UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

Efectos de la modulación de los receptores PPARγ y de Glucocorticoides en la expresion de Caveolina-1 en células 3T3-L1

Gina Paola Domínguez Moré

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias, Departamento de Farmacia

Bogotá, Colombia

2011

Efectos de la modulación de los receptores PPARγ y de Glucocorticoides en la expresion de Caveolina-1 en células 3T3-L1

Gina Paola Domínguez Moré

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:

Magister en Ciencias Farmacéuticas

Director:

Ph.D. Claudio Gómez Alegría

Línea de investigación:

Mecanismos de regulación de la expresión génica

Grupo de investigación:

Unimol

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias, Departamento de Farmacia

Bogotá, Colombia

2011

Resumen

Caveolina-1es una proteína con un importante papel en el tejido adiposo, donde participa en la respuesta a insulina y el metabolismo de lípidos. La expresión de Caveolina-1 aumenta durante la adipogénesis de células 3T3-L1, pero se desconocen los mecanismos que regulan su expresión. Trabajos preliminares sugieren la participación de receptores nucleares en dicha regulación. El objetivo de este trabajo fue analizar el efecto de la modulación farmacológica de los receptores PPARγ y de Glucocorticoides sobre la expresión de Cav-1 en células 3T3-L1. Células diferenciadas por 4 días fueron tratadas con Rosiglitazona o Dexametasona, analizando la expresión de Cav-1 por RT-PCR. Rosiglitazona no indujo cambios significativos en los niveles de su ARNm. En contraste, el tratamiento por 48 h con Dexametasona 1μM, aumentó tres veces la expresión del ARNm de Cav1 respecto a las células control. Estos resultados sugieren que el receptor de glucocorticoides sería un regulador positivo de la expresión de Cav-1 en células 3T3-L1.

Palabras Clave: Caveolina-1, células 3T3-L1, PPARγ, Receptor de Glucocorticoides.

Abstract

Caveolin-1 is a protein with an important role in adipose tissue, where it has been involved in insulin response and lipid metabolism. Caveolin-1 expression increases during adipogenesis of 3T3-L1 cells, but the mechanisms regulating its expression remain unknown. Preliminary work suggests the involvement of nuclear receptors in such regulation. The aim of this work was to analyze the effect of PPARγ and Glucocorticoid receptor's pharmacological modulation on Cav-1 gene expression in 3T3-L1 cells. Cells at day 4 of differentiation were treated with rosiglitazone or dexamethasone, and Cav-1 expression was analyzed by RT-PCR. Rosiglitazone did not significantly change its mRNA levels. In contrast, treatment with 1 μM dexamethasone by 48 h led to a three-fold increase in Cav1 mRNA levels compared to control cells. These results suggest that the glucocorticoid receptor would be a positive regulator of the Cav-1 gene expression in 3T3-L1 cells.

Keywords: Caveolin-1, 3T3-L1 cells, PPARγ, Glucocorticoid Receptor.

Contenido

Resumen III
Abstract IV
Lista de Figuras VIII
Lista de Tablas IX
Lista de Abreviaturas X
Introducción 1
1. Estado del Arte 5
1.1. Receptores Nucleares 5
1.1.1. Receptores PPAR 7
1.1.2. Receptor de Glucocorticoides 10
1.2. Caveolas y Caveolina 14
1.2.1. Caveolina y Función de Adipocitos 16
1.2.2. Mecanismos de Regulación de Caveolina 19
2. Hipótesis 21
3. Objetivos 23
3.1. Objetivo General 23
3.2. Objetivos Específicos 23
4. Materiales y Métodos 25
4.1. Cultivo y Diferenciación *In Vitro* de Células 3T3-L1 25
4.1.1. Cultivo y Propagación de las Células 3T3-L1 25
4.1.2. Diferenciación Celular 26
4.2. Evaluación del Efecto del Medio de Diferenciación Sobre la Adherencia Celular 27
4.3. Purificación de ARN Total y Obtención De ADNc 28
4.4. Estandarización de la PCR 28
4.4.1. Amplificación Inicial 28
4.4.2. Implementación de un Ensayo de PCR Múltiple 30

4.4.3. Determinación del Rango de Respuesta Lineal de la PCR 30
4.5. Tratamientos Fármacológicos 30
4.5.1. Modulación Farmacológica de PPARγ 31
4.5.2. Evaluación de la Actividad del Agonista de PPARγ Rosiglitazona 32
4.5.3. Evaluación del Efecto de Rosiglitazona sobre la expresión del ARNm de Cav-1 en Células 3T3-L1 No Diferenciadas 32
4.5.4. Modulación Farmacológica del Receptor de Glucocorticoides 33
4.6. Análisis de Datos 33
5. Resultados 35
5.1. Efecto del Medio de Diferenciación Sobre la Adherencia Celular 35
5.2. Estandarización de la PCR 38
5.2.1. Ensayo de PCR Múltiple 39
5.2.2. Rango de Respuesta Lineal de la PCR 40
5.3. Modulación Farmacológica de PPARγ 42
5.3.1. Efecto de la Modulación Farmacológica de PPARγ en la Expresión de ARNm de Cav-1 en Adipocitos 3T3-L1 42
5.3.2. Actividad del Fármaco 43
5.3.3. Efecto de la Modulación Farmacológica de PPARγ en la Expresión de ARNm de Cav-1 en Células 3T3-L1 No Diferenciadas. 47
5.4. Efecto de la Modulación Farmacológica del Receptor de Glucocorticoides en la Expresión del ARNm de Cav-1 48
5.4.1. Efecto del Antagonista del Receptor de Glucocorticoides, Mifepristona, Sobre la Expresión del ARNm de Cav-1 en Presencia de Dexametasona 52
5.4.2. Papel del Receptor de Glucocorticoides en la Expresión de Cav-1 durante la Diferenciación de Células 3T3-L1 53
6. Discusión 55
6.1. El Medio de Diferenciación Induce Cambios en la Matriz Extracelular de las Células 3T3-L1 55
6.2. Implementación de un Ensayo de RT-PCR Semi-Cuantitativa para Medir la Expresión de Cav-1 en Células 3T3-L1 57
6.3. La Modulación Farmacológica de PPARγ No Tiene Efecto Sobre la Expresión del ARNm de Cav-1 en Adipocitos 3T3-L1 Pero Sí Sobre Células Sin Diferenciar 58
6.4. La Modulación Farmacologica del Receptor de Glucocorticoides Afecta la Expresión del ARNm de Cav-1 63

7. Conclusiones 69
Bibliografía 71
Anexo A: Diagnóstico de Micoplasma en Cultivo de Células 3T3-L1 por PCR 85

Lista de Figuras

Figura 1-1: Estructura lineal de los NR y detalle de los dedos de zinc. 6
Figura 1-2: Esquema de la estructura genómica del GR humano. 11
Figura 1-3: Homología de secuencia en las isoformas de Caveolina en mamíferos. 15
Figura 1-4: Estructura primaria y topología de Caveolina-1. 16
Figura 1-5: Papel de Caveolina-1 en adipocitos. (Modificado de Lay y col, 2009). 17
Figura 4-1: Estructura molecular de agonistas de los receptores nucleares PPARγ y de Glucocorticoides. 31
Figura 5-1: Efectos negativos del medio de diferenciación sobre la monocapa celular. ... 36
Figura 5-2: Monocapa de células 3T3-L1 en el día 2 de diferenciación sobre pozos pre-cargados con colágeno tipo II. 37
Figura 5-3: Efecto del pre-tratamiento de los pozos de cultivo con gelatina, sobre la monocapa celular 3T3-L1. 38
Figura 5-4: Estandarización de la PCR.. 39
Figura 5-5: Implementación del ensayo de PCR múltiple.. 40
Figura 5-6: Linealidad de respuesta de la PCR para Cav-1 y HPRT. 41
Figura 5-7: Efecto de Rosiglitazona sobre la expresión del ARNm de Cav-1 en adipocitos 3T3-L1 con 4 días de diferenciación: 43
Figura 5-8: Diferenciación de células 3T3-L1 con Rosiglitazona. 45
Figura 5-9: Expresión del ARNm de FABP-4 en respuesta a Rosiglitazona 46
Figura 5-10: Efecto de Rosiglitazona sobre la expresión del ARNm de Cav-1 en células 3T3-L1 no diferenciadas. 48
Figura 5-11: Expresión de Cav-1 en respuesta a Dexametasona en adipocitos 3T3-L1 con 4 días de diferenciación. 49
Figura 5-12: Curva Tiempo-Respuesta a Dexametasona de la expresión de Cav-1 en adipocitos 3T3-L1 con 4 días de diferenciación. 51
Figura 5-13: Efecto del antagonista del GR Mifepristona, sobre la estimulación mediada por Dexametasona en la expresión de Cav-1 en adipocitos 3T3-L1 con 4 días de diferenciación 53
Figura 5-14: Efecto del antagonista Mifepristona, sobre la expresión de Cav-1 en células 3T3-L1 no diferenciadas 54

Lista de Tablas

Tabla 1-1: Clasificación de los Receptores PPAR 7
Tabla 4-1: Secuencia de cebadores. 29

Lista de Abreviaturas

Abreviatura	Término
Acrp30	Adiponectina
ADN	Ácido Deoxiribonucleico
ADNc	Ácido Deoxiribonucleico codificante
AGL	Ácidos grasos libres
AMPc	Adenosin monofosfato cíclico
aP2/FABP4	Proteína de enlace a ácidos grasos 4
AR	Receptor de andrógenos
ARNi	Ácido ribonucleico de interferencia
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ATCC	"American Type Culture Collection"
β3-AR	Receptor adrenérgico β3
CD36	Clúster de diferenciación 36
CD4	Clúster de diferenciación 4
CD8	Clúster de diferenciación 8
CpG	Citosina – Guanina
DEA	Dominio de enlace al ADN
DEPC	Dietil-pirocarbonato
DMEM	"Dulbecco's Modified Eagle Medium"
EC_{50}	Concentración efectiva 50
EDTA	Ácido etilen-diamino-tetra-acético
eNO	Óxido nítrico sintasa endotelial

Abreviatura	Término
ER	Receptor de estrógenos
FOXO	"Forkhead box O"
GCs	Glucocorticoides
Glut-4	Transportador de glucosa 4
GR	Receptor de Glucocorticoides
GRα	Receptor de Glucocorticoides α
GRβ	Receptor de Glucocorticoides β
GRγ	Receptor de Glucocorticoides γ
HPRT	Hipoxatina fosforibosil transferasa
HSL	Lipasa sensible a hormonas
Hsp40	Proteína de choque térmico 40
Hsp70	Proteína de choque térmico 70
Hsp90	Proteína de choque térmico 90
IBMX	Isobutil-metil-xantina
IL-4	Interleuquina 4
IR	Receptor de insulina
IRS-1	Sustrato del receptor de insulina 1
IRS-2	Sustrato del receptor de insulina 2
LPL	Lipoproteina lipasa
MD	Medio de diferenciación
MEC	Matriz extracelular
MIX	Metil-isobutil-xantina
NR	Receptor nuclear
NR1C3	Receptor PPARγ
NR3C1	Receptor de Glucocorticoides
PAI-1	Inhibidor del activador de plasminógeno

Abreviatura	Término
PBS	Buffer fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PEPCK	Fosfoenolpiruvato carboxiquinasa
PI3,4,5P3	Fosfatidilinositol 3,4,5 trifosfato
PKC	Proteína quinasa C
PPARγ	Receptores activados por el Proliferador del Peroxisoma γ
PPRE	Elemento de respuesta a PPAR
PR	Receptor de progestina
PTEN	Homólogo de fosfatasa y tensina
qRT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real
RAR	Receptor del ácido retinoico
RGZ	Rosiglitazona
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real
RXR	Receptor retinoico X
SBF	Suero bovino fetal
SREs	Elementos de respuesta a esteroles
TAG	Triacilglicerol
TNF-α	Factor de necrosis tumoral α
TR	Receptor de hormona tiroides
TR2	Receptor testicular 2
TR4	Receptor testicular 4
TZD	Tiazolidinedionas

Introducción

El tejido adiposo blanco es un tejido de origen mesenquimal conformado por células especializadas para la acumulación de lípidos,los adipocitos, en asociación con células precursoras en diversos grados de diferenciación, pericitos, células endoteliales y macrófagos infiltrados (Cinti, 2005).

Las principales funciones de los adipocitos van dirigidas al metabolismo de lípidos (lipogénesis y lipólisis) (Arner y Eckel, 1998), a la regulación de los niveles de glucosa postprandial (Felig y Frohman, 2001); y a la producción y liberación de adipoquinas activas en diferentes categorías funcionales (Fruhbeck y col, 2001).

Alteraciones en la función del tejido adiposo están cercanamente asociadas con obesidad y aumento en la incidencia de enfermedades cardiovasculares y de diabetes mellitus tipo 2. En estados de obesidad los adipocitos se hipertrofian (aumentan de tamaño) y pierden su capacidad de almacenamiento de lípidos, con lo cual tejidos no adiposos son expuestos a un flujo excesivo de triacilgliceroles (TAG) y ácidos grasos libres (AGL) ocasionando lipotoxicidad (Goossens, 2008).

Del mismo modo, evidencias experimentales indican que la deficiencia en cantidad o función del tejido adiposo está también asociada con resistencia a insulina y diabetes mellitus tipo 2 (Agarwal y Garg, 2006).

Las caveolas y su componente estructural, las caveolinas, parecen jugar un papel importante en diferentes aspectos funcionales del adipocito. Estudios recientes muestran evidencia acerca de la participación de Caveolina-1 en los procesos deformación de la gota lipídica,lipólisis (Cohen y col, 2004), homeostasis delcolesterol (Fielding y col, 1997, Bist y col, 1997), y señalización a insulina (Smith y col, 1998; Ishikawaa y col, 2005; Fruhbeck y col, 2007). Ratones *knock-out* deficientes en Caveolina-1, presentan un

fenotipo delgado, altos niveles plasmáticos de TAG y AGL en condiciones basales y una marcada resistencia a insulina (Razani y col., 2002).

Todo lo anterior evidencia el importante papel de Caveolina-1 en el metabolismo de lípidos y carbohidratos, lo que la convierte en una potencial diana farmacológica para el control de alteraciones metabólicas relacionadas con la función del tejido adiposo, tales como resistencia a insulina y dislipidemias; sin embargo, el conocimiento acerca de los mecanismos implicados en la regulación de esta proteína es escaso. Algunos antecedentes sugieren la participación de miembros de la familia de los receptores nucleares en este proceso, pero todos ellos han sido observados en células no adiposas (Bist y col, 1997; Burgermeister y col, 2003; Llaverías y col, 2004; Barar y col, 2007).

Los receptores nucleares son una amplia familia de factores de transcripción que ejercen control sobre vías metabólicas que son críticas para el desarrollo de enfermedades como diabetes y obesidad. Entre estos receptores, la isoforma gamma del Receptor Activado por el Proliferador del Peroxisoma PPARγ (NR1C3) y el Receptor de Glucocorticoides (NR3C1) parecen gobernar el control metabólico en el tejido adiposo (Tamori y col, 2002; Miles y col, 2000; Vegiopoulos y col, 2007; Datson y col, 2008).PPARγ activa la transcripción de genes que controlan la adipogénesis (Tamori y col, 2002). Ratones *knock-out* en PPARγ carecen completamente de tejido adiposo (Miles y col, 2000) mientras que los agonistas de este receptor nuclear tienen un efecto sensibilizador a la acción de insulina en pacientes diabéticos (Mayerson y col, 2002).

Por su lado, el Receptor de Glucocorticoides ejerce control principalmente sobre el metabolismo de la glucosa, siendo capaz de modular la expresión de muchos genes blanco. Numerosos estudios han definido la asociación entre glucocorticoides y resistencia a insulina o diabetes mellitus y los autores coinciden en que cerca del 30% de los pacientes tratados con glucocorticoides, con diferentes condiciones patológicas de base, desarrollan resistencia a insulina (Jindal y col, 1996; Ariza y col, 1998; Biering y col 2000; Gulliford y col 2006; Uzu y col, 2007).

Considerando la aparente relación entre el efecto de la activación de los receptores nucleares mencionados (PPARγ y de Glucocorticoides) y las funciones de Caveolina-1 en el tejido adiposo, nuestro grupo ha dirigido su atención hacia el estudio del papel que

pudieran tener estos receptores en la regulación de Caveolina-1 en un modelo *in vitro* de adipocitos.

Con los resultados de investigaciones previas del grupo, se obtuvo evidencia de queel receptor PPARγ no afectaría los niveles de la proteínaCaveolina-1 en la línea celular 3T3-L1 (Sandoval, 2008). Además, ensayos muy preliminares sugirieron la posibilidad de que el Receptor de Glucocorticoides pudiera regular la expresión de esta proteína(Sandoval, 2008), resultados que están en concordancia con lo reportado recientemente por Barar y col (2007)enuna línea celular pulmonar que no expresa el receptor de insulina. El presente trabajo se planteó con el fin de extender las observaciones preliminares de nuestro grupo, definiendo la potencial participación de los receptores nucleares PPARγ y del Receptor de Glucocorticoides en la regulación de Cav-1 en adipocitos.

En esta tesis se trabajó con la línea celular 3T3-L1.Como una línea celular clonal, estas células tienen la ventaja de ser una población homogénea, permitiendo comparaciones precisas de tratamientos definidos sin la confusión que generaría la variación entre diferentes donantes. Como todos los modelos *in vitro*, tiene limitaciones en cuanto a la extrapolación de resultados; sin embargo, estas células son capaces de desarrollarse como células grasas cuando se implantan en animales (Shibasaki y col, 2002) por lo que constituyen un excelente modelo de células adiposas. La técnica RT-PCR utilizada permitió detectar ARN mensajero de modo semicuantitativo para observar diferencias entre los tratamientos utilizados.

