 14-3-3 y el LDLR aún permanece desconocida, la regulación específica de 14-3-3 durante la diferenciación adipogénica podría sugerir que este parálogo, cuya red de interacción está específicamente enriquecida en dominios LDLR, tenga un rol en la adipogénesis mediado por este receptor.



Nuestros resultados sugieren que 14-3-3 y son los parálogos que podrían estar regulando la diferenciación adipogénica: existe la posibilidad que uno de los mecanismos involucrados en esta regulación sea la interacción de estos parálogos con TAZ, ya que la unión de TAZ a la familia de proteínas 14-3-3 induce los genes implicados en la adipogénesis y reprime aquellos implicados en la osteogénesis (Hong *et al.*, 2005). Para poder aproximarnos a esta hipótesis, se llevaron a cabo ensayos de silenciamiento mediante la utilización de partículas lentivirales con *shRNAs* para cada uno de estos parálogos. En el marco de este trabajo se realizaron todos los clonados de los *shRNAs* para el silenciamiento de cada uno de los 7 parálogos de 14-3-3 en los vectores lentivirales y posterior producción de los virus. Los silenciamientos fueron llevados a cabo únicamente en células 3T3-L1, dado que la infección de células hASCs con los lentivirus resultó en la muerte de un gran número de ellas y muy pocas células infectadas, que además presentaban cambios abruptos en la morfología. A su vez, en esas células 3T3-L1 silenciadas se llevó a cabo una IFI empleándose un anticuerpo que reconoce TAZ, para determinar la localización sub-celular de dicho co-regulador transcripcional luego del silenciamiento. Se pudo observar tras el silenciamiento de 14-3-3 que aquellas células donde la infección había tenido lugar (verificado por fluorescencia verde), presentaban una localización de TAZ nuclear. En contraste en células vecinas que no habían resultado infectadas, se observó una localización de TAZ principalmente citoplasmática, presentando muy poca señal en el núcleo (**Figura 33**). Para llevar a cabo la infección, las células fueron cultivadas en un alto porcentaje de confluencia. Se sabe que *in vitro* la densidad del cultivo afecta la localización sub-celular de TAZ (**Figura 30**). A una alta densidad celular la vía Hippo se activa y se fosforila TAZ en Ser89 y Ser311, por lo cual se inhibe la actividad nuclear de TAZ ya que se promueve su localización citoplasmática y degradación por el proteasoma (Hong *et al.*, 2005). Por el contrario, a raíz del silenciamiento de 14-3-3 no se obtuvo el mismo resultado mencionado anteriormente, la señal observada

fue principalmente citoplasmática al igual que las células vecinas que no habían resultado infectadas (**Figura 34**). Nuestros resultados sugieren que el parólogo de 14-3-3 podría estar regulando TAZ, ya que la ausencia del mismo produjo un aumento de TAZ nuclear. 14-3-3 podría ser el parólogo de 14-3-3 que interaccionaría con TAZ fosforilado, impidiendo así su translocación al núcleo y permitiendo que la célula se diferencie a adipocito. A partir de nuestros resultados no podemos determinar si en esta interacción el parólogo de 14-3-3 actúa en forma de homodímero o heterodímero. Se sabe que las proteínas 14-3-3 pueden formar homo o heterodímeros entre sus diferentes parálogos (Wilker *et al.*, 2005). En cuanto 14-3-3, posiblemente esté involucrada en la regulación del proceso de diferenciación a través de otra proteína y no mediante TAZ.

Durante este proyecto se llevó a cabo la producción de un anticuerpo policlonal que reconoce TAZ tanto endógena como recombinante, en estado nativo como desnaturalizado. Al analizar por SDS-PAGE extractos totales de células 3T3-L1 y HEK293T se pudieron detectar dos únicas bandas por WB, una correspondiente a la masa molecular de TAZ y otra, de menor intensidad, a la masa de YAP (**Figuras 29B y C**). Mediante la técnica de IFI sobre células hASCs, utilizando este anticuerpo se pudo detectar TAZ. Se observó una localización predominantemente nuclear al estar crecidas las células en baja confluencia, una localización más bien citoplasmática al existir contacto célula-célula y una localización citoplasmática con disminución de la señal, al crecer las células a 100 % de confluencia (**Figura 30**). Dicho comportamiento, producto de la variación de la confluencia celular, corresponde a TAZ (Hong *et al.*, 2005), por lo que el anticuerpo producido reconoce a TAZ también en estado nativo. Cabe mencionar que el parólogo de TAZ, la proteína YAP, posee el mismo comportamiento ante diferencias en la confluencia. Por lo tanto en este ensayo de IFI se estaría además detectando YAP en estado nativo, aunque en una menor proporción, a raíz de lo observado en el WB.