El conocimiento derivado de los resultados de esta investigación, aporta al entendimiento de los mecanismos de acción de los fármacos en estudio al demostrar por primera vez suefecto positivo sobre la expresión de Caveolina-1 en el modelo celular 3T3-L1. Además da nuevos enfoques para direccionar las investigaciones acerca del papel de Caveolina-1 en la aparición de trastornos metabólicos como la resistencia a insulina, que podrían llevar a convertir esta molécula en blanco terapéutico para su tratamiento, esto porque, hasta ahora, se ha relacionado la ausencia de Caveolina-1 con resistencia a insulina y dislipidemias en modelos animales. Estudios posteriores de nuestro grupo pretenderán dislucidar la relación entre síndrome metabólico y Caveolina-1 en humanos, a través de la detección de polimorfismos en el gen Cav-1 de pacientes con este síndrome.

1. Estado del Arte

1.1. Receptores Nucleares

Los receptores nucleares (NR, por su sigla en inglés) constituyen una amplia familia deproteínas que funcionan como reguladores transcripcionales(positivos o negativos) de numerosos genes involucradosen importantes funciones fisiológicas, incluyendo la homeostasis metabólica, el controldel desarrollo embrionario y la diferenciación celular(Germain y col, 2003, 2006; Sonoda y col, 2008).

En la actualidad se han definido 48 miembros de la superfamilia de receptores nucleares; todos ellos comparten una organización estructural común,pero clásicamente han sido subdivididos en tresclases independientes con base en la similitud de sus ligandos y en sus potenciales funciones.

La primera clase la constituyen los receptores esteroidales, los cuales tienen alta afinidad por hormonas liposolubles. Esta clase incluye al receptor de Glucocorticoides (GR), y a los receptores de Estrógeno (ER), Progestina (PR), Andrógeno (AR) y Mineralocorticoides (Germain y col, 2006).

Los NR de clase dos funcionan activamente formando heterodímeros con el receptor Retinoico X (RXR), pertenecen a esta clase los receptores del Ácido Retinoico (RAR), hormona Tiroides (TR) y el receptor de la Vitamina D (VDR) (Weatherman y col, 1999).

El tercer grupo lo componen NR huérfanos cuyos ligandos no han sido determinados, o no fueron determinados por mucho tiempo, hacen parte de esta clase los receptores activados por el Proliferador del Peroxisoma (PPAR) y los receptores Testiculares (TR2 y TR4) entre muchos otros (Xie y Evans, 2001).

La estructura modular común de los NR incluye varios dominios conservados con funciones específicas (Figura 1-1): un dominio de enlace al ADN (DEA), que es una zona central corta formada por 2 iones de Zinc acomplejados con 8 residuos de cisteína formando dos pliegues denominados “dedos de Zinc”; un dominio o extremo N-terminal variable que contiene la región AF-1 (o independiente de la hormona), relacionada con la actividad transcripcional y la unión con proteínas coactivadoras y factores transcripcionales; un extremo C-terminal relativamente variable que contiene la región AF-2 responsable de launión al ligando y de la unión de proteínas chaperonas (Germain y col, 2003, 2006). Entre el dominio de unión al ADN y el extremo C-terminal existe una región menos conservada que podría permitir que los dos dominios que la rodean tomen diferentes conformaciones sin crear impedimento estérico (dominio D) (Germain y col, 2003).

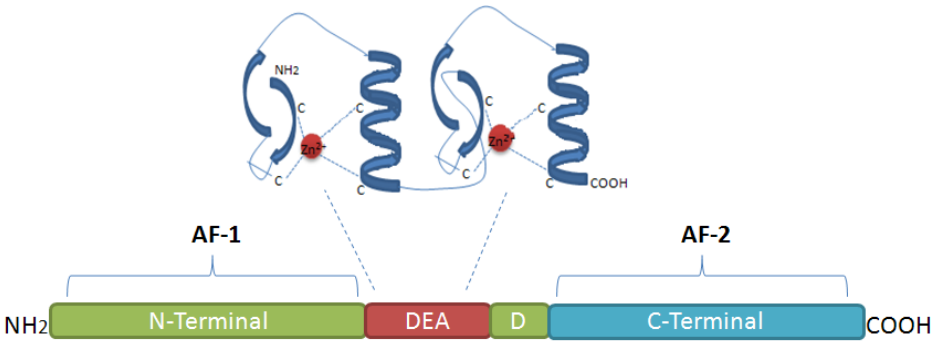


Figura 1-1: Estructura lineal de los NR y detalle de los dedos de zinc.

La importancia fisiológica de los NR radica en la función de los genes que son capaces de regular, los cuales participan en procesos tan diversos como el desarrollo embrionario, reproducción, respuesta inmune, función vascular y cardiaca, formación de tumores y crecimiento de tejidos y metabolismo de lípidos y de carbohidratos (Germain y col, 2003, 2006; Sonoda y col, 2008). Además, la capacidad de estos factores de transcripción de ser inducibles por un ligando los convierte en blancos terapéuticos. Ejemplos de agonistas de receptores nucleares utilizados en terapéutica son los Glucocorticoides (GCs) como la Dexametasona (Dex), agonista del GR con acción antiinflamatoria, y las Tiazolidinedionas

(TZD) como la Rosiglitazona (RGZ), agonista del PPARγ que fue usada por mucho tiempo como fármaco antidiabético.

1.1.1. Receptores PPAR

Los receptores PPAR pertenecen a la familia de receptores nucleares huérfanos de los cuales se conocen sus ligandos naturales y algunos artificiales. Estos receptores son activos como heterodímeros del RXR, un factor de transcripción funcional dentro de las células. Se han identificado tres tipos de receptores PPARcodificados por genes diferentes y con expresión diferencial en tejidos, como se indica en la tabla 1-1 (Michalik, L y col, 2006).

La modulación de la transcripción genética por parte de los receptores PPAR se da por la unión del heterodímero PPAR-RXR a elementos de respuesta presentes en los genes blanco, secuencias que se conocen como PPRE. En adición a este mecanismo de acción, clásico de los NR, los PPAR pueden regular indirectamente la expresión génica por interferencia con la función de otros factores de transcripción(Costas y col, 2009). Mecanismos postraduccionales como la fosforilación (Lazennec y col, 2000) y la ubiquitinación (Blanquart y col, 2003) regulan también la actividad de PPAR y la intensidad de la respuesta al ligando.

Tabla 1-1: Clasificación de los Receptores PPAR

Subtipo (Isoforma)	Nomenclatura IUPHAR	Distribución en tejidos	Ligandos
PPARα	NR1C1	Tejido adiposo marrón, hígado, corazón, riñón, intestino delgado, músculo esquelético	Ácidos grasos, leucotrieno B4, fibratos
PPARβ/δ	NR1C2	Ubicuo	Ácidos grasos, ácido retinoico
PPARγ (1,2)	NR1C3	1: Colon, cerebro, células vasculares, tipos específicos de células del sistema inmune 2: Tejido adiposo blanco.	Ácidos grasos, prostaglandina J2, Tiazolidinedionas

(Información tomada de Shaw y col, 2003 y Michalik, L y col, 2006)

La activación de los receptores PPAR juega un papel central en el control del metabolismo de ácidos grasos y lipoproteínas como ha sido demostrado en diferentes estudios *in vivo*(Chinetti y col, 2005; Gross y col, 2005) e *in vitro*(Tontonoz y col, 1995; Schoonjans y col, 1996). Adicionalmente, las tiazolidinedionas, agonistas de este receptor,mejoran la sensibilidad a insulina(Mayerson y col, 2002).

- **Tiazolidinedionas en la Función del Tejido Adiposo.**Las tiazolidinedionas (TZD) fueron los primeros compuestos sintéticos identificados como ligandos de PPARγ; dentro de este grupo varios autores han demostrado que la Rosiglitazona (RGZ) es el agonista más potente y selectivo que haya sido identificado para este receptor (Murphy y Holder, 2000).

La acción de las TZD sobre el tejido adiposo puede ser dividida en tres puntos:

1) Inducción de adipogénesis: la adipogénesis es la formación de adipocitos a partir de un precursor mesenquimático pluripotencial. Las TZD son potentes inductores de diferenciación de adipocitos (Fischer y col, 2002; Chou y col, 2007)y ejercen este efecto por activación de PPARγ, quienes reconocido como el regulador maestro de la adipogénesis(Gregoire, 2001).

2) Regulación de genes relacionados con el metabolismo lipídico: las TZD incrementan la expresión de proteínasque promueven el almacenamiento de ácidos grasos y reprimen genes que inducen lipólisis en el adipocito(Tontonoz y col, 1995; Kallen y Lazar, 1996; Schoonjans y col, 1996; Bakopanos y Silva, 2000; Tamori y col, 2002; Tonelli y col, 2004).

3) Regulación de la señalización del receptor de insulina: las TZD regulan la transcripción de distintas moléculas de la vía de señalización del receptor de insulina o su activación por fosforilación(Wu y col, 1998; Smith y col, 2001; Jiang y col, 2002; Sevillano y col, 2007).

Todos los efectos anteriores son mediados por la activación de PPARγ. A continuación se mencionan con más detalle.

El tejido adiposo blanco responde de manera depósito-selectiva al tratamiento con agonistas de PPARγ. Específicamente, las TZD causan un aumento en el tejido adiposo subcutáneo, lo cual es un efecto deseable porque contribuye al mantenimiento de la sensibilidad sistémica a insulina; por otro lado los depósitos de grasa viscerales no son afectados, o incluso son disminuidos en respuesta a TZD, de esta forma los agonistas PPAR ejercen protección contra la lipotoxicidad (Semple y col, 2006). Además, la administración de TZD en ratones lleva también a la reducción en el número de macrófagos infiltrados en el tejido adiposo favoreciendo este efecto (Christodoulidesa y Vidal, 2010).

Como se mencionó anteriormente, PPARγ regula de manera positiva la expresión de genes implicados en el metabolismo de lípidos en el adipocito, como la proteína de unión a ácidos grasos (aP2/FABP4) (Tontonoz y col, 1995), la acil-coenzima A sintetasa, proteína transportadora de ácido graso y lipoproteína lipasa (Schoonjans y col, 1996), entre otras. Más recientemente se ha demostrado la regulación positiva de perilipina por PPARγ (Tamori y col, 2002); esta proteína se une a la gota lipídica impidiendo la acción de enzimas lipolíticas. La síntesis de la adipoquina Acrp30 (o adiponectina), quien promueve la oxidación de AGL es también estimulada por PPARγ (Tonelli y col, 2004).

Como es de esperar, la inducción de genes que tienen que ver con la acumulación de TAG en el adipocito por parte de PPARγ, va acompañada de la represión en la expresión de genes implicados en la lipólisis y la liberación de ácidos grasos, tales como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF-α) y el receptor β3-adrenérgico (β3-AR) (Bakopanos y Silva, 2000); y de adipoquinas como el inhibidor del activador de plasminógeno (PAI-1) y la leptina (Kallen y Lazar, 1996; Kato y col, 1999), ambas expresadas altamente en condiciones de obesidad y resistencia a insulina y que han sido relacionadas con la aparición de aterosclerosis y de otros eventos cardiovasculares (Beltowski, 2006; Huber y col, 2001).

Aunque la mejora en la sensibilidad a insulina producida por las TZD en pacientes diabéticos puede ser explicada en parte por el control transcripcional de genes que codifican proteínas involucradas en el metabolismo de lípidos, como se explicó arriba,la regulación de moléculas de la vía de señalización del receptor de insulina, o su activación por fosforilación,hacen parte del complejo mecanismo de acción de este grupo de

fármacos. En este sentido, varios estudios han encontrado un efecto modulador de los agonistas PPARγ sobre la fosforilación del sustrato 1 del receptor de insulina (IRS -1) *in vivo* e *in vitro*. El efecto consiste en la disminución de la fosforilación en serina (Griffin y col, 1999; Jiang y col, 2002; Sevillano y col, 2007), lo cual incrementa la fosforilación en tirosina y restaura la transcripción de la señal río abajo. También se ha demostrado que losagonistas de PPARγ incrementan los niveles del sustrato 2 del receptor de insulina (IRS-2) (Smith y col, 2001) y de GLUT-4 (Wu y col, 1998) en adipocitos humanos y/o derivados de la línea celular 3T3-L1.

Se ha propuesto también que PPARγ reduce la expresión del homólogo de fosfatasa y tensina (PTEN) (Kim y col, 2007). La inhibición de PTEN aumenta los niveles de citoplasmáticos de fosfatidil inositol 3,4,5 fosfato (PI3,4,5P3) mejorando la respuesta a insulina (Rodríguez-Escudero y col, 2005).

Debido precisamente a su capacidad para inducir adipogénesis, las TZD inducen aumento de peso en los pacientes que las utilizan;por esta razón, en la actualidad se está trabajando en la identificación de nuevos agonistas parciales o antagonistas de PPARγ para lograr el efecto en la sensibilidad a insulina mientras se previene la obesidad (Chinetti y col, 2005). Entre tanto, es importante considerar el perfil de riesgo-beneficio de las TZD existentes cuando se planean usar a largo plazo. Troglitazona, la primera TZD disponible comercialmente fue retirada de la práctica médica por ocasionar hepatotoxicidad (Wilding, 2006). De igual forma, Rosiglitazona, que por muchos años fue ampliamente utilizada en el tratamiento de pacientes con diabetes tipo II, ha sido asociada con un incremento significativo del riesgo de sufrir infarto de miocardio o de morir por causas cardiovasculares, por lo que en la actualidad su uso es restringido (Nissen y col, 2007).

1.1.2. Receptor de Glucocorticoides

El Receptor de Glucocorticoides (GR/NR3C1) es una fosfoproteína celular, de aproximadamente94kDa. En humanos, el gen del GR se ha localizado en el cromosoma 5, y contiene9 exones y al menos 8 intrones (Figura 1-2; Encío y Detera, 1991; Turner y Muller, 2005).

El GR existe en dos isoformas provenientes del “splicing” alternativo del mismo gen conocidas como GRα y el GRβ. Recientemente, una tercera isoforma ha sido descrita, GRγ (Rivers y col, 1999). La isoforma α parece ser laúnica transcripcionalmente activa (Gupta y Lalchhandama, 2002).

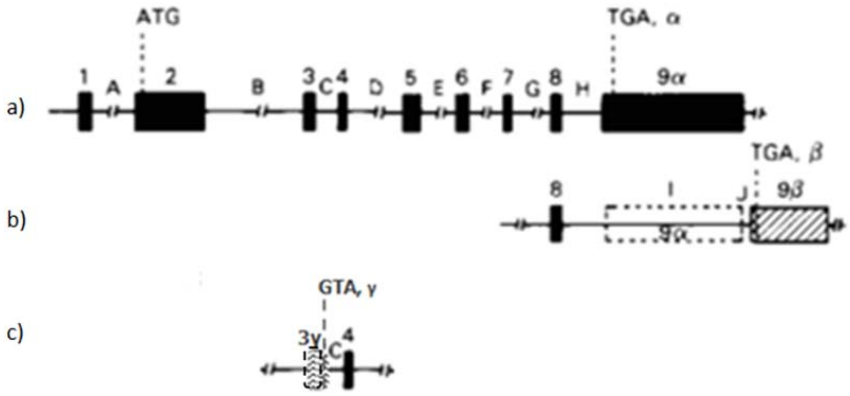


Figura 1-2:Esquema de la estructura genómica del GR humano.a): GRα. b): GRβ. c): GRγ. Los intrones se señalan con letras y los exones con números. (Modificado de Encio y Detera, 1991). Exón 1 no traducido, exón 2: extremo N-terminal, exón 3 y 4 “dedos de zinc”, otros exones: dominio de unión al ligando.

En el citoplasma, el GR se encuentra inactivo formando un complejo con diferentes proteínas de choque térmico (Hsp90, Hsp70, Hsp40), inmunofilinas y otras. Por uniónde la hormona, el GR se hiperfosforila y cambia su conformación,separándose de las proteínas chaperonasy quedando disponible para formar homodímeros o heterodímeros (por enlace con la isoforma β) (Bodwell y col, 1998; Chen y col, 2008). El receptor dimerizado se transloca al núcleo para promover la transactivación, transrepresión o transupresión de los genes blanco.

La actividad del GR lo relaciona con una gran cantidad de funciones biológicas. Los Glucocorticoides, ligandos naturales del GR, están involucrados en la regulación del metabolismo de carbohidratos, proteínas y lípidos entre otras funciones que se detallan a continuación.

- **Glucocorticoides en la Función del Tejido Adiposo.**Los glucocorticoides (GCs) son hormonas endógenas (cortisona y cortisol) involucradas en diferentes procesos fisiológicos tales como la respuesta inmune, el metabolismo y la homeostasis de electrolitos.

En la práctica médica, fármacos sintéticos con estructura semejante al cortisol endógeno son utilizados principalmente como antiinflamatorios en enfermedades inflamatorias crónicas (cuadros reumáticos, lupus eritematoso, asma bronquial, alergias, entre otras). La acción antiinflamatoria de los GCs se debe a la inhibición de la expresión de distintos factores quimiotácicos, proinflamatorios y de crecimiento (Brunton et al, 2007).

El uso prolongado de estos fármacos, en ocasiones lleva a la manifestación de una serie de síntomas y signos que han sido agrupados bajo el nombre de síndrome de Cushing (Vegiopoulos y Herzig, 2007). Pacientes con esta enfermedad presentan obesidad central, incremento en la pérdida de masa muscular y resistencia a insulina que lleva a una condición de hiperglicemia, hipertensión, colesterol elevado y acumulación ectópica de grasa especialmente en la parte posterior del cuello (giba de búfalo), la cara y el área supraventricular, junto con pérdida de grasa en las extremidades (Schäcke y col, 2002).

Estos síntomas están relacionados con la función de los GCs en el tejido adiposo, en donde muestran una acción diferencialsegún el depósito graso que impacten. Así, en depósitos de grasa periféricos estas moléculasinducen la lipólisis, mientras que en depósitos de grasa centrales ocasionan la diferenciación de los pre-adipocitos, la activación de vías pro-lipogénicas, y más tarde, la hipertrofia de los adipocitos maduros(Vegiopoulos y Herzig, 2007).

Como resultado de esta acción diferencial, los GC ocasionan la redistribución de la grasa y el aumento en la liberación de AGL, signos típicos del síndrome de Cushing. Este efecto está mediado por diferentes mecanismos moleculares como los que se indican a continuación.

Se ha descrito que los GC promueven la activación de la lipasa sensible a hormonas (HSL) (Vegiopoulos y Herzig, 2007), de la lipoproteína lipasa (LPL) (Pedersen y col, 1994) y de la proteína quinasa A (PKA) (Xu y col, 2009) para promover la lipólisis y liberar AGL. Asimismo, atenúan la fosofoenolpiruvato carboxiquinasa (PEPCK) lo que incrementa

también la tasa de liberación de AGL por inhibición de la gliceroneogénesis en el adipocito (Christ-Crain y col, 2008; Simonyte y col, 2009). La disminución en la expresión de la fosofodiesterasa 3B por GC en adipocitos, ha sido descrita también como mecanismo para la inducción de lipólisis debido al papel del AMPc en este proceso (Xu y col, 2009).

Una carga adicional de AGL inducida por GC es resultado del aumento en la expresión del gen de la ácido graso sintetasa en depósitos de grasa mesentérica (Christ-Crain y col, 2008; Simonyte y col, 2009). Además, en contraposición al efecto de las TZD, los GC aumentan los niveles de leptina y TNFα en el adipocito y disminuyen los de Acrp30 y perilipina.La mayoría de estos efectos son revertidos por el antagonista del GR Mifepristona (Xu y col, 2009).

- **Glucocorticoides como inductores de resistencia a insulina.** El aumento en la lipólisis y la liberación de AGL ocasionada por los GC pueden inducir resistencia a insulina que asu vez ocasiona otra serie de alteraciones metabólicas que inducen o agravan -cuadros pre-existentes de- enfermedades como diabetes, insuficiencia adrenal, hipogonadismo y enfermedad cardiovascular; disminuyendo así el pronóstico de vida de los pacientes (Schäcke y col, 2002).

En este sentido, los GC, además de inducir lipotoxicidad por la carga de AGL que generan, han mostrado influenciar directamente la sensibilidad a insulina en el adipocito por interferencia con componentes de la vía de señalización de su receptor. Específicamente se ha descrito que los GC: 1) inducen aumento en la expresión de diferentes quinasas como la proteína quinasa C (PKC), que fosforila en residuos de serina al receptor de insulina y a otras moléculas involucradas en esta vía de señalización (Bollag y col, 1986). 2) Disminuyen la actividad quinasa de la enzima fosfoinositol-3-quinasa. 3) Disminuyen la expresión de los sustratos 1 y 2 del receptor de insulina en tejido adiposo (Caperuto, 2006). 4) Disminuyen la expresión del transportador de glucosa 4 (Glut-4) e inhiben su translocación hacia la membrana plasmática en respuesta a insulina (Vegiopoulos y Herzig, 2007).

Modelos celulares *in vitro* han mostrado una menor captura de glucosa en adipocitos humanos primarios o provenientes de la línea celular 3T3-L1 cuando son tratados con Dexametasona (Christ-Crain y col, 2008; Pinzón, 2010).

In vivo, varios autores han relacionado la resistencia a insulina y la diabetes con el tratamiento con GCs en diferentes grupos poblacionales (Jindal y col, 1996; Everson y col, 1999; Ariza y col, 1998; Fisher y col, 1997; Biering y col, 2000; Gulliford y col, 2006; Uzu y col, 2007). Teniendo en cuenta estos reportes, queda claro que la resistencia a insulina y la diabetes inducida por el tratamiento con GCs, representan un problema médico frecuente y severo.

1.2. Caveolas y Caveolina

Las caveolas son microdominios lipídicos de la membrana celular, caracterizados por ser estructuras ricas en colesterol y esfingolípidos,e insolubles en detergentes no iónicos. Poseen una estructura invaginada, y tienen el potencial de formar vesículas para el trasporte de algunas sustancias.Estas estructuras son abundantes en muchas células diferenciadas de mamíferos, tales como adipocitos, células endoteliales y células musculares, entre otras (Engelman, 1998a).

Otro componente estructural característico de las caveolas son unas proteínas integrales conocidas como Caveolinas que, además de su papel en la formación de las caveolas, desempeñan también un papel funcional en diferentes vías de señalización asociadas a estas estructuras de membrana(Razani y col, 1999; Schwencke y col, 2006).

En células de mamíferos,la familia de las Caveolinas consta de al menos tres miembros (Caveolinas 1, 2 y 3), que son codificados por tres genes independientes. Caveolina-1 y 2 son coexpresadas en todos los tipos celulares estudiados, y forman un complejo hetero-oligomérico, con niveles particularmente altos en adipocitos (Scherer y col, 1996); la expresión de Caveolina-3, por su parte, es específica de células musculares.

Los 3 miembros de la familia de las Caveolinas poseen una organización semejante con varios dominios funcionales: un dominio de oligomerización, un dominio de andamiaje, un dominio de membrana y un dominio C terminal (Engelman y col, 1998b) (Figura 1-3 y 1-4).

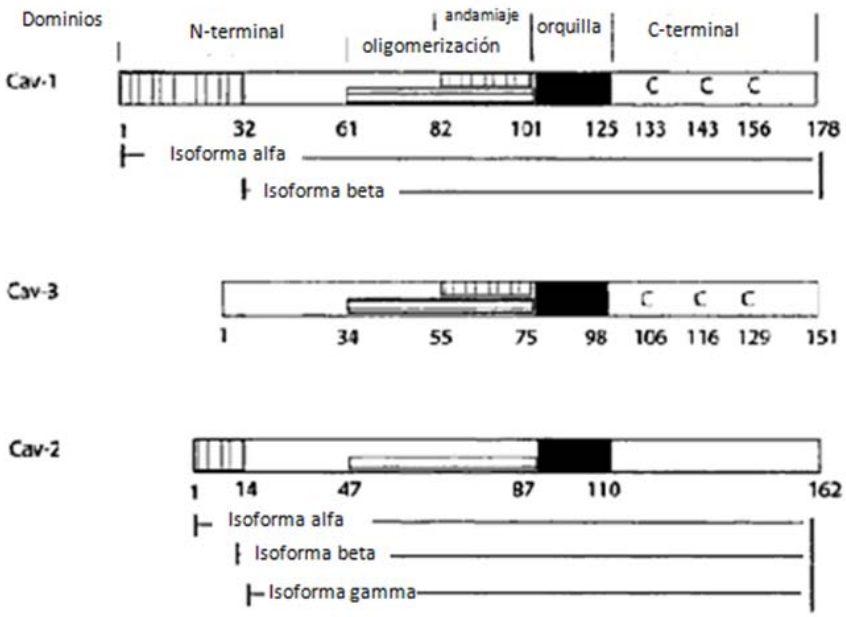


Figura 1-3: Homología de secuencia en las isoformas de Caveolina en mamíferos.Los números indican la posición de los aminoácidos. C: Cisteina. (Modificado de Fielding, 2006).

El dominio de oligomerización permite la interacción entre monómeros de Caveolina para formar agrupamientos estables de 14 a 16 monómeros (Fielding, 2006). Por su parte, el dominio de andamiaje media la interacción de Caveolina con distintas moléculas de señalización tales como la subunidad alfa de proteína G, la proteína quinasa C (PKC) y la óxido nítrico sintetasa endotelial (eNO) (Engelman y col, 1998a). Interesantemente, en todos los casos estudiados, la interacción de estas moléculas con Caveolina es suficiente para inhibir su actividad *in vitro* (Couet y col 1997a, b y c).

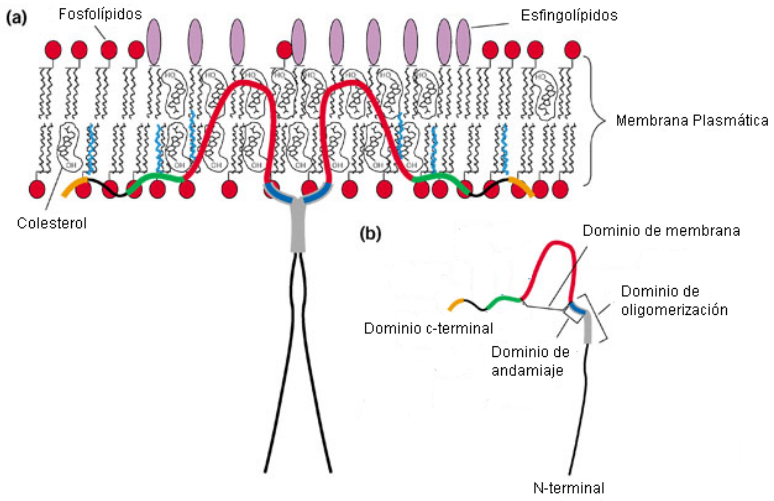


Figura 1-4: Estructura primaria y topología de Caveolina-1.a): Dos monómeros de Caveolina-1 en la membrana. Los extremos C-terminal y N-terminal se orientan hacia el citoplasma celular. b): Detalle de los dominios presentes en Caveolina-1. (Modificado de Williams y Lisanti, 2004).

Estas observaciones han permitido la reevaluación del concepto acerca de las Caveolinas en los últimos años, reconociéndose su papel no sólo en el transporte de solutos y endocitocis, sino como reguladoras de distintas vías de señalización. Por esta razón es de gran interés conocer las implicaciones de Caveolina-1 en el comportamiento celular y los mecanismos involucrados en la modulación de su expresión.

1.2.1.Caveolina y Función de Adipocitos

En adipocitos, donde se ha estimado que las caveolas representarían cerca del 20% del área total de la superficie de la membrana plasmática (Engelman y col, 1998a), se ha relacionado a Caveolina-1 con procesos tales como la formación de la gota lipídica, la lipólisis (Cohen y col, 2004), la homeostasis del colesterol (Fielding y col, 1997; Bist y col, 1997), y la respuesta a insulina (Smith y col, 1998; Ishikawaa y col, 2005; Fruhbeck y col, 2007), como loseñalan algunas evidencias resumidas a continuación (Figura 1-5):

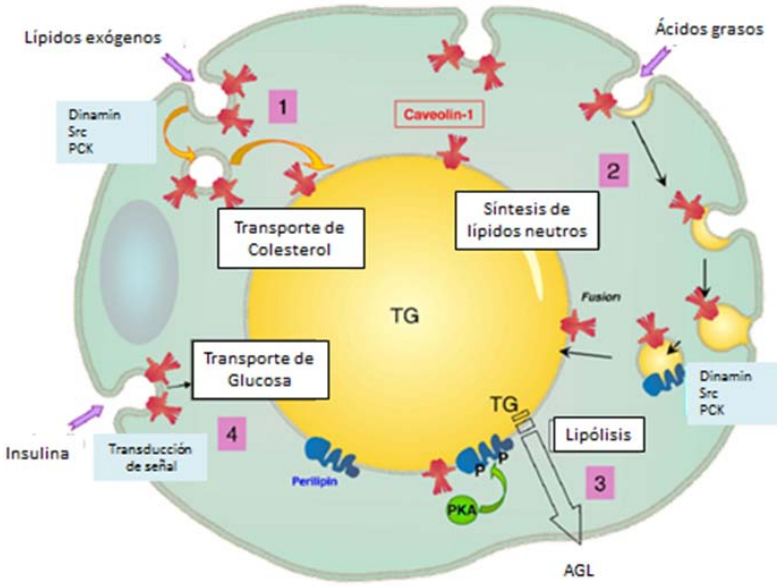


Figura 1-5: Papel de Caveolina-1 en adipocitos. (Modificado de Lay y col, 2009).

La expresión de Caveolina-1 en el adipocito aumenta de 10 a 25 veces durante el proceso de diferenciación; en acuerdo con esto, adipocitos de ratones *knock-out*paraCav-1 carecen de caveolas morfológicamente identificables lo que lleva a una inhabilidad para la acumulación de grasa; la sobreexpresión de Cav-1, en cambio, aumenta el transporte de ácidos grasos de cadena larga hacia el interior del adipocito. Asimismo, la presencia de proteínas de unión a ácidos grasos como FAT/CD36 en las caveolas, han relacionado a estas estructuras con el transporte y metabolismo de triglicéridos. Ratones knockout en Cav-1 presentan niveles bajos de CD36 (Lay y col, 2009).

Lay y col (2009) identificaron la presencia de Caveolina-1 en la membrana de la gota lipídica y la relacionaron con el contenido de colesterol de esta estructura. Con experimentos posteriores se demostró que el colesterol no afecta la expresión de Caveolina-1 sino que induce su movilización desde la membrana hacia la gota lipídica. Toda esta evidencia indicaría el papel de esta proteína en el almacenamiento de colesterol intracelular.

Por otro lado, se ha observado que las caveolas poseen todas las proteínas necesarias para la síntesis de triglicéridos a partir de ácidos grasos. Los experimentos de Ost y col (2005) comprobaron que una fracción aislada de membrana plasmática de adipocitos, rica

en Caveolina-1, era capaz de sintetizar triglicéridos al suplirla con precursores tales como ácido oleico y 3-glicerol. Considerando que el flujo de ácidos grasos hacia el adipocito es alto y que éstos deben ser neutralizados de manera rápida y eficiente para evitar dañar la membrana celular, es probable entonces que en adipocitos existan dos vías para la síntesis de triglicéridos: una a partir de ácidos grasos libres exógenos que ocurre en la membrana, específicamente en la caveola, y otra a partir de la síntesis de novo de ácidos grasos que ocurre en el retículo endoplasmático (vía clásica).

El fenotipo característico de ratones deficientes enCaveolina-1 incluye resistencia a insulina, adiposidad reducida, resistencia al aumento de peso inducido por dieta,e hipertriglicemia. Teniendo en cuenta estas observaciones se pensó que Caveolina-1 pudiera tener un papel en la lipólisis. Cohen y col (2004) reforzaron este planteamiento al demostrar que ratones *Knock-out* en Cav-1no eran capaces de suplir sus necesidades energéticas con la liberación de ácidos grasos después de un ayuno prolongado.Incluso en respuesta a un inductor de la lipólisis, los adipocitos de estos ratones no presentaron niveles de ácidos grasos diferentes a los que se encontraron en estado basal. Se ha demostrado que la deficiencia en Caveolina-1 está relacionada con una disminución en la fosforilación de perilipina-1 lo que explicaría la lipólisis disminuida (Cohen y col, 2004).

En general, las Caveolinas son conocidas como inhibidores de la actividad de muchas enzimas que se ubican en las regiones caveolares de membrana, tales como las quinasas, por tanto funcionan más que todo como inhibidoras de transducción de señales. El receptor de insulina (IR)y las moléculas que intervienen en esta vía de señalización se encuentran ubicados en las caveolas (Ishikawaa y col, 2005),sin embargo, en este caso específico, el IR parece ser regulado positivamente por Caveolina-1 (Ishikawaa y col, 2005; Frühbeck y col, 2007). En condiciones donde las caveolas permanecen íntegras, la señal del receptor de insulina se transduce y se disminuye la glucosa en sangre. Tejido adiposo de ratones deficientes en Caveolina-1 muestran una reducción de más de 90% en los niveles del receptor de insulina y una marcada resistencia a insulina. En adipocitos 3T3-L1 se ha descrito una vida media para el IR en estado basal de 6 a 7 horas la cual disminuye aproximadamente 3 veces en adipocitos que carecen de Caveolina-1 (Cohen y col, 2003).Además, péptidos que contienen el dominio de andamiaje de Caveolina-1

estimulan dramáticamente la actividad quinasa del receptor de insulina para fosforilar el IRS-1 *in vitro* (Yamamoto y col, 1998).

1.2.2. Mecanismos de Regulación de Caveolina

A nivel molecular se han descrito varios mecanismos de regulación de Caveolina-1 en distintas líneas celulares. Bist y col (1997), en fibroblastos normales de piel humana, demostraron que cambios a nivel de la transcripción del genCav-1 inducidos por colesterol y otros análogos estructurales, son mediados por elementos de respuesta a esteroles (SREs). Otros autores sugieren que los SREs no son suficientes para regular la transcripción de Caveolina (Fra y col, 2000). Engelman y col (1999) proponen que la regulación de la expresión del gen puede estar mediada, en parte, por metilación de regiones ricas en citosina y guanina (CpG), al encontrar que los CpGs de la región promotora del genCav-1 son funcionalmente metilados en dos líneas celulares de cáncer de mama (MCF7 and T-47D) que fallan al expresar Caveolina-1.

Van Den Heuvel y col (2005) demostraron que Caveolina-1 es regulada por interacción directa del factor de transcripción FOXO con la región promotora del genCav-1. FOXO pertenece a la familia de los factores de transcripción "*Forkhead box*" (FOX). Los miembros de la clase O regulan el metabolismo, la proliferación celular y la tolerancia al estrés (Van der Horst y Burgering, 2007). Estas proteínas se expresan principalmente en adipocitos, células de útero, células T (CD4 y CD8), células B, ovarios y tiroide (Su y col, 2004).