No solo la interacción de TAZ con determinados parálogos de 14-3-3 aporta información a la regulación del proceso de diferenciación de MSCs, sino también contribuye al avance de la investigación de otros mecanismos en los cuales TAZ se encuentra involucrado. Se sabe que una des-regulación de TAZ está asociada al desarrollo de determinados tumores, como por ejemplo cáncer de mama, y que su inhibición reduce la generación de tumores (Ramos y Camargo., 2012). Por ello la atención se enfoca en TAZ como posible blanco para diagnóstico, pronóstico y terapias de distintos cánceres (Zhou *et al.*, 2011), aún cáncer de mamas resistente a drogas en estados avanzados (Lai *et al.*, 2011). TAZ además se encuentra involucrado en la proliferación, migración celular y transición epitelio-mesénquima (Zhang *et al.*, 2009) por su unión a la familia de factores de transcripción TEADs.

Existe mucha información en la literatura sobre la vía Hippo y sus efectores, TAZ y YAP, pero se sabe poco acerca de la manera en que 14-3-3 la regula. Además, dado que los 7 parálogos de 14-3-3 son muy parecidos entre sí en la mayoría de los trabajos no los distinguen, los tratan a todos por igual, cuando podemos demostrar una vez más evidencias experimentales que demuestran su especificidad y función independiente. Se piensa que la vía Hippo probablemente esté regulada en más de un punto por parálogos específicos de la familia de proteínas 14-3-3, por ello en el laboratorio se están iniciando otros proyectos que abarcan el estudio de esos puntos de regulación.

*Conclusiones*

El presente trabajo contribuye al conocimiento del proceso de diferenciación adipogénica en células MSCs como así también en la línea celular modelo de adipogénesis 3T3-L1, a través del estudio de la regulación de la localización sub-celular de uno de los efectores de la vía Hippo, el co-regulador transcripcional TAZ, por la familia de proteínas 14-3-3.

Se observaron variaciones de la familia de proteínas 14-3-3 durante la adipogénesis de células hASCs y 3T3-L1. Las mismas se produjeron tanto a nivel del ARNm como de la proteína, siendo específica para los parálogos 14-3-3 , , y . En particular podemos decir que 14-3-3 fue el parálogo que más variación presentó (correspondiéndose esta variación a un incremento de dichos niveles) tanto en hASCs como en la línea celular 3T3-L1. Ya que esta variación fue a nivel del ARNm y de la proteína, y considerando que la secuencia de su región promotora presenta sitios de unión para los principales factores de transcripción que inducen la adipogénesis, PPAR y la familia de factores C/EBP, podemos decir que la expresión de 14-3-3 estaría siendo específicamente inducida durante la diferenciación de células MSCs y 3T3-L1. Por el contrario 14-3-3 mostró diferencias en la variación entre ambos tipos celulares. Tras el silenciamiento de 14-3-3 y los resultados sugerirían que el parálogo regularía la localización sub-celular de TAZ, mientras que no. En base a lo mencionado, podríamos decir que 14-3-3 sería aquel parálogo que al unirse a TAZ regularía el proceso de diferenciación adipogénica en MSCs.

Hasta donde sabemos, este es el primer estudio que analiza el proceso de diferenciación y la familia de proteínas 14-3-3 de manera completa, tanto en los niveles de ARNm como de proteína, antes y durante el proceso de adipogénesis. Nuestro análisis apoya el concepto actualmente creciente de funciones moleculares específicas para los diferentes parálogos de 14-3-3. Además aporta información de suma importancia en el proceso de diferenciación adipogénica de MSCs, no solo por su indudable interés científico, sino también porque el monitoreo y control de la diferenciación es un requerimiento clínico crucial.