En un trabajo reciente de nuestro grupo, desarrollado en el Departamento de Farmacia de la Universidad Nacional, Sandoval (2008) investigó si el receptor nuclear PPARγ, un regulador clave en el proceso de diferenciación de la célula adiposa como ya ha sido mencionado, tenía algún papel en la modulación de la expresión de Caveolina-1 durante la diferenciación deadipocitos. Utilizando el modelo celular de preadipocitos 3T3-L1, estudió el efecto del fármaco Rosiglitazona, agonista PPARγ, sobre los niveles de la proteína, sin encontrar cambios significativos. Tales resultados indicarían que PPARγ no regula a Caveolina en células adiposas, observación inesperada por nuestro grupo debido a que discrepa de lo descrito por otros autores en diferentes líneas celulares, como

macrófagos y células de carcinoma humano (Burgermeister y col, 2003; Llaverías y col, 2004).Experimentos complementarios muy preliminares mostraron que el glucocorticoide Dexametasona induciría un aumento en los niveles de ARN mensajero de Cav-1, efecto que fue suprimido por Mifepristona, un antagonista del GR (Sandoval, 2008). Estos resultados indicarían que el GR cumpliría un papel importante en la regulación de Cav-1. Tales resultados, sin embargo, fueron muy preliminares, y necesitan ser reproducidos para concluir.

En concordancia con nuestros datos preliminares, un grupo de investigadores británicos recientemente demostró que los GC aumentan la expresión de Cav-1 en células pulmonares. En efecto,de un total de 20 líneas celulares investigadas (carcinomas de piel, riñón, epitelio colorectal, endotelio cerebral, hígado, epitelio nasofaríngeo, y keratinocitos, entre otros), el efecto fue observado exclusivamente en células pulmonares, y fue bloqueado por antagonistas del GR, indicando que el receptor de glucocorticoides actuaría como un regulador positivo de la expresión del gen Cav-1. Los autores, además, concluyen que el mecanismo implicado en este efecto sería del tipo II, es decir, por interacción del GR con otros factores de transcripción (Barar y col, 2007). Interesantemente, de todas las líneas celulares estudiadas por Barar et al (2007), no se utilizó células adiposas.

Otras moléculas que han mostrado capacidad para aumentar la expresión de Cav-1 en diferentes tipos celulares son: lipopolisacáridos, en macrófagos de ratón (Lei y col, 2005), ganglosido GD1a, en osteosarcoma de ratón (Wang y col, 2006); y factor de crecimiento endotelial vascular, en células epiteliales amnióticas ovinas(Cheung y col, 2010). *In vivo*, la administracióndeIL-4 disminuye sustancialmente la expresión de Cav-1 (Le y col, 2008).

2. Hipótesis

Receptores nucleares del tipo PPARγ y/o receptor de Glucocorticoides serían parte del mecanismo regulador de la expresión de Cav-1 en células adiposas.

3. Objetivos

3.1. Objetivo General

Analizar el efecto de la modulación farmacológica de los receptores nucleares PPARγ y de glucocorticoides sobre la expresión de Caveolina-1 en células adiposas 3T3-L1.

3.2. Objetivos Específicos

2. Estudiar el efecto de un agonista del receptor PPARγ sobre la expresión del ARN mensajero de Cav-1.

3. Estudiar el efecto de un agonista del receptor de glucocorticoides sobre la expresión del ARN mensajero de Cav-1.

4. Materiales y Métodos

4.1. Cultivo y Diferenciación*in vitro*de Células 3T3-L1

4.1.1. Cultivo y Propagación de las Células 3T3-L1

La línea celular 3T3-L1 (ATCC, USA, Código CL-173) es una sub-cepa de tipo fibroblasto proveniente de embrión de ratón Swiss 3T3, desarrollada a través de aislamiento clonal. En la actualidad es el modelo más robusto de adipogénesis.

Las células se cultivaron inicialmente sobre frascos T25 y se mantuvieron según las indicaciones del proveedor en medio DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium, Invitrogen, USA) alto en glucosa, suplementado con Suero Bovino Fetal (SBF,Invitrogen, USA) 10%, penicilina 1000 U/mL, estreptomicina 100µg/mL (Invitrogen, USA), piruvato de sodio (Sigma, USA) 110mg/L y bicarbonato de sodio (Sigma, USA) 3,7g/L, a 37°C en atmosfera de CO_2 al 5%.

El cultivo se mantuvo hasta alcanzar 60-80% de confluencia con 7mL de medio suplementado, el cual fue sustituido cada 48 horas. Las células en crecimiento fueron subcultivadas por desprendimiento con una solución de tripsina-EDTA al 0,25% (Invitrogen, USA) y siembra sobre frascos T25 nuevos a una densidad de 1000 células/cm^2(para mantenimiento del cultivo), o sobre cajas de 24 pozos a una densidad de 8000 células/cm^2 (para experimentación).

4.1.2.Diferenciación Celular

Las células 3T3-L1 se diferenciaron a adipocitos según el procedimiento descrito por Clavijo y col (2007) y modificado por Sandoval (2008). Para ello, las células sembradas sobre placas de 24 pozos se dejaron crecer en medio completo hasta alcanzar confluencia. Dos días después (tiempo cero de diferenciación) fueron expuestas a un medio de diferenciación (MD) consistente en el medio de cultivo DMEM indicado en el apartado anterior ahora suplementado con insulina (Sigma, USA) 10 µg/mL, 1-metil-3-isobutil-xantina (Sigma, USA) 0,5 mM (MIX) y Dexametasona (Sigma, USA) 0,1 µM. Después de 48 horas, se reemplazó el medio de diferenciación por medio completo más insulina 10µg/mL por otras 48 horas. Las células así diferenciadas (4 días de diferenciación) fueron expuestas a los tratamientos farmacológicos.

El proceso de diferenciación de los adipocitos se monitoreó por análisis de la morfología celular y, eventualmente, por acumulación de lípidos a través de la tinción de las grasas neutras y ésteres de colesterol con Oil Red O.

- **Tinción de Lípidos con Oil Red O.** Se preparó una solución concentrada de Oil Red O disolviendo 0,7g del reactivo (Sigma, USA) en 200mL de isopropanol (Panreac, España), la cual se almacenó en refrigeración, después de filtrada por 0,45 micras. La solución de trabajo se preparó justo antes de usar, por dilución 3 en 5 de la solución concentrada en agua destilada y se pasó nuevamente a través del filtro.

Para la tinción, se removió el medio de cultivo de cada pozo y se fijaron los adipocitos por lavado inicial con 0,5 mL de formaldehido (Merck, USA) al 10% en buffer fosfato salino (PBS, Invitrogen, USA), y tratamiento con la misma solución por 1 hora a temperatura ambiente o por toda la noche a 4°C, sellando la caja con papel auto-sellante. Una vez fijadas las células, se hicieron lavados con 0,5mL de isopropanol al 60% y se dejaron secar los pozos a temperatura ambiente. Posteriormente se tiñeron las células con 0,2 mL de la solución Oil Red O de trabajo. Se retiró el colorante luego de 15 minutosde incubación a temperatura ambiente y se realizaron varios lavados con agua destilada hasta observar al microscopio la ausencia de colorante en el espacio extracelular. Se dejó

secar los pozosy se tomaron fotografías de las células teñidas observadas al microscopio con contraste de fase (ECLIPSE E600, Nikon, USA).

Como medida adicional del grado de diferenciación, luego de teñidas y fotografiadas las células, se retiró el colorante absorbido por incubación por 10 minutos con 0,75mL de isopropanol y se midió la absorbancia de la solución coloreada resultante a una longitud de onda de 500nm, utilizando isopropanol al 100% como blanco.

4.2. Evaluación del Efecto del Medio de Diferenciación Sobre la Adherencia Celular

Células 3T3-L1 fueron cultivadas en cajas de 24 pozos previamente tratadas con colágeno tipo II, gelatina o sin ningún tratamiento.

Los pozos pre-cargados con colágeno se prepararon por tratamiento con 160 µL de una solución de 0,1mg/mL de colágeno (Sigma, USA) en agua destilada estéril según las indicaciones del proveedor.

Los pozos pre-cargados con gelatina se prepararon por tratamiento con 15µL de una solución de gelatina de concentración 20mg/mL en agua destilada estéril siguiendo las indicaciones del proveedor.

Luego del tratamientode los pozos con colágeno o gelatina, las cajas se almacenaron a 4°C por toda noche. Al siguiente día se enjuagaron los pozos con etanol (Merck, USA) al 75% y se dejaron secar en cabina de flujo laminar antes de sembrar las células.

Células en post-confluencia sembradas sobre los 3 tipos de pozos (pre-cargados con colágeno, pre-cargados con gelatina o pozos sin tratamiento)se diferenciaron según el procedimiento descrito en el numeral 4.1.2 y el efecto del medio de diferenciación sobre la monocapa celular fue estudiado por observación de los pozos a las 48 horas de iniciada la diferenciación, a través de un microscopio óptico invertido. Después de otras 48 horas (día 4 de diferenciación) se tiñeron las células con Oil red O.Como control se utilizaron células sin diferenciar mantenidas en medio completo suplementado.

4.3. Purificación de ARN Total y Obtención De ADNc

El ARN total de las células se obtuvo mediante el reactivo Trizol (Invitrogen, USA), siguiendo las indicaciones del proveedor. Brevemente, se preparó un lisado celular con 0,3mL del reactivo, el cual se transfirió a tubos eppendorf de 1,5mL.Se agregó 0,06mL de Cloroformo (Merck, USA) y se agitó para extraer el ARN en la fase acuosa. Posteriormente, el tubo se centrifugó a 12,000 g por 15 minutos a 4°C, y se separó la fase acuosa de la cual se precipitó el ARN con la adición de 0,15mL de isopropanol. Con una nueva centrifugación se descartó el sobrenadante y se lavó el precipitado con 0,3mL de etanol al 75%. Los precipitados se dejaron secar a temperatura ambiente y se disolvieron en agua previamente tratada con 0,1% de dietil-pirocarbonato (DEPC, Invitrogen, USA) a 50°C, el ARN disuelto se utilizó inmediatamente para la transcripción reversa, o se almacenó a -70°C.

La concentración de ARN sé determinó mediante la lectura de absorbancias a 260/280 nm.

La síntesis de la cadena de ADNc se realizó con el kit comercial First strand cDNA synthesis kit (Fermentas, Canadá), según las instrucciones del proveedor utilizando cerca de 2μg de ARN total.

4.4. Estandarización de la PCR

4.4.1. Amplificación Inicial

Para la estandarización de la PCR se utilizó ADNc obtenido de adipocitos 3T3-L1 diferenciados por 4 días. Se amplificó el gen Cav-1, el de la proteína de unión a ácidos grasos (FABP-4), y los genes que sirvieron como control de normalización de los experimentos: β-actina e Hipoxantina guanina fosforibosil transferasa (HPRT), este último escogido teniendo en cuenta lo reportado por otros autores, en el sentido de que no es modulado por Glucocorticoides (Nishimura y col, 2006; 2008).

Inicialmente, se utilizaron las condiciones de reacción descritas por Sandoval (2008) y otros autores (Hong y col, 2004), en un volumen total de 25 μL, conteniendo 2μL de

ADNccomo molde, 1x del tampón de amplificación de la enzima (Invitrogen, USA), 0,5 µM de cada cebador (Invitrogen), 2,0 mM de Cloruro de Magnesio (Invitrogen, USA), 200 µM de cada Dinucleótido Trifosfato (Invitrogen) y 1 unidad de Taq ADN polimerasa (Invitrogen, USA).

La reacción de amplificación se realizó en un termociclador (BioRad, Canadá), con el siguiente programa: desnaturalización inicial a 95 ºC durante 3 minutos, seguido de 30 ciclos como sigue: desnaturalización a 94 ºC por 30 segundos, anidado a la temperatura indicada en la tabla 2 por 30 segundos y extensión a 72 ºC por 1 minuto; extensión final a 72 ºC por 5 minutos (Hong y col, 2004; Sandoval, 2008).

Los resultados fueron verificados mediante electroforesis en geles de agarosa al 1,5% teñidos con el intercalador para ácidos nucleicos Syber Safe (Invitrogen, USA) y visualizados en un transiluminador con luz ultravioleta (Major Science, USA) adaptado a un sistema fotográfico.

La secuencia de los cebadores utilizados, y su temperatura de anidado, se detallan a continuación en la tabla 4-1.

Tabla 4-1: Secuencia de cebadores.

Gen	Secuencia	Anidamiento (°C)	Pb	Referencia
Cav-1	Sentido: 5’ ATG TCT GGG GGC AAA TAC GTG G 3’ Antisentido: 5’ AGC ACG CAG AAA GAG ATA TGA G 3’	56	538	Hong y col, 2004
FABP-4	Sentido: 5'- CAA AAT GTG TGA TGC CTT TGT G -3' Antisentido: 5'- CTC TTC CTT TGG CTC ATG CC -3’	62	416	Tamori y col, 2002
β-actina	Sentido: 5´-AAT GGG TCA GAA GGA CTC-3´ Antisentido: 5´-AGA GCA ACA TAG CAC AGC-3´	49	525	Hong y col, 2004
HPRT	Sentido: 5’- GCA AAC TTT GCT TTC CCT GG -3’ Antisentido: 5’ –TGG GGA CGC AGC AAC TGA CA- 3’	65	394	Diseñados

4.4.2. Implementación de un Ensayo de PCR Múltiple

Con el objeto de obtener un ensayo de PCR múltiple para la amplificación del gen Cav-1 y de su control de normalización en una misma reacción, se prepararon PCRs mezclando equimolarmente los juegos de cebadores así: Cav-1 + HPRT, y FABP-4 + β-actina.

Las reacciones se prepararon como se indicó en el numeral 4.4.1con algunas modificaciones en la concentración de Cloruro de Magnesio y la cantidad de enzima por reacción. Se ensayó la PCR con una temperatura de anidamiento de 60°C, que es un valor cercano a todos los promedios de las temperaturas de anidado de los juegos de cebadores utilizados.

4.4.3. Determinación del Rango de Respuesta Lineal de la PCR

Se prepararon reacciones de PCR múltiple con 2µL de ADNc extraído desde células 3T3-L1 en el día 4 de diferenciación.Las reacciones se prepararon en las condiciones estandarizadas,cada una contenía cebadores tanto para Cav-1 como para HPRT.Se hicieron amplificaciones con diferente número de ciclos (16, 19, 22, 25, 28, 31 y 35) y se midió la intensidad de cada una de las bandas obtenidas, para construir una curva en la que se comparó el número de ciclos de PCR contra la intensidad de las bandas.

4.5. Tratamientos Fármacológicos

La modulación de los receptores nucleares PPARγ y de Glucocorticoides se realizó por tratamiento con los fármacos agonistas Rosiglitazona y Dexametasona, respectivamente (Figura 4-1).

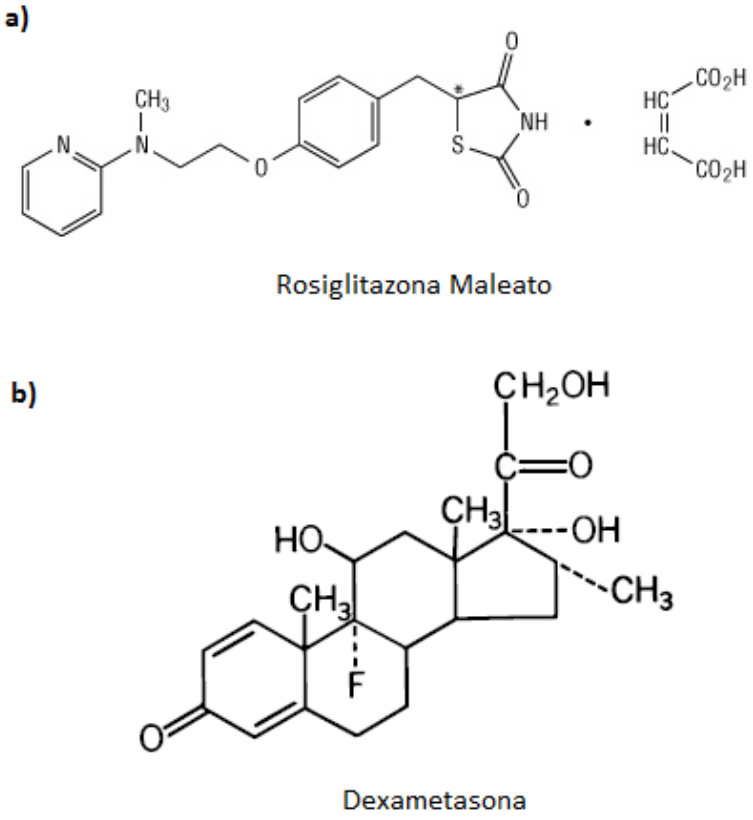


Figura 4-1: Estructura molecular de agonistas de los receptores nucleares PPARγ y de Glucocorticoides. a) Rosiglitazona, agonista del receptor PPARγ. b) Dexametasona, agonista del receptor de Glucocorticoides.

4.5.1.Modulación Farmacológica de PPARγ

Para estudiar el papel de PPARγ en la regulación de Cav-1 se utilizó Rosiglitazona (Cayman chemical, USA) como agonista de este receptor. Células en el día 4 de diferenciación (según lo indicado en el numeral 4.1.2) fueron tratadas con medio suplementado conteniendo, además, Rosiglitazona 1µM o el vehículo del fármaco (Metanol, Merck, USA). Este tratamiento se mantuvo por 0, 24 o 48 horas, después de lo cual se hizo la extracción del ARN total, la RT-PCR en las condiciones estandarizadas para la mezcla Cav-1/HPRT, y la separación de los fragmentos por electroforesis en gel

de agarosa al 1,5%.En todos los casos se cargó en el gel 8µL del producto de PCR diluidos en 2µL de buffer de carga (Promega, USA).

4.5.2.Evaluación de la Actividad del Agonista de PPARγ Rosiglitazona

Teniendo en cuenta que el fármaco disponible en nuestro laboratorio había estado almacenado por un tiempo prolongado, se verificó su actividad farmacológica utilizando dos metodologías diferentes:

a) Inducción de adipogénesis por tratamiento con Rosiglitazona, para ello se siguió el protocolo indicado por Fu y col (2005), según el cual, células a los dos días post-confluencia se trataron con Rosiglitazona 1 µM durante 7 días , con reemplazo del medio cada 48 horas. Como controles de la adipogénesis, un grupo de células se sometió al protocolo de diferenciación descrito en el numeral 4.1.2, manteniéndolas en medio completo más insulina a partir del día 2 y hasta el día 7 (control positivo), y otro grupo se mantuvo únicamente en medio suplementado que fue reemplazado cada 48 horas hasta completar el experimento (control negativo). Al día 7 de diferenciación se realizó tinción con Oil Red O de los tres grupos de células y se midió la absorbanciade la solución coloreada extraída desde los pozos teñidos a 500nm.

(b) Se analizó la expresión del gen de la FABP-4, esta proteína es regulada *in vivo* e *in vitro* por diferentes tiazolidinedionas, incluyendo la Rosiglitazona (Albrektsen y col, 2002). Células 3T3-L1 en confluencia fueron sometidas a tratamiento ya sea con Rosiglitazona 1µM o con el vehículo del fármaco por 48 horas. Retirado el tratamiento se realizó la extracción del ARN, la RT-PCR en las condiciones estandarizadas para la mezcla FABP-4/β-actina, y la separación de los fragmentos por electroforesis.

4.5.3.Evaluación del Efecto de Rosiglitazona sobre la expresión del ARNm de Cav-1 en Células 3T3-L1 No Diferenciadas

Células 3T3-L1 no diferenciadas (pre-adipocitos) fueron tratadas con Rosiglitazona 1µM. Después de 96 horas de tratamiento con el fármaco (día 4), se determinópor RT-PCR el nivel de ARNm de Cav-1 en estas células y se comparó con el expresado en pre-

adipocitos tratados por 4 días con el protocolo de diferenciación tradicional (siguiendo lo indicado en el numeral 4.1.2), o tratados por 96 horas con el vehículo del fármaco (Metanol, Merck, USA).En todos los casos el medio de cultivo con los tratamientos se reemplazó cada 48 horas.

4.5.4. Modulación Farmacológica del Receptor de Glucocorticoides

Como fármaco agonista del GR se utilizó Dexametasona (Sigma, USA). De manera análoga al procedimiento descrito para la modulación de PPAR, células 3T3-L1 con 4 días de diferenciación se sometieron a tratamiento con el fármaco en concentraciones (0, 100 nM, 1000 nM o 10000 nM) por 24 horas. Se evaluó también la respuesta del gen Cav-1 a distintos tiempos de tratamiento con el fármaco (0, 24 y 48 horas).

- **Evaluación del efecto de un antagonista del GR.** Mifepristona es un antagonista del GR que compite con la Dexametasona por el receptor. El efecto de Mifepristona sobre la respuesta observada ante elestímulo con el agonista se determinó sobre células 3T3-L1 (tanto diferenciadas por 4 días,como sin diferenciar), sometidas a los tratamientos descritos a continuación: a) Dexametasona 1µM, b) Dexametasona 1µM + Mifepristona (Sigma, USA) 10µM, c) Vehículo de los fármacos (Metanol, Merck, USA). El tratamiento se mantuvo por 24 horas en células diferenciadas, o por 48 horas en células no diferenciadas, tiempo éste en el que se empiezan a observar característicasfenotípicas de adipocito cuando las células son sometidas a diferenciación. Transcurridos los tiempos de experimentación se midió la expresión del ARNm de Cav-1 en las condiciones estandarizadas.

En todos los experimentos se utilizó como control células tratadas con el vehículo de los fármacos (Metanol, Merck, USA).

4.6. Análisis de Datos

El efecto farmacológico se determinó a partir del análisis densitométrico de los geles de agarosa con el programa Image J (Rasband, 1997).

Para el análisis estadístico de los datos se utilizó el programa R (R Development Core Team,2008), o en ocasiones Excel (Microsoft corporation). Después de hacer pruebas de normalidad e igualdad de varianzas entre las variables, la determinación de diferencias entre los tratamientos se hizo con pruebas t individuales de comparación entre medias.

5. Resultados

5.1. Efecto del Medio de Diferenciación Sobre la Adherencia Celular

Cuando las células 3T3-L1 fueron sometidas al protocolo de diferenciación descrito en la metodología, se observaron cambios desfavorables a nivel de la monocapa de cultivo. Estos cambios, que impedían realizar cualquier experimento posterior, consistieron en lo siguiente:

a) Desprendimiento de la monocapa celular en los bordes del pozo de cultivo (Figura 5-1 b).

b) Replegamiento de la monocapa celular sobre sí misma (Figura 5-1 c).

c) Alteraciones en la uniformidad de la monocapa, que aparece interrumpida por grandes espacios sin células (Figura 5-1 d).

d) Pérdida severa de la adherencia de las células al pozo de cultivo, con lo que el simple cambio de medio ocasionaba el desprendimiento total de la monocapa dejando el pozo sin células (no mostrado).

Estos efectos negativos se evidenciaron a partir del día 2 de diferenciación y fueron independientes del número de pase de las células cultivadas, del lote de suero (SBF) empleado, del tiempo en post-confluencia y de los vehículos utilizados para administrar los componentes del medio de diferenciación.

Las células que no fueron sometidas al protocolo de diferenciación no mostraron ninguna de las alteraciones mencionadas, a excepción de una leve separación de células aisladas que aparecían flotantes en el medio de cultivo como resultado de la hiperconfluencia (Figura 5-1 a).

Cabe resaltar que las alteraciones en la monocapa de cultivo no afectaban la capacidad de diferenciación de los pre-adipocitos, pues se pudieron observar los cambios morfológicos típicos del fenotipo diferenciado y la marcada tinción con Oil red O de las células diferenciadas,que permanecen adheridas al pozo, en comparación con células control sin diferenciar (Comparar figura 5-1 e y 5-1 f).

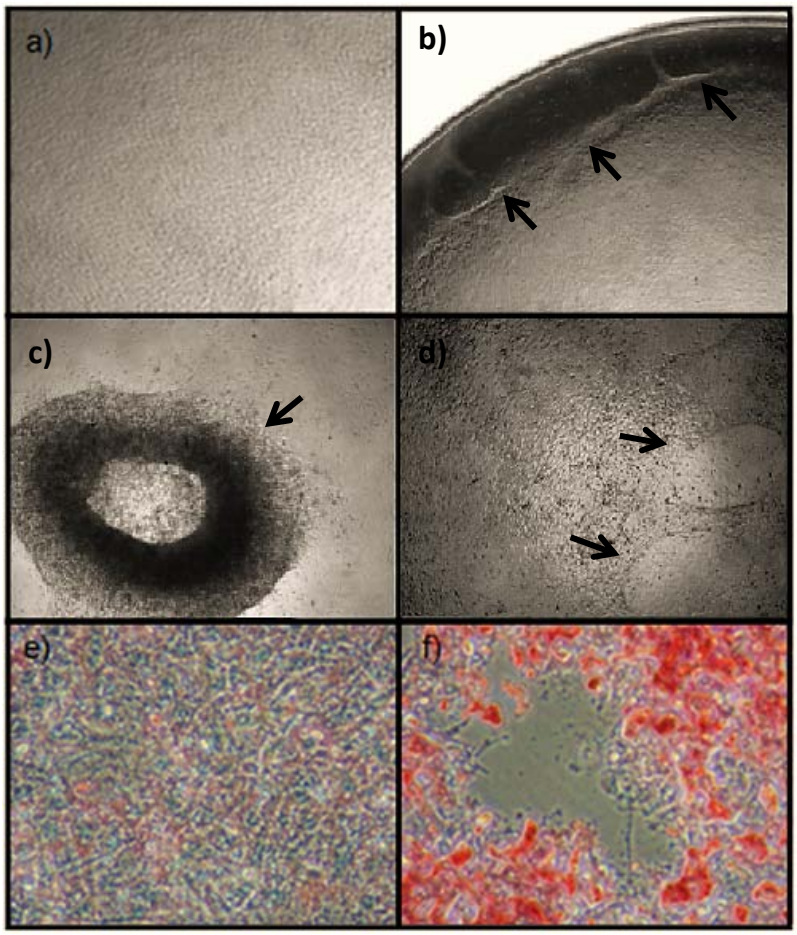


Figura 5-1: Efectos negativos del medio de diferenciación sobre la monocapa celular. a) Células control sin diferenciar (Aumento 40X). b) Desprendimiento en los bordes de la monocapa de células en el día 2 de diferenciación (flechas, aumento: 40X). c) Replegamiento de la mococapa de cultivo (Aumento 40X). d) Espacios libres de células (flechas, aumento 40X). e) Células sin diferenciar teñidas con Oil red O (Aumento: 400X). f) Células diferenciadas (4 días) teñidas con Oil red O (Aumento:400X).

Teniendo en cuenta lo reportado por otros autores, que durante la adipogénesis de células 3T3-L1 ocurren cambios importantes a nivel de la matriz extracelular (MEC)(Urs y col, 2004, Bouloumie y col, 2001), se evaluó el efecto de la adición exógena de colágeno

tipo II y gelatina sobre el comportamiento de la monocapa celular durante la diferenciación. Para esto, los pozos de la placa de cultivo fueron pre-tratadosal menos por 12 horas con colágeno o gelatina, según lo descrito previamente en la metodología (Numeral 4.2).

Cuando las células fueron sembradas sobre pozos pre-tratados con colágeno tipo II no se observóninguna mejora en la adherencia y uniformidad de la monocapa de cultivo; de hecho,aparece un mayor número de espacios en blanco, como se observa en la figura 5-2.

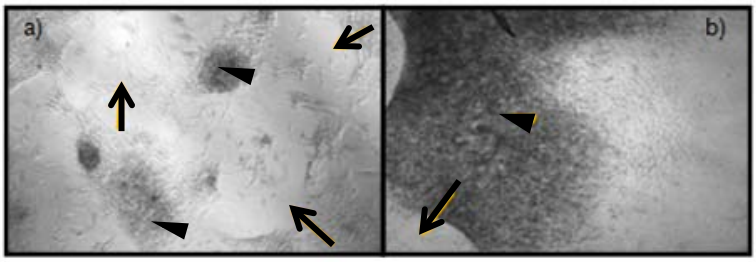


Figura 5-2: Monocapa de células 3T3-L1 en el día 2 de diferenciación sobre pozos pre-cargados con colágeno tipo II.a) Grandes espacios sin células (flechas) y pequeñas aglomeraciones celulares (triángulos) (Aumento:100X). b) Levantamiento de las células (flecha) y replegamiento de la monocapa (triangulo) (Aumento: 400X).

Por su parte, el pre-tratamiento de los pozos con una solución de gelatina, permitió el crecimiento de una mococapa celular homogénea que se mantuvo aún después de diferenciarlas células (Figura 5-3), resolviendo así los problemas de adherencia que impedían continuar con el trabajo experimental. Bajo estas condiciones, las células fueron capaces de adquirir el fenotipo diferenciado como lo indica el cambio de morfología y la acumulación de grasas neutras que se hicieron visibles por tinción con Oil red O, contrastando notablemente con células control cultivadas en las mismas condiciones pero sin tratamiento de diferenciación (Figura 5-3).

En vista de los resultados positivos de esta última prueba, en adelante las células se cultivaron siempre sobre pozos pre-tratados con gelatina.

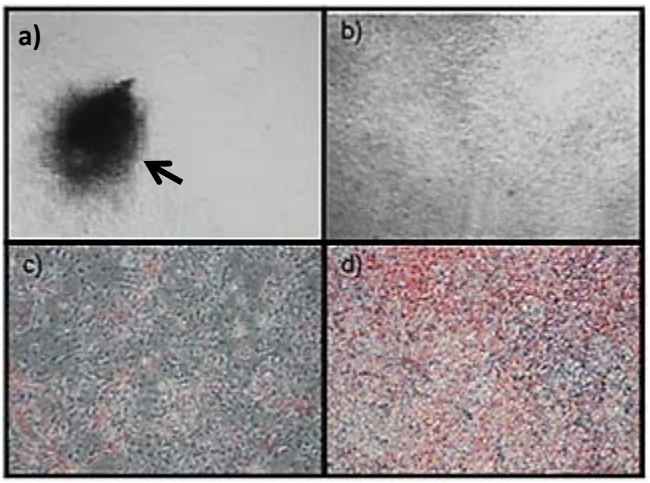


Figura 5-3: Efecto del pre-tratamiento de los pozos de cultivo con gelatina, sobre la monocapa celular 3T3-L1.a) Células 3T3-L1 en el día 2 de diferenciación, sembradas sobre pozossin pre-tratamiento, nótese el enrollamiento de la monocapa en una masa celular amorfa (flecha) (Aumento: 40X). b) Células 3T3-L1 en el día 2 de diferenciación, sembradas sobre pozos pre-tratados con gelatina (Aumento: 40X). c) Células control (no diferenciadas) sembradas sobre gelatina y teñidas con Oil red O (Aumento:100X). f) Células diferenciadas (4 días) sembradas sobre gelatina y teñidas con Oil red O (Aumento: 100X).

5.2. Estandarización de la PCR

Siguiendo las condiciones de reacción descritas por Sandoval (2008), y las temperaturas de anidamiento sugeridas por otrosautores (Hong y col, 2004, Tamori y col, 2002), o estimadas a partir de la secuencia de los cebadores diseñados por nuestro grupo, se logró la amplificación de los fragmentos esperados para los genes Cav-1, HPRT, β-actina y FABP-4. Los geles que muestran este resultado se encuentran en la figura 5-4.

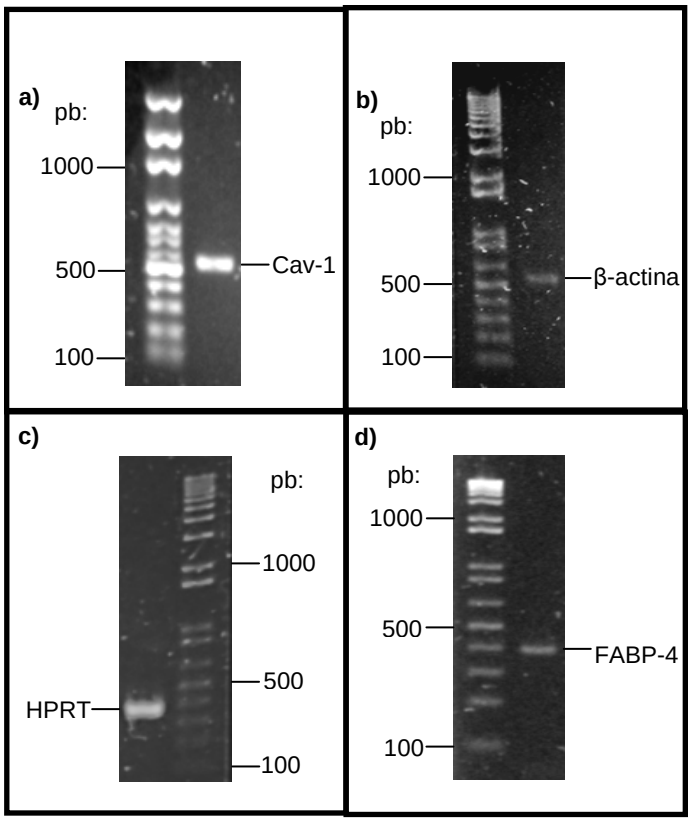


Figura 5-4: Estandarización de la PCR.Fragmentos amplificados de los genes de Cav-1, 538pb (a), β-actina, 525pb (b), HPRT, 394pb (c), FABP-4, 416 pb (d).

5.2.1.Ensayo de PCR Múltiple

Reacciones de PCR con dos juegos de cebadores en las combinaciones Cav-1 + HPRT y FABP-4 + β-actina, fueron preparadas inicialmente según lo indicado en la metodología (Numeral 4.4.1).

Como ha sido reportado en la literatura (Henegariu y col, 1997), la cantidad de Taq polimerasa es una limitante en las reacciones de PCR múltiple, por tal razón se aumentó la cantidad de enzima a 1,5 unidades en estas reacciones.Asimismo, se aumentó a 3mM la concentración de Cloruro de Magnesio en la PCR para asegurar la disponibilidad del elemento libre para las nuevas unidades de enzima y teniendo en cuenta,además, que la concentración de magnesio ha sido directamente relacionada con la optimización de reacciones de PCR múltiple al evitar la aparición de bandas inespecíficas(Henegariu y col, 1997).

Las reacciones así preparadas se amplificaron con el siguiente programa: desnaturalización inicial a 95 ºC durante 5 minutos, seguido de 24 ciclos deesnaturalización a 95 ºC por 45 segundos, anidado a 60°C por 1 minuto y extensión a 72 ºC por 1 minuto; finalmente una extensión final a 72 ºC por 5 minutos.

Con estas condiciones fue posible amplificar correctamente los fragmentos esperados para cada reacción, sin la aparición de bandas inespecíficas (Figura 5-5).