*Resumen*

Las MSCs (acrónimo inglés de mesenchymal stem cells) se caracterizan por su capacidad de auto-renovación y de diferenciación a otras células del linaje mesenquimal, incluyendo adipocitos, osteoblastos, condrocitos y miocitos. Esta característica relevante junto a su elevada capacidad proliferativa y capacidad de adherencia al plástico para formar colonias tipo fibroblastoides, han convertido a las MSCs en un blanco interesante en el campo de la medicina regenerativa y la terapia celular. Las MSCs pueden ser extraídas de diversos tejidos tales como médula ósea, cordón umbilical, corazón, pulmón, placenta, pulpa dental y tejido adiposo, entre otros. En los últimos años la atención se ha enfocado en las MSCs aisladas de tejido adiposo, denominadas ASCs (acrónimo inglés de adipose stem cells). Estas células tienen mayor capacidad de proliferación y diferenciación in vitro que las MSCs aisladas de médula ósea. El proceso por el cual las células madre se convierten en adipocitos se denomina adipogénesis. El balance de diferenciación adipogénica/osteogénica en MSCs está determinado por el co-regulador transcripcional TAZ (acrónimo inglés de Transcriptional co activator with PDZ binding motif) y la familia de proteínas 14-3-3. Al activarse esta vía, TAZ puede ser fosforilado en diferentes residuos de Ser/Thr. La fosforilación en el residuo Ser 89 genera un sitio de unión a las proteínas reguladoras 14-3-3 y esta unión retiene a TAZ en el citoplasma, impidiéndose su acción nuclear, es decir inhibiéndose la transcripción de sus genes blanco. En MSCs, el factor de transcripción Runx2 (acrónimo inglés de Runt related transcription factor 2) conduce la diferenciación a osteoblastos, y PPAR (acrónimo inglés de Peroxisome proliferator activated receptor ) a adipocitos. TAZ co activa la transcripción dependiente de Runx2 al mismo tiempo que co reprime la dependiente de PPAR . Por lo tanto, la unión de TAZ a la familia de proteínas 14-3-3 en el citoplasma impide la activación transcripcional de genes implicados en la osteogénesis y a su vez evita la represión de genes implicados en la adipogénesis (que por ende se expresan). La familia de proteínas 14-3-3, en mamíferos, está compuesta por 7 parálogos denominados con las letras

griegas , , , , , y . Estas proteínas tienen un rol central en la señalización celular mediada por fosforilación, ya que se unen específicamente a residuos fosforilados en residuos de Ser/Thr en sus proteínas blanco, afectando por ej., su localización sub-celular y/o su actividad. Nuestra hipótesis fue que la interacción con TAZ es específica de un o algunos parálogo/s de 14-3-3. Nos focalizamos en el estudio de la especificidad de la familia de proteínas 14-3-3 en la regulación de la localización sub-celular de la proteína TAZ. Se observaron variaciones en los niveles de los parálogos de 14-3-3, tanto a nivel del ARNm como de la proteína, durante la adipogénesis de células hASCs y 3T3-L1, siendo específica para los parálogos 14-3-3 , , y . El parálogo más variable fue 14-3-3 (correspondiéndose esta variación a un incremento de dichos niveles) en ambos tipos celulares. Ya que esta variación fue a nivel del ARNm y de la proteína, y considerando además que la secuencia de su región promotora presenta sitios de unión para los principales factores de transcripción que inducen la adipogénesis, PPAR y la familia de factores C/EBP, podemos decir que 14-3-3 estaría siendo inducida durante la diferenciación adipogénica de células MSCs y 3T3-L1. 14-3-3 mostró diferencias (entre ambos tipos celulares) en la variación de sus niveles, que fueron menos pronunciados que los del parálogo , especialmente a nivel proteico. Tras el silenciamiento de 14-3-3 y los resultados sugerirían que 14-3-3 podría ser responsable de la regulación sub-celular de TAZ, ya que en células infectadas con el shRNA para silenciar se observó un incremento de TAZ nuclear. 14-3-3 posiblemente estaría regulando la diferenciación adipogénica a través de su unión a otra proteína, dado que TAZ permaneció principalmente en el citoplasma tras el silenciamiento, sin mostrar señal nuclear. En el marco de este trabajo se desarrollaron distintos tipos de herramientas moleculares como el clonado de los shRNAs para cada parálogo de 14-3-3 en el vector lentiviral, la producción de las partículas virales conteniendo dichas construcciones y la producción de un anticuerpo policlonal contra la proteína TAZ. Dichas herramientas no