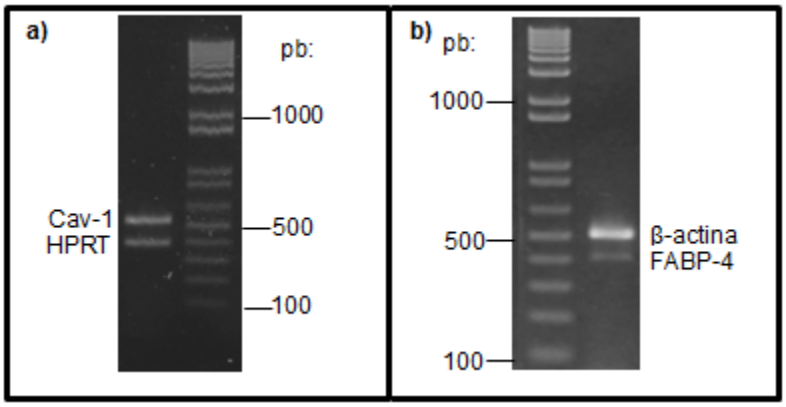


Figura 5-5: Implementación del ensayo de PCR múltiple.Electroforesis en gel de agarosa al 1,5% donde se muestran los productos amplificados en reacciones con diferentes combinaciones de cebadores: a) Cav-1 – HPRT. b) β-actina – FABP-4.

En adelante, todas las reacciones de PCR se hicieron con combinaciones de cebadores para el gen a medir y para su control de normalización, siguiendo el protocolo estandarizado aquí.

5.2.2.Rango de Respuesta Lineal de la PCR

Con el objetivo de estandarizar un ensayo de RT-PCR semicuantitativo,se determinó el intervalo de respuesta lineal de la PCR para el análisis de los genes Cav-1 y HPRT,amplificados bajo las condiciones estandarizadas utilizando como plantilla ADNc obtenido de células 3T3-L1 en el día 4 de diferenciación. La figura 5-6 muestra la intensidad de las bandas obtenidas para estos dos genes a distintos ciclos de

amplificación. Con el análisis densitométrico se pudo determinar que se requerían al menos 19 ciclos para producir una banda visible y cuantificable en el programa Image J, aunque en este punto de la reacción la intensidad de las bandas fue muy tenue. La gráfica (Figura 5-6 b)indica que la fase de crecimiento de la PCR para ambos genes está entre los ciclos 22 y 31. En la fase plateau (ciclos 31 en adelante), cuando gran parte de los reactivos se han consumido, sólo se observóun pequeño cambio en la intensidad de la respuesta al aumentar el número de ciclos en cuatro unidades.

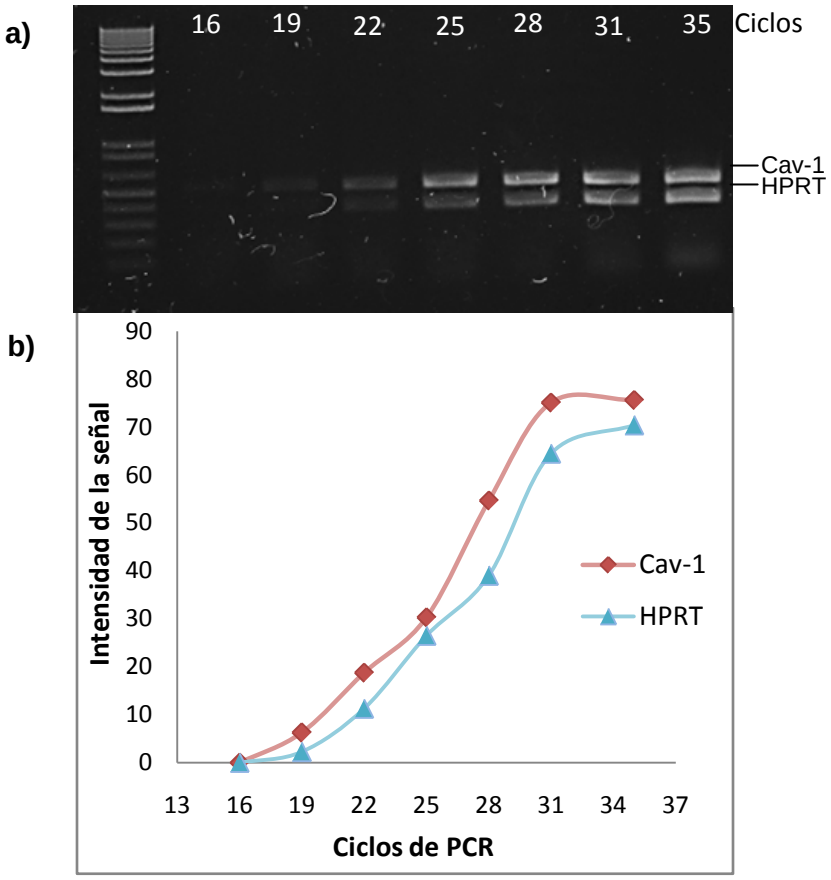


Figura 5-6: Linealidad de respuesta de la PCR para Cav-1 y HPRT.a) Electroforesis en gel de agarosa al 1,5% donde se muestran los productos de la PCR obtenidos a distintos ciclos de amplificación a partir de ADNc de células 3T3-L1 en el día 4 de diferenciación. b) Representación gráfica de la relación número de ciclos/ intensidad de la señal.

Con base en lo anterior, todos los ensayos posteriores se hicieron amplificando ambos genes en reacciones de 24 ciclos y utilizando como plantilla 2µL de ADNc obtenidos a partir de 2µg de ARN total.

5.3. Modulación Farmacológica de PPARγ

5.3.1. Efecto de la Modulación Farmacológica de PPARγ en la Expresión de ARNm de Cav-1 en Adipocitos 3T3-L1

PPARγes reconocido como el regulador maestro del proceso de adipogénesis, ya que es capaz de inducir la expresión de muchos genes propios del adipocito maduro. Para verificar si este receptor nuclear tiene también algún papel en la regulación de Cav-1, cuya expresión aumenta significativamente durante la adipogénesis, se midió la expresión del ARNm de Cav-1 en respuesta al tratamiento con Rosiglitazona, un agonista de PPARγ.

Trabajando con adipocitos 3T3-L1 diferenciados por 4 días, se observó que el tratamiento con Rosiglitazona no afectó significativamente la expresión del ARNm de Cav-1 en ninguno de los tiempos evaluados (Figura 5-7). A 24 horas se observó tan solo un cambio de 2,0% en el nivel de expresión de Cav-1 respecto del grupo control ($p=0,3502$). A 48 horas la diferencia entre células tratadas y su control fue de 4,3% ($p= 0,4303$). Ninguno de estos cambios es estadísticamente significativo.

En este experimento también se observó que el nivel del ARNm de Cav-1 disminuyó en el tiempo, independientemente de la presencia del fármaco. Comparado con el tiempo cero, tanto las células control como las tratadas con Rosiglitazona 1µM por 24 horas, mostraron una disminución del 24,3% y 22,9% en la expresión de Cav-1, respectivamente ($p<0,0001$ en ambos casos). A 48 horas, hubo también una ligera tendencia a la disminución en la expresión de Cav-1 por efecto del tiempo en los dos grupos de células (control y tratamiento), aunque no fue estadísticamente significativa comparada con la observada a 24 horas. Tiempos superiores a 48 horas no pudieron ser evaluados por problemas con la obtención de los productos de amplificación de Cav-1.

El resultado de estos experimentos descartaría la participación de PPARγ en la regulación de Cav-1, confirmando lo observado previamente en nuestro grupo en el sentido de que Rosiglitazona no indujo cambios significativos en el nivel de expresión de esta proteína cuando se midió por Wenster Blot, aun después de evaluar diferentes dosis y diferentes tiempos de tratamiento con el fármaco (Sandoval, 2008).

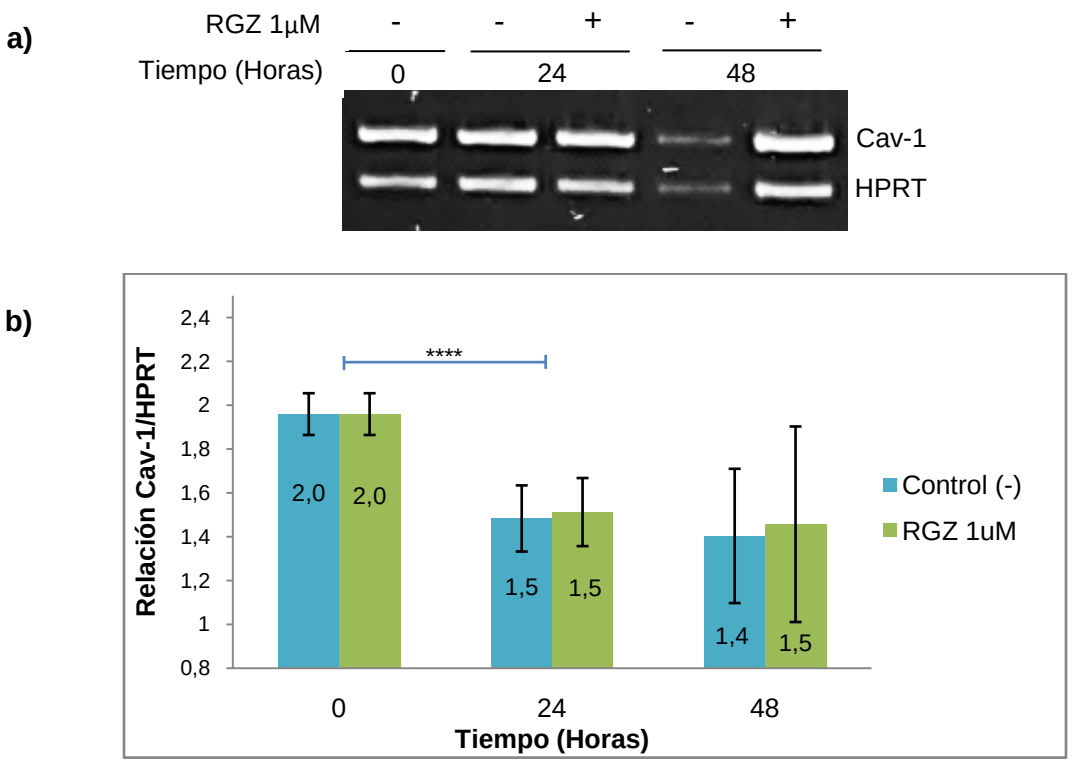


Figura 5-7: Efecto de Rosiglitazona sobre la expresión del ARNm de Cav-1 en adipocitos 3T3-L1 con 4 días de diferenciación: a) Electroforesis en gel de agarosa al 1,5% de los fragmentos amplificados desde células tratadas con Rosiglitazona 1 µM (RGZ 1uM), o con el vehículo de fármaco (Control (-)), durante 0, 24 y 48 horas. La amplificación se llevó a cabo con el protocolo de PCR múltiple previamente estandarizado, se utilizó el gen HPRT como control de normalización del experimento. b) Representación gráfica del análisis densitométrico. Promedio de dos experimentos con 3 réplicas cada uno. (**** p<0,0001).

5.3.2.Actividad del Fármaco

Considerando que en los experimentos anteriores no se observó respuesta al tratamiento con Rosiglitazona (en términos de expresión del ARNm de Cav-1), se realizaron dos

experimentos control para verificar la actividad del lote de fármaco que fue utilizado para la modulación de PPARγ.

En primer lugar, células 3T3-L1 no diferenciadas fueron tratadas con Rosiglitazona 1µMdurante 7 días para verificar si se lograban diferenciar; esto porque es conocido que Rosiglitazona es un inductor de adipogénesis (Tontonoz y col, 1995). Como control positivo, otro grupo de células fue diferenciado con el medio tradicional (siguiendo las indicaciones del numeral 4.1.2), y un tercer grupo de células, mantenido en medio regular, sirvió como control sin diferenciar. La figura 5-8 (a) muestra los resultados de este experimento, en términos de la acumulación de lípidos neutros en los tres grupos de células.

Las células tratadas con Rosiglitazona acumularon más lípidos (26,2%) que las células control, pero menos que las diferenciadas con el protocolo tradicional (32,0% menos), como puede verse en los valores de absorbancia de la solución obtenida al extraer con isopropanol el colorante acumulado en las células (Figura 5-8 b). Las células control no diferenciadas mostraron cierto indicio de acumulación de lípidos probablemente debido al tiempo que estuvieron mantenidas en post-confluencia en medio suplementado con SBF.

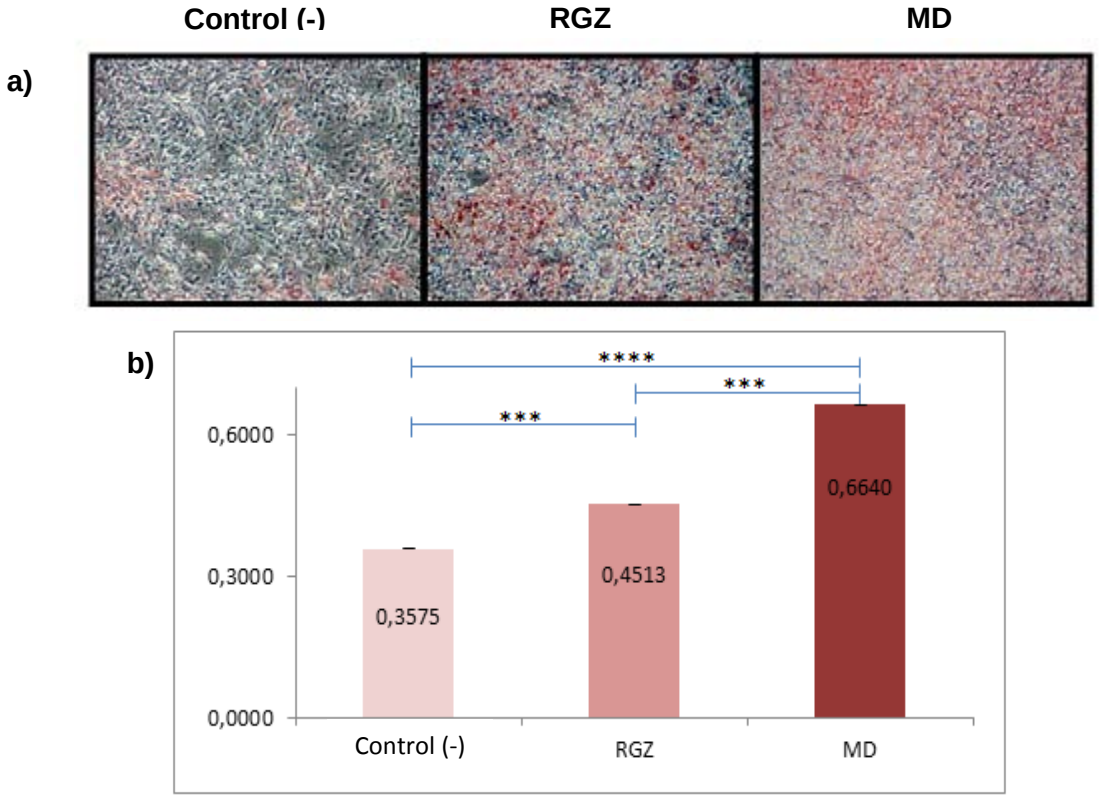


Figura 5-8:Diferenciaciónde células 3T3-L1 con Rosiglitazona.a) Vista microscópica de la tinción de lípidos neutros acumulados en el interior de células. Células 3T3-L1 no diferenciadas fueron mantenidas en medio regular (Control -), tratadas con Rosiglitazona 1μM (RGZ), o diferenciadas con medio de diferenciación (MD). Todos estos tratamientos se realizaron por 7 días. b) Cuantificación del colorante extraído de las células, las barras representan valores de absorbancia a 500 nm, y se muestra el promedio y la desviación estándar de un experimento con 2 réplicas. Todas las fotografías fueron tomadas con un aumento de 100X.(***p<0,001; ****p<0,0001).

Un experimento adicional para verificar la actividad del fármaco utilizado en los ensayos, fue la medición en el cambio de expresión del gen FABP-4 en respuesta a Rosiglitazona. Este gen se expresa en cantidades importantes en adipocitos diferenciados, y no en los pre-adipocitos. Además, se ha reportado que FABP-4 responde *in vivo* e *in vitro* a las tiazolidinedionas (Tontonoz y col, 1995).

La figura 5-9 muestra la diferencia en los niveles de expresión de FABP-4 entre células control y células tratadas con Rosiglitazona 1μM por 48 horas, visto a nivel del ARNm. Tal y como se esperaba, el tratamiento con Rosiglitazona aumentó de manera significativa la

expresión de FABP-4. De hecho, el análisis densitométrico de las bandas del gel mostró un aumento de 6 veces en la expresión de FABP-4 como respuesta al tratamiento con Rosiglitazona. En este experimento los resultados fueron normalizados con β-actina pues el tamaño de los fragmentos amplificados para FABP-4 y HPRT difieren solamente en 22 pb, lo que dificultó su separación sobre geles de agarosa.

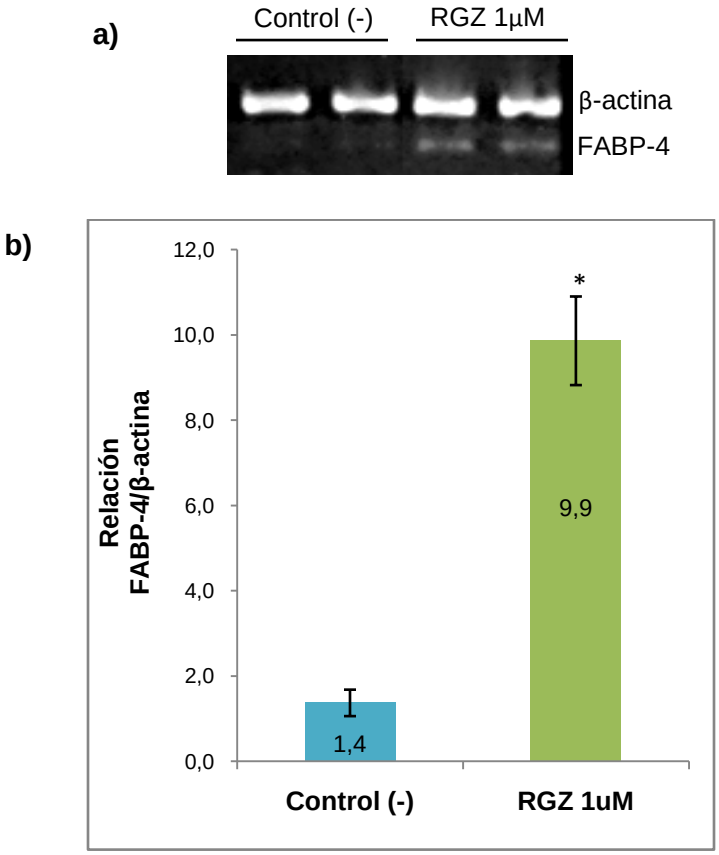


Figura 5-9:Expresión del ARNm de FABP-4 en respuesta a Rosiglitazona**.** Células 3T3-L1 en confluencia fueron tratadas por 48 h con Rosiglitazona 1µM para inducir la expresión de FABP-4. a) Electroforesis en gel de agarosa al 1,5% de los fragmentos amplificados. b) Análisis densitométrico de la expresión del ARNm de FABP-4 en respuesta a Rosiglitazona 1µM (RGZ 1uM) o su vehículo (Control -). * p<0,05. Promedio de un experimento con 2 réplicas.

En conjunto, los resultados de los dos experimentos control realizados, demuestran claramente que la Rosiglitazona utilizada en nuestros experimentos es farmacológicamente activa. Esta observación valida nuestros resultados del efecto de

Rosiglitazona sobre Caveolina-1, en el sentido que no observar efecto del fármaco sobre los niveles del ARNm de Cav-1 indicaría que PPARγ no sería un regulador de Caveolina-1 en el modelo celular 3T3-L1.

5.3.3. Efecto de la Modulación Farmacológica de PPARγ en la Expresión de ARNm de Cav-1 en Células 3T3-L1 No Diferenciadas.

Confirmada la actividad del fármaco (Rosiglitazona) y, por tanto, validado el resultado obtenido en células diferenciadas, según el cual PPARγ no actuaría como regulador de Cav-1, surgió un nuevo interrogante en el curso de esta investigación: ¿Cómo se comportaría la expresión del ARNm de Cav-1 en células 3T3-L1 no diferenciadas?

Es bien sabido que Cav-1 sí es regulada durante el proceso adipogénico (Scherer y col, 1994; Sandoval, 2008; Lay y col, 2009), y que Rosiglitazona, por sí sola, es un inductor de adipogénesis (Figura 5-8). Por esta razón, se procedió a estudiar el efecto de Rosiglitazona sobre la expresión del ARNm de Cav-1 en células 3T3-L1 no diferenciadas. Para ello, se realizaron tratamientos con Rosiglitazona (1 μM) por 4 días. Como control positivo, se midió la expresión de Cav-1 en células incubadas con medio de diferenciación e insulina (10 μg/mL), y como control negativo, se usaron células incubadas sólo en medio completo más metanol (vehículo de Rosiglitazona).

Como respuesta al tratamiento con Rosiglitazona, células 3T3-L1 no diferenciadas mostraron un aumento de 23,1% en el nivel de ARNm de Cav-1 en comparación con el control negativo ($p<0,05$). La inducción de Cav-1 por Rosiglitazona en estas células fue menor que la observada en el control positivo, donde el nivel de ARNm de Cav-1 aumentó un 53,8% con respecto al control negativo sin diferenciar ($p<0,001$) (Figura 5-10).

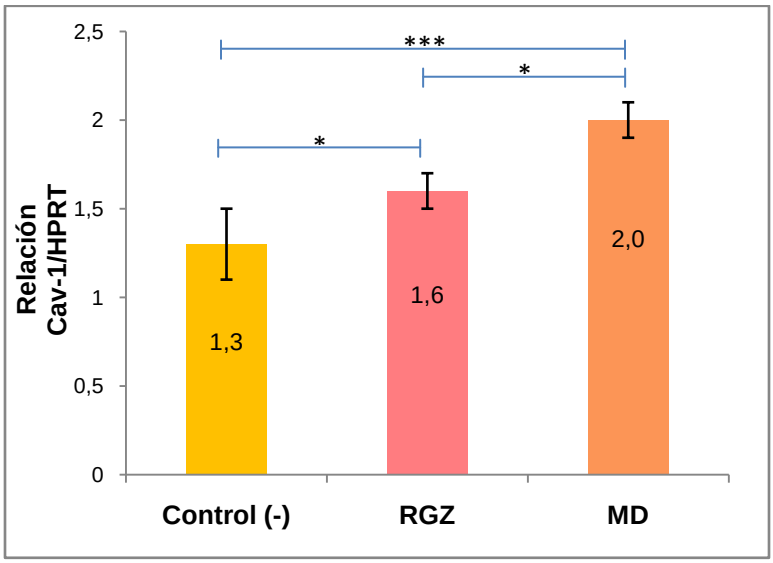


Figura 5-10: Efecto de Rosiglitazona sobre la expresión del ARNm de Cav-1 en células 3T3-L1 no diferenciadas. Células 3T3-L1 sin diferenciar fueron tratadas con medio regular (Control -), con Rosiglitazona 1µM (RGZ), o con medio de diferenciación (MD) siguiendo el protocolo tradicional (48 horas con el medio de diferenciación y 48 horas con insulina 10 µg/mL).Todos los tratamientos se llevaron a cabo por 4 días, después de lo cual se cuantificó el nivel de ARNm por RT-PCR, (*p<0,05; ***p<0,001).

Este último experimento sugiere que el agonista de PPARγ Rosiglitazona sí tiene algún efecto como regulador positivo de la expresión de Cav-1 en células 3T3-L1 no diferenciadas. Claramente, este resultado no coincide con lo observado en células 3T3-L1 diferenciadas (Figura 5-7), lo que podría ser un indicativo de que el mecanismo por el cual ocurre el efecto inductor probablemente no involucre directamente al receptor PPARγ. Hacen falta más experimentos para poder descartar o aceptar definitivamente la participación de PPARγ en la regulación de este gen en nuestro modelo celular.

5.4. Efecto de la Modulación Farmacológica del Receptor de Glucocorticoides en la Expresión del ARNm de Cav-1

Dado que nuestros resultados no pudieron relacionar claramente al receptor PPARγ con la expresión de Cav-1, el siguiente paso fue investigar el potencial papel del Receptor de Glucocorticoides (GR) como regulador de este gen. Para esto, se estudihó el efecto de

Dexametasona sobre la expresión del ARNm de Cav-1 en células 3T3-L1 diferenciadas por 4 días (según numeral 4.1.2).

En primer lugar se realizó un experimento Dosis – Respuesta, donde se midió por RT-PCR el nivel de ARNm de Cav-1 de células tratadas con Dexametasona en concentración entre 0 y 10000nM durante 24 horas.Los resultados se muestran en la Figura 5-11.

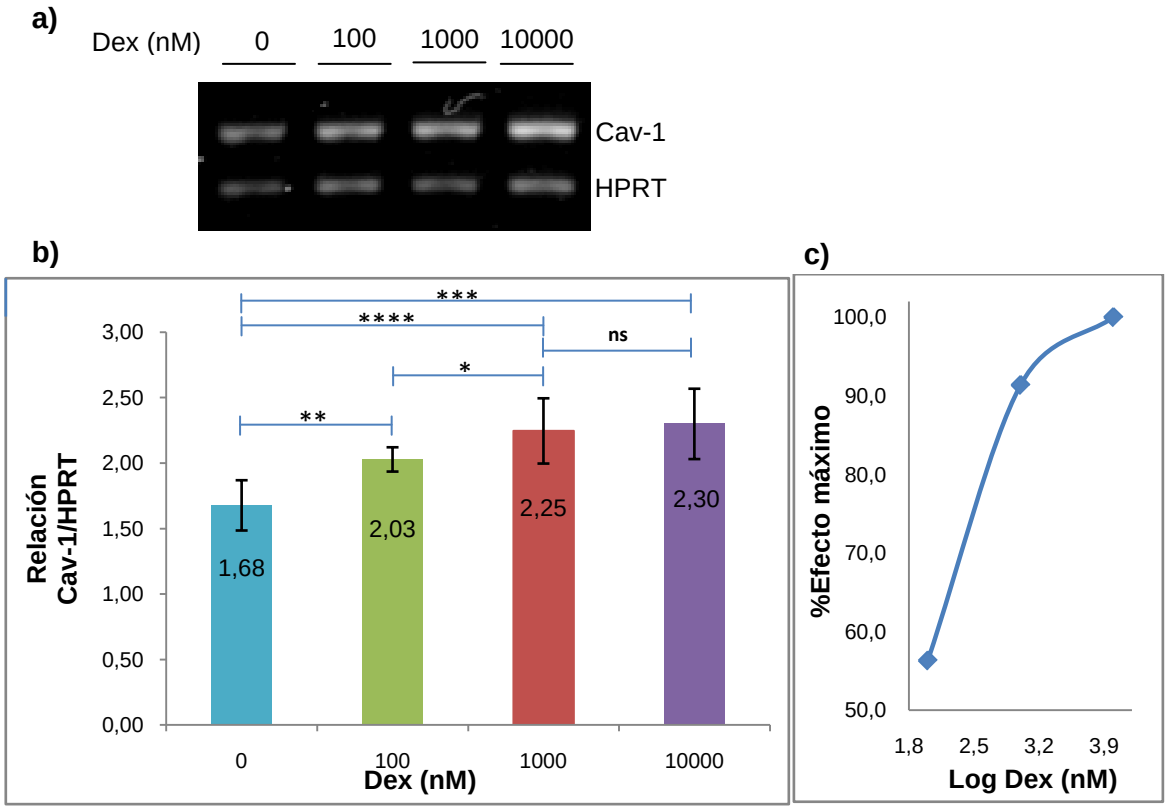


Figura 5-11: Expresión de Cav-1 en respuesta a Dexametasona en adipocitos 3T3-L1 con 4 días de diferenciación.a) Electroforesis en gel de agarosa al 1,5% de los fragmentos amplificados desde adipocitos 3T3-L1 con 4 días de diferenciación, tratados por 24 h con concentraciones crecientes de Dexametasona (Dex) de 0 a 10000 nM. b) Representación gráfica del análisis densitométrico de la curva Dosis Respuesta. (ns: No significativo; *p<0,05; **p<0,01;***p<0,001; ****p<0,0001). c) Curva Dosis-Respuesta logarítmica. Promedio de al menos 3 experimentos cada uno por triplicado.

Como se observa (Figura 5-11), Dexametasona indujo un aumento en la expresión de Cav-1 en forma dependiente de la concentración del fármaco (Coeficiente de Correlación de Spearman = 0,798 con p<0,00001); el efecto es evidente incluso en la concentración

más baja utilizada, 100nM, que da lugar a un aumento de 20,8% en el ARNm de Cav-1 respecto al control ($p<0,01$). Cuando se usó 1000nM de Dexametasona, se aumentó el nivel de expresión del gen en 33,9% con respecto al control. Una concentración del fármaco 10 veces mayor (10 mM) ocasionó un aumento de 37,1% en Cav-1, tan solo un 3% más que la respuesta obtenida con Dexametasona 1000nM, cambio que no representa una diferencia significativa ($p=0,3365$) (Figura 5-11).

En concordancia con lo anterior, la representación logarítmica de esta curva evidenció que el efecto de Dexametasona 10000 nM se encuentra en la zona de respuesta máxima. Suponiendo una relación lineal en el rango de concentraciones de Dexametasona de 100nM a 1000nM, se estimó una concentración efectiva cincuenta (EC_{50}) de 66nM.

Teniendo en cuenta el resultado anterior, donde se evidencia un claro efecto positivo de Dexametasona sobre la expresión del ARNm de Cav-1, a continuación se midió la respuesta frente al tiempo de tratamiento con el fármaco. La concentración de Dexametasonautilizada para estos experimentos fue 1000nM,ya que en la curva Dosis-Respuesta, esta concentración daba una respuesta próxima al máximo.

La figura 5-12 muestra que el efecto de Dexametasona sobre la expresión del ARNm de Cav-1 fue dependiente del tiempo de tratamiento. A 24 horas de tratamiento con el fármaco, la diferencia en el nivel de expresión del ARNm de Cav-1 con respecto al tiempo cero fue de 10% ($p<0,001$).A 48 horas el efecto de Dexametasona es mucho más evidente, dando lugar a un aumentode 2 veces respecto al tiempo cero y 3 veces másrespecto alas células control. La diferencia en la expresión del ARNm de Cav-1 entre células control y células tratadas fue significativa en todos los tiempos muestreados (24 y 48 horas).

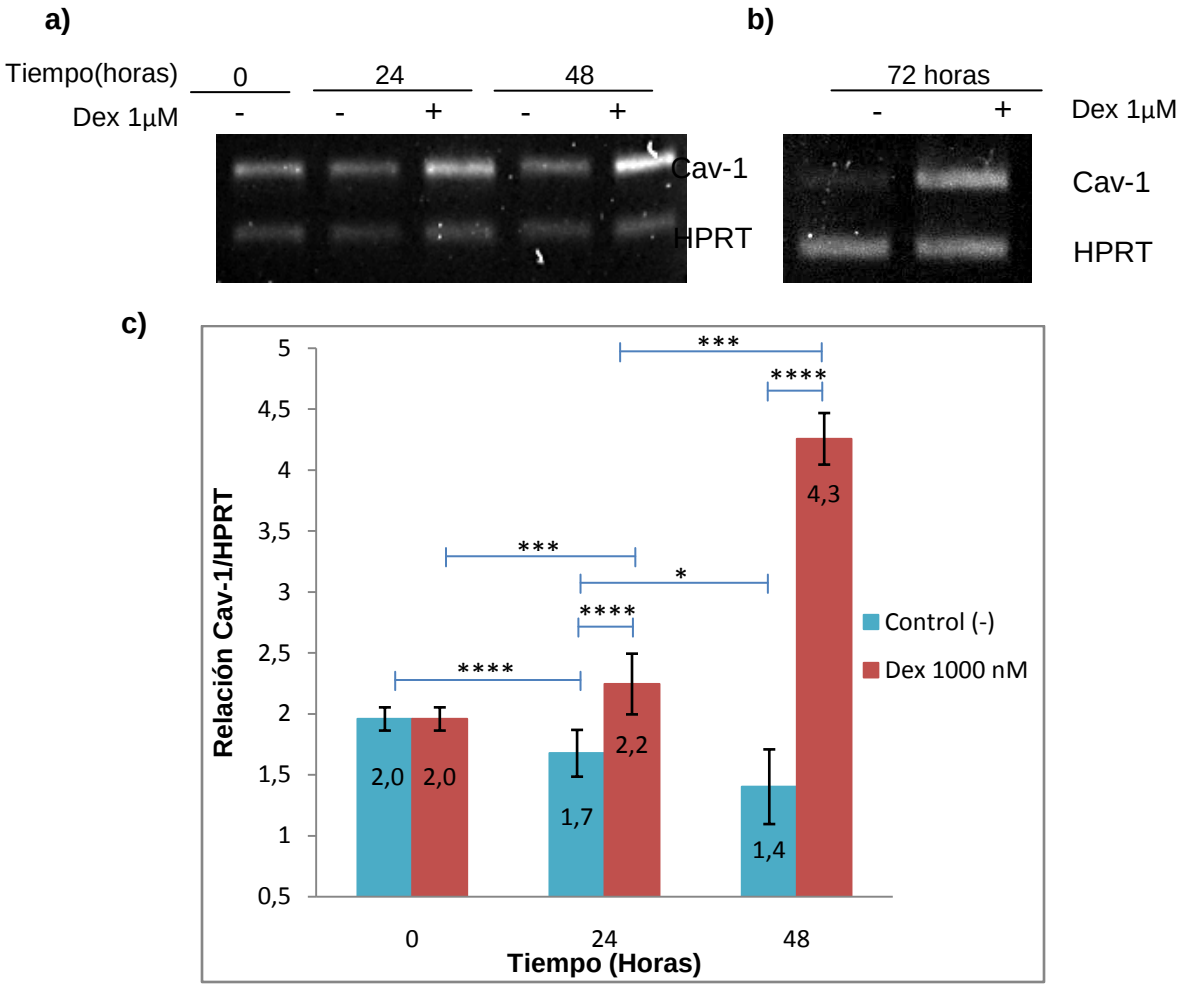


Figura 5-12: Curva Tiempo-Respuesta a Dexametasona de la expresión de Cav-1 en adipocitos 3T3-L1 con 4 días de diferenciación.a) Electroforesis en gel de agarosa al 1,5% de los fragmentos amplificados desde las célulastratadas con Dexametasona 1000nM (Dex 1000 nM), o con el vehículo de fármaco (Control-), durante 0, 24 y 48 h. b) Electroforesis de los fragmentos amplificados desde células tratadas con Dexametasona 1000nM (Dex 1000 nM), o con el vehículo de fármaco (Control-), durante 72 horas. c) Representación gráfica del análisis densitométrico, (*p<0,05;***p<0,001; ****p<0,0001). Promedio de 2 experimentos cada uno por triplicado.

Tiempos de tratamiento superiores a 48 horas no pudieron ser estudiados por problemas con la obtención del producto amplificado (Cav-1) desde células control (Figura 5-12 b), de hecho, es evidente en la gráfica (Figura 5-12 c) que el nivel de expresión del ARNm de Cav-1 en las células que no recibieron tratamiento con el fármaco, disminuyó en el tiempo, probablemente debido a la ausencia de un agente inductor que mantuviera la

expresión del gen. Esto podría explicar la ausencia de bandas para Cav-1 desde células control a 72 horas (Figura 5-12 b).