sólo contribuyeron al presente trabajo sino también serán de suma utilidad en proyectos futuros en nuestro laboratorio. En base a lo mencionado, podríamos decir que 14-3-3 , cuya expresión se induce durante la adipogénesis, facilitaría dicho proceso a través de la retención citoplasmática de TAZ. El presente trabajo contribuye al conocimiento del proceso de diferenciación adipogénica en células MSCs, particularmente en ASCs, como así también en la línea modelo de adipogénesis 3T3-L1. Esta es muy utilizada por su rápida tasa de crecimiento, fácil manipulación y relativamente corto tiempo de diferenciación a adipocitos. Hasta donde sabemos, este es el primer estudio que analiza el proceso de diferenciación adipogénica con respecto a la especificidad de la familia de proteínas 14-3-3 de manera exhaustiva, tanto en los niveles de ARNm como de proteína. Nuestro análisis apoya el concepto actualmente creciente de funciones moleculares específicas para los diferentes parálogos de 14-3-3. Además aporta información de suma relevancia en el proceso de diferenciación adipogénica de MSCs, ya que el control de la diferenciación es un requerimiento crucial en potenciales aplicaciones clínicas.

*Referencias  
Bibliográficas*

1. Aghazadeh, Y. y Papadopoulos, V. *Drug Discov Today*. **21**: 278-287 (2016)
2. Aitken, A. *Semin Cancer Biol*. **16**: 162-172 (2006)
3. Alt, E. *et al. Biol Cell*. **103**: 197-208 (2011)
4. Angry, P.O. *et al. Mol Cell Proteomics*. **5**: 2211-2227 (2006)
5. Axelrod, H. R. *Dev Biol*. **101**: 225-228 (1984)
6. Baer, P. C. y Geiger, H. *Stem Cells Int*. **2012**: 812693 (2012)
7. Basu, S. *et al. Mol Cell*. **11**: 11-23 (2003)
8. Beltrami, A. P. *et al. Cell*. **114**: 763-776 (2003)
9. Boström, P. *et al. Arterioscler Thromb Vasc Biol*. **25**: 1945-1951 (2005)
10. Bourin, P. *et al. Cytotherapy*. **15**: 641-648 (2013)
11. Brasaemle, D. L. y Wolins, N. E. *J Biol Chem*. **287**: 2273-2279 (2012)
12. Bridges, D. y Moorhead, G. B. *Sci STKE*. **2005**: re10 (2005)
13. Bruder, S.P. *et al. J Cell Biochem*. **64**: 278 (1997)
14. Brunner, D. *et al. ALTEX*. **27**: 53-62 (2010)
15. Bustos, D. M. *Mol Biosyst*. **8**: 178-184 (2012)
16. Cao, Z. *et al. Genes Dev*. **5**: 1538-1552 (1991)
17. Castro-Malaespina, H. *et al. Blood*. **56**: 289-301 (1980)
18. Chen, L. *et al. Genes Dev*. **24**: 290-300 (2010)
19. Chen, Q. *et al. Cell Death Differ*. **23**: 1128-1139 (2016)
20. Cook, J. S. *et al. Proc Natl Acad Sci U S A*. **85**: 2949-2953 (1988)
21. Desvergne, B. y Wahli, W. *Endocr Rev*. **20**: 649-688 (1999)
22. D'Ippolito, G. *et al. J Bone Miner Res*. **14**: 1115-1122 (1999)
23. Dull, T. *et al. J Virol*. **72**: 8463-8471 (1998)
24. Dupont, S. *et al. Nature*. **474**: 179-183 (2011)
25. Evans, M. J. y Kaufman, M. H. *Nature*. **292**: 154-156 (1981)

26. Fink, T. *et al. BMC Mol Biol.* **9**: 98 (2008)
27. Friedenstein, A. J. *et al. J Embryol Exp Morphol.* **16**: 381-390 (1966)
28. Gesta, S. *et al. Cell.* **131**: 242-256 (2007)
29. Giulak, F. *et al. Biorheology.* **41**: 389-399 (2004)
30. Gojanovich, A. D. *et al. Biochem Biophys Rep.* **7**: 106-112 (2016)
31. Graves, J. D. *et al. EMBO J.* **17**: 2224–2234 (1988)
32. Green, H. y Meuth, M. *Cell.* **3**: 127-133 (1974)
33. Gregoire, F. M. *et al. Physiol Rev.* **78**: 783-809 (1998)
34. Griffiths, M. J. *et al. Lancet.* **366**: 249-260 (2005)
35. Gronthos, S. *et al. Proc Natl Acad Sci U S A.* **97**: 13625-13630 (2000)
36. Hiemer, S. E. y Varelas, X. *Biochim Biophys Acta.* **1830**: 2323-2334 (2013)
37. Hong, J.H. *et al. Science.* **309**: 1074-1078 (2005)
38. Hori, T. *et al. Oncogene.* **19**: 3101-3109 (2000)
39. Hossain, Z. *et al. Proc Natl Acad Sci U S A.* **104**: 1631-1636 (2007)
40. In 't Anker, P. S. *et al. Stem Cells.* **22**: 1338-1345 (2004)
41. James, A. W. *Scientifica.* 2013: 1-17 (2013)
42. Jiang, T. *et al. Biomaterials.* **31**: 3564-3571 (2010)
43. Jin, H. J. *et al. Biochem Biophys Res Commun.* **381**: 676-681 (2009)
44. Justice, R. W. *et al. Genes Dev.* **9**: 534-546 (1995)
45. Kanai, F. *et al. EMBO J.* **19**: 6778-6791 (2000)
46. Kern, S. *et al. Stem Cells.* **24**: 1294-301 (2006)
47. Kessler, R. J. y Fanestil, D. D. *Anal Biochem.* **159**: 138-142 (1986)
48. Kim, N. G. *et al. Proc Natl Acad Sci U S A.* **108**: 11930-11935 (2011)
49. Krahmer, N. *et al. EMBO Mol Med.* **5**: 973-983 (2013)
50. Lai, D. *et al. Cancer Res.* **71**: 2728-2738 (2011)

51. Lai, Z. C. *et al. Cell.* **120**: 675-685 (2005)
52. Lee, K. K. *et al. J Biol Chem.* **276**: 19276-19285 (2001)
53. Lei, L. *et al. Sci China C Life Sci.* **50**: 320-328 (2007)
54. Lei, Q.Y. *et al. Mol Cell Biol.* **28**: 2426-2436 (2008)
55. Lian, Q. *et al. Thromb Haemost.* **104**: 39-44 (2010)
56. Liu A.H. *et al. J Allergy Clin Immunol.* **126**: 798-806 (2010)
57. Liu, C. *et al. Int J Biochem Mol Biol.* **2**: 247-256 (2011)
58. Lotfy, A. *et al. Int J Stem Cells.* **7**: 135-142 (2014)
59. Martin, H. *et al. J Neurochem.* **63**: 2259-2265 (1994)
60. Martin, S. y Parton, R. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **7**: 373-378 (2006)
61. Martini, C. N. *et al. Mol Cell Endocrinol.* **298**: 42-47 (2009)
62. McCarthy, A. M. y Elmendorf, J. S. *Indian J Med Res.* **125**: 373-388 (2007)
63. McConnell, J. E. *et al. Dev Biol.* **169**: 218-228 (1995)
64. McElreavey, K. D. *et al. Biochem Soc Trans.* **19**: 29S-29S (1991)
65. Melki, S. A. y Abumrad, N. A. *J Lipid Res.* **34**: 1527-1534 (1993)
66. Moreira, J. M. *et al. Mol Cell Proteomics.* **7**: 1225-1240 (2008)
67. Morin-Kensicki, E.M., *et al. Mol Cell Biol.* **26**: 77-87 (2006)
68. Morrison, D. K. *Trends Cell Biol.* **19**: 16-23 (2009)
69. Moseti, D. *et al. Int J Mol Sci.* **17**: 120-124 (2016)
70. Myers, M. G. y White, M. F. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* **36**: 615-658 (1996)
71. Nan, X. *et al. J Lipid Res.* **44**(11): 2202-2208 (2003)
72. Nellist, M. *et al. Biochem Soc Trans.* **31**: 587-591 (2003)
73. Paddison, P. J. *et al. Nat Methods.* **1**: 163-167 (2004)
74. Pal, P. *et al. Mol Cell Biochem.* **376**: 81-93 (2013)
75. Pantalacci, S. *et al. Nat Cell Biol.* **5**: 921-927 (2003)

76. Park, S. *et al. Biochim Biophys Acta.* **1849**: 1237-1247 (2015)
77. Perego, L. y Berruti, G. *Mol Reprod Dev.* **47**: 370-379 (1997)
78. Péterfy, M. *et al. J Biol Chem.* **285**: 3857-3864 (2010)
79. Pfaffl, M. W. *Nucleic Acids Res.* **29**: e45 (2001)
80. Piccolo, S. *et al. Physiol Rev.* **94**: 1287-1312 (2014)
81. Pittenger, M. F. *et al. Science.* **284**: 143-147 (1999)
82. Qin, H. *et al. Hum Mol Genet.* **21**: 2054-2067 (2012)
83. Ramírez-Zacarías, J. *et al. Histochemistry.* **97**: 493-497 (1992)
84. Ramos y Camargo. *Trends Cell Biol.* **22**: 339-346 (2012)
85. Reubinoff, B.E. *et al. Nat Biotechnol.* **18**: 399-404 (2000)
86. Rosen, E. D. *et al. Genes Dev.* **14**: 1293-1307 (2000)
87. Rosen, E. D. *et al. Genes Dev.* **16**: 22-26 (2002)
88. Rosen, E. D. y MacDougald, O. A. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **7**: 885-896 (2006)
89. Rosen, E. D. y Spiegelman, B. M. *Nature.* **444**: 847-853 (2006)
90. Schäffler, A. y Büchler, C. *Stem Cells.* **25**: 818-827 (2007)
91. Shi, Y. Y. *et al. Plast Reconstr Surg.* **116**: 1686-1696 (2005)
92. Siersbaek, R. *et al. FEBS Lett.* **584**: 3242-3249 (2010)
93. Skogsberg, J. *et al. PLoS One.* **3**: e3771 (2008)
94. Smith, P. J. *et al. J Biol Chem.* **263**: 9402-9408 (1988)
95. Smith, P. K. *et al. Anal Biochem.* **150**: 76-85 (1985)
96. Spiegelman, B. M. *Diabetes.* **47**: 507-514 (1998)
97. Staley, B. K. e Irvine, K. D. *Dev Dyn.* **241**: 3-15 (2012)
98. Strem, B. M. *et al. Keio J Med.* **54**: 132-141 (2005)
99. Styner, M. *et al. J Cell Biochem.* **111**: 1042-1050 (2010)
100. Sudol, M. *et al. FEBS Lett.* **369**: 67-71 (1995)

- 101.Sun, S. *et al. J Endocrinol.* **202**: 327-336 (2009)
- 102.Takahashi, K. *et al. Cell.* **131**: 861-72 (2007)
- 103.Takahashi, K. y Yamanaka, S. *Cell.* **126**: 663-676 (2006)
- 104.Tamm, C. *et al. J Cell Sci.* **124**: 1136-1144 (2011)
- 105.Tao, W. *et al. Nat Genet.* **21**: 177-181 (1999)
- 106.Thomson, J. A. *et al. Science.* **282**: 1145-1147 (1998)
- 107.Tong, Q. y Hotamisligil, G. S. *Rev Endocr Metab Disord.* **2**: 349-355 (2001)
- 108.Toyo-oka, K. *et al. Nat Genet.* **34**: 274-285 (2003)
- 109.Tseng, Y. H. *et al. Mol Cell Biol.* **24**: 1918-1929 (2004)
- 110.Uhart, M. *et al. Sci Rep.* **6**: 26234 (2016)
- 111.Uhart, M. y Bustos, D. M. *PLoS One.* **8**: e55703 (2013)
- 112.van Hermet, M. J. *et al., Bioessays.* **23**: 936-946 (2001)
- 113.Varelas, X. *Development.* **141**: 1614-1626 (2014)
- 114.Wabitsch, M. *et al. Int J Obes Relat Metab Disord.* **25**: 8-15 (2001)
- 115.Wilker, E.W *et al. J Biol Chem.* **280**: 18891-18898 (2005)
- 116.Xu, T. *et al. Development.* **121**: 1053-1063 (1995)
- 117.Yagi, R. *et al. EMBO J.* **18**: 2551-2562 (1999)
- 118.Yang, W. *et al. Hum Mol Genet.* **23**: 502-513 (2014)
- 119.Young, C. *et al. Cell Transplant.* **1**: 293-298 (1992)
- 120.Young, S. G. y Zechner, R. *Genes Dev.* **27**: 459-484 (2013)
- 121.Zebisch, K. *et al. Anal Biochem.* **425**: 88-90 (2012)
- 122.Zhang, H. *et al. J Biol Chem.* **284**: 13355-13362 (2009)
- 123.Zhang, H. H. *et al. J Endocrinol.* **164**(2): 119-28 (2000)
- 124.Zhao, B. *et al. Genes Dev.* **24**: 862-874 (2010)
- 125.Zhao, L. *et al. J Biol Chem.* **275**: 16845-16850 (2000)

- 126.Zhou, Z. *et al. Oncogene*. **30**: 2181-2186 (2011)
- 127.Zhu, Y. *et al. Cell Biochem Funct*. **26**: 664-675 (2008)
- 128.Zuk, P. A. *et al. Mol Biol Cell*. **13**: 4279-4295 (2002)
- 129.Zuk, P. A. *et al. Tissue Eng*. **7**(2): 211–228 (2001)