En conjunto, estos resultadosrefuerzan lo encontrado en los experimentos preliminares realizados en nuestro grupo en el sentido que Dexametasona aumentaríala expresión de Cav-1 en el modelo celular bajo estudio.

5.4.1. Efecto del Antagonista del Receptor de Glucocorticoides, Mifepristona, Sobre la Expresión del ARNm de Cav-1 en Presencia de Dexametasona

Teniendo en cuenta que los experimentos anteriores sugieren que el GR podría estar regulando positivamente la expresión de Cav-1 en adipocitos 3T3-L1, se decidió estudiar el efecto del tratamiento concomitante con Dexametasona y un antagonista del GR (Mifepristona), sobre la expresión del ARNm de Cav-1.

Así, adipocitos 3T3-L1 con 4 días de diferenciación fueron tratados por 24 horas con Dexametasona 1μM o con Dexametasona 1μM más Mifepristona 10μM.Consecuente con lo observado previamente (Figura 5-11), el tratamiento de los adipocitos con Dexametasona por 24 horas, indujo un aumento de 22,7% en el nivelde ARNm de Cav-1 comparado con el control (vehículo) (Figura 5-13). Por su parte, el tratamiento con el antagonista Mifepristona 10μM por 24 horas suprimió por completo el efecto de Dexametasona, puesto que el nivelde ARNm de Cav-1 alcanza el valor del control (Figura 5-13).Este resultado confirmaríala participación del GR en la regulación positiva de la expresión de estegen (Cav-1).

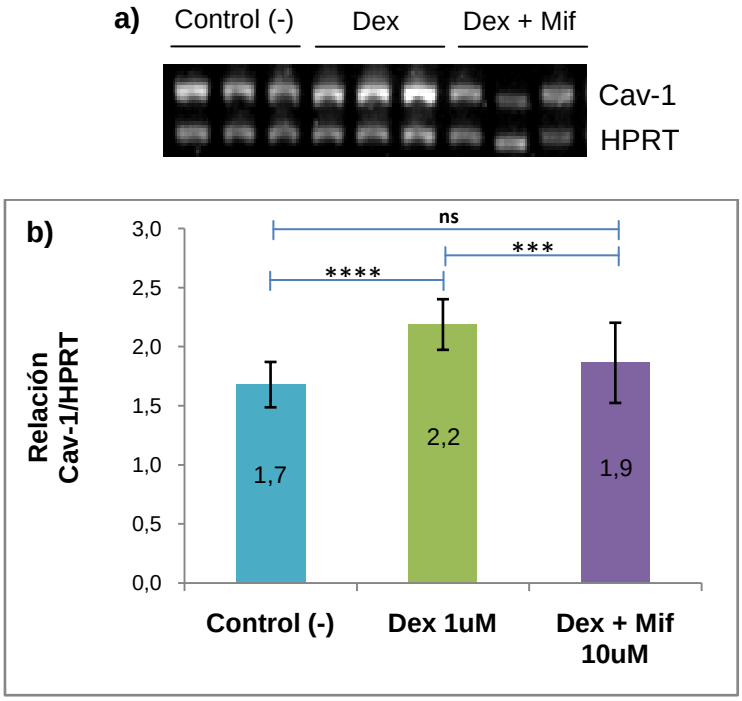


Figura 5-13: Efecto del antagonista del GR Mifepristona, sobre la estimulación mediada por Dexametasona en la expresión de Cav-1 en adipocitos 3T3-L1 con 4 días de diferenciación. a) Electroforesis en gel de agarosaal 1,5% de los fragmentos amplificados desde células tratadas por 24 h con Vehículo (Control -), Dexametasona 1µM (Dex 1uM) o Dexametasona 1µM más Mifepristona 10µM (Dex + Mif 10uM). b) Representación gráfica del análisis densitométrico. (ns:, Nosignificativo; ***p<0,001; ****p<0,0001). Promedio de dos experimentos con 3 réplicas cada uno.

5.4.2. Papel del Receptor de Glucocorticoides en la Expresión de Cav-1 durante la Diferenciación de Células 3T3-L1

El resultado anterior se observó también en células 3T3-L1 sin diferenciar, cuando fueron tratadas con vehículo, Dexametasona 1µM, o Dexametasona 1µM y Mifepristona 10µM durante 48 horas (Figura 5-14).

Interesantemente, las células sin diferenciar presentaron una menor respuesta a Dexametasona, en términos cuantitativos, en comparación con células diferenciadas; específicamente, adipocitos con 4 días de diferenciación tratados por 48 horas con Dexametasona 1µM mostraron un aumento en la expresión del ARNm de Cav-1 de 200% con respecto al control (Figura 5-12), mientras que en las células no diferenciadas, tratadas por el mismo tiempo (48 horas) con la misma concentración del fármaco

(Dexametasona 1µM), el aumento con respecto al control fue tan solo de 61,5% (Figura 5-14). Asimismo, en las células sin diferenciar, Mifepristona revierte el efecto del agonista pero no alcanza a llevar la expresión de Cav-1 al mismo nivel de las células control.

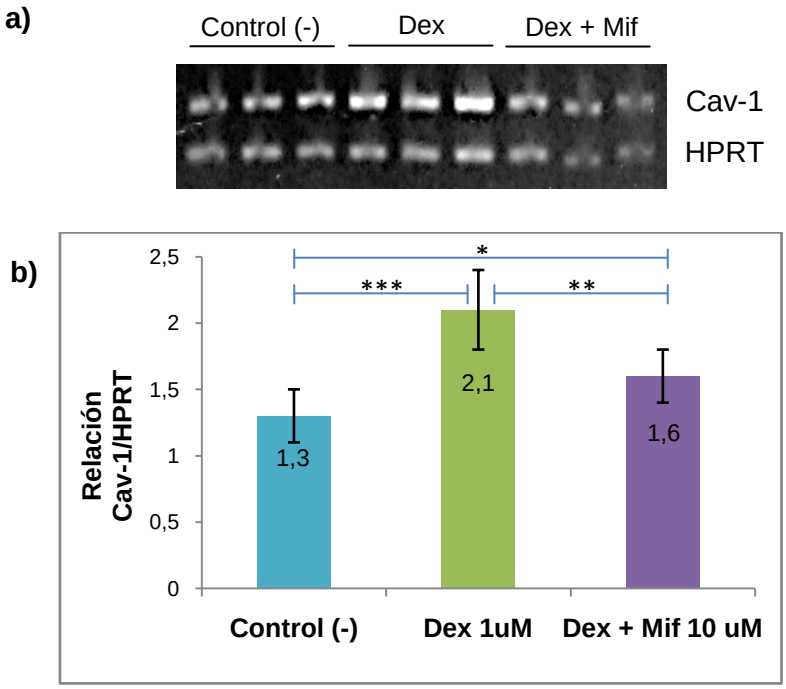


Figura 5-14: Efecto del antagonista Mifepristona, sobre la expresión de Cav-1 en células 3T3-L1 no diferenciadas. Células no diferenciadas (Pre-adipocitos) tratados por 48 horas con vehículo (Control-), Dexametasona 1µM (Dex 1uM) o Dexametsona 1µM más Mifepristona 10µM (Dex + Mif 10 uM). a) Electroforesis en gel de agarosa al 1,5% de los fragmentos amplificados. b) Representación gráfica del análisis densitométrico. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001). Promedio de dos experimentos con 3 réplicas cada uno.

En cualquier caso, Dexametasona provocó un aumento significativo en la expresión del ARNm de Cav-1 en pre-adipocitos 3T3-L1, efecto que fue revertido por Mifepristona, lo que sugiere la participación del GR en la regulación positiva de la expresión del gentambién en las células no diferenciadas. Considerando que este modelo celular es capaz de diferenciarse a adipocitos maduros en presencia de un medio inductor que contiene Dexametasona, estos resultados sugieren que Dexametasona podría ser el verdadero responsable del aumento de Caveolina-1 durante el proceso de adipogénesis.

6. Discusión

6.1. El Medio de Diferenciación Induce Cambios en la Matriz Extracelular de las Células 3T3-L1

Las células 3T3-L1 se diferencian a adipocitos por tratamiento con un medio de diferenciación que contiene insulina, MIX y Dexametasona, moléculas que promueven cambios en el perfil de expresión genética de las células y dan origen al fenotipo diferenciado. Como parte de estos cambios, la MEC de los pre-adipocitos es totalmente remodelada por degradación de la matriz estromal de fibronectina típica de los pre-adipocitos, para dar lugar a la formación de la membrana basal de los adipocitos (Bouloumie y col, 2001; Lilla y col, 2002; Urs y col, 2004)

Lo anterior puede explicar la razón por la cual, durante la adipogénesis, la adhesión de las células al soporte del cultivo se ve seriamente afectada como se describe en los resultados del presente trabajo (Figura 5-1).

Varios autores han reportado la aparición de estos mismos efectos (Rubin y col, 1978; Clavijo y col, 2007; Sandoval, 2008).Asimismo, las observaciones descritas aquí en cuanto a la falta de adhesión de las células en condiciones de diferenciación, son temas comunes de consulta en foros de investigadores que trabajan con esta línea celular, quienes reportan los mismosinconvenientes (BioForum, www.protocol-online.org; www.scientistsolutions.com).

En nuestro trabajo, diferentes medidas fueron tomadas para intentar solucionar el problema: se tuvo cuidado excepcional al cambiar el medio de cultivo evitando el uso de bomba de succión y dejando siempre un remanente de medio en el pozo; se cambió varias veces el número de pases de las células, se hizo prueba de micoplasma, encontrándose el cultivo libre de contaminación con esta bacteria (Anexo A) y se intentó

cultivar las células sobre soportes de gelatina y colágeno. Solamente el pre-tratamiento de los pozos de cultivo con gelatina resolvió el inconveniente.

Por su parte, el tratamiento de los pozos con colágeno tipo II no tuvo ningún efecto benéfico sobre la adherencia de la monocapa ala placa de cultivo.Teniendo en cuenta que las células 3T3-L1 expresan muy poca cantidad de esta proteína, tanto en su forma fibroblástica como en estado diferenciado (Mariman y Wang, 2010), es probable que el colágeno tipo II no participe en los procesos de adherencia en esta línea celular.

A pesar que se ha propuesto que el desprendimiento y la degradación inicial de la MEC al inicio de la adipogénesis permitiría la exposición de la superficie celular a factores de crecimiento y hormonas presentes en el medio de diferenciación, que de otro modo serían secuestradas por la red de proteínas extracelulares (Lilla y col, 2002), en nuestro caso, el soporte de gelatina utilizado en los experimentos no afectó la adipogénesis, como puede ser verificado por las observaciones que demuestran que nuestras células (3T3-L1) si se han diferenciado (Figura 5-3). Además, aún en estas condiciones, la adhesión de las células ala placa de soporte, lo que impedía el uso de bomba de succión para cambiar el medio; esto es indicio de que los procesos de remodelación de la MEC estaban ocurriendo, a pesar de que la matriz de gelatina evitaba el desprendimiento de la monocapa de cultivo.

Células que no fueron sometidas al tratamiento de diferenciación mostraron cierta acumulación de lípidos, como lo destaca la tinción con Oil red O; otros autores también han observado y reportado esta ligera conversión espontánea de fibroblastos a adipocitos (Gregoire y col, 1998),que es atribuida a la presencia de SBF en el medio de crecimiento. Seríaconveniente considerar la utilización de suero no fetal en la etapa de crecimiento de los pre-adipocitos y para el sostenimiento de las células control en experimentos posteriores, ya que éste tiene menor cantidad de factores de crecimiento y por tanto menor capacidad de inducir diferenciación en ausencia de otros factores adipogénicos (ZenBio, Inc, 2010).

6.2. Implementación de un Ensayo de RT-PCR Semi-Cuantitativa para Medir la Expresión de Cav-1 en Células 3T3-L1

Todos los cebadores utilizados, incluso los diseñados en nuestro estudio, dieron lugar a los fragmentos del tamaño esperado para cada gen. Las temperaturas de anidamiento estimadas con base en la secuencia de cada uno, dieron una banda con intensidad aceptable. En experimentos como los realizados aquí,donde se pretende medir cambios en expresión de un gen, es indispensable utilizar un control de normalización para que los cambios en la expresión se muestren en términos relativos a un control constitutivo. Para conseguir que esta relación sea lo más cercana a la realidad, ambos genes, el blanco de estudio y el de normalización, deben medirse en las mismas condiciones; por esa razón la implementación de un ensayo de PCR múltiple redujo grandemente el error asociado al experimento y la desviación de los resultados en comparación a ensayos preliminares que realizamos amplificando por separado el gen blanco y el de normalización, en los cuales no se obtuvieron resultados reproducibles (No mostrado).

En nuestro trabajo se estandarizó un procedimiento de amplificación por RT-PCR semi-cuantitativa, y se trabajó con 24 ciclos de reacción. La amplificación dentro del rango lineal de respuesta aseguraría que se observaran cambios en la expresión de Cav-1, en caso que fuera modificada por el fármaco.En experimentos preliminares realizados con 30 ciclos de amplificación,no se observó cambio alguno en la expresión de Cav-1, incluso en respuesta a Dexametasona. Semejante a lo observado en esta investigación, Hong y col (2004) ya reportaron que, bajo sus condiciones de reacción (las cuales sirvieron de base para la estandarización del método utilizado aquí) se podían observar cambios en la expresión de Cav-1 con 25 ciclos de amplificación, mientras que reacciones realizadas a 30 ciclos ya no muestran cambios perceptibles.

Es de resaltar que a menor número de ciclos empleados en la amplificación, tanto mayor es la exactitud de la medición en cuanto a cambios a nivel de la expresión genética, pues al inicio de la reacción de PCRla señal crece exponencialmente; sin embargo, como el método de cuantificación de la señal utilizado en esta investigación es la densitometría, era indispensable obtener bandas bien definidas. Reacciones de 24 ciclos de

amplificación, permitieron observar una banda de intensidad aceptable dentro del rango lineal.

Aunque existen técnicas avanzadas como la PCR en tiempo real para medir expresión genética, muchas publicaciones internacionales recientes siguen reportando el uso de RT-PCR y densitometría de los geles para este mismo fin (Burgermeister y col, 2003; Llaverías y col, 2004; Barar y col, 2007).La RT-PCR no es una técnica de cuantificación del nivel de expresión en términos absolutos, pero la medición de la respuesta dentro del intervalo lineal, permite detectar de manera confiable diferencias relativas entre los distintos tratamientos. Bajo las condiciones estandarizadas aquí, este método puede ser considerado como semi-cuantitativo,por lo que perfectamente permite detectar cambios en la expresión de los genes de interés con reproducibilidad y pequeñas desviaciones. Más aun, pensamos que si se usa una técnica totalmente cuantitativa, como la qRT-PCR, los cambios observados aquí, deberían ser mayores, y no al contrario. Futuros trabajos de nuestro grupo intentarán realizar dichas mediciones.

6.3. La Modulación Farmacológica de PPARγ No Tiene Efecto Sobre la Expresión del ARNm de Cav-1 en Adipocitos 3T3-L1 Pero Sí Sobre Células Sin Diferenciar

El agonista de PPARγ*,* Rosiglitazona, no indujo cambios en la expresión de Cav-1 en adipocitos 3T3-L1 con 4 días de diferenciación, aun después de mantener el tratamiento con el fármaco durante 48 horas (Figura 5-7).Se ha descrito que en el día 4 de diferenciación, la cantidad de PPARγexpresadaen adipocitos diferenciados con el protocolo tradicional, ya alcanza niveles considerables (Fu y col, 2005). Con base en esto, si PPARγ fuera un regulador positivo de Cav-1 en adipocitos 3T3-L1, al estimular con Rosiglitazona, deberíamos haber sido capaces de observar un cambio positivo en Cav-1, como se ha observado en otros genes regulados por este factor de transcripción. De hecho, varios autores han realizado experimentos con agonistas PPARγ en la línea celular 3T3-L1, encontrando una clara respuesta de los genes blanco incluso pocas horas después de incluir el tratamiento en el medio de cultivo. Por ejemplo, Smith y col

(2001)trataron adipocitos 3T3-L1 con Pioglitazona, otro agonista de PPARγ, encontrando que el fármaco induce la expresión del IRS-2 dentro de las primeras 4 horas de tratamiento con una EC_{50} de 50nM. Rosiglitazona es un agonista más potente que Pioglitazona, por lo que es de esperar que a la concentración utilizada por nosotros (1μM) se observara el efecto dentro de las primeras 24 horas de tratamiento.Otros autores (Martínezy col, 2010) han encontrado respuesta de este fármaco a las 24 horas de tratamientoen términos de inducción genética (gen del IR).

El hecho de que no hayamos observado cambios en la expresión de Cav-1 al tratar los adipocitos 3T3-L1 con Rosiglitazona, sugiere que PPARγ no sería un regulador de Cav-1 en estas células. Ademas, las observaciones de la actividad del fármaco utilizado (Rosiglitazona), para inducir diferenciación (Figura 5-8) einducción de la expresión de FABP-4 en nuestras células (Figura 5-9), refuerzan estos resultados al demostrar que la Rosiglitazona utilizada sí es capaz de producir efectos farmacológicos y que la no respuesta de Cav-1 no es debida a problemas técnicos ni a la pérdida de actividad de nuestro reactivo.

Sandoval (2008), quien midió por Western Blot niveles de proteína Caveolina-1 en respuesta a Rosiglitazona, ya había reportado que el tratamiento con este fármaco no inducía cambios en un rango de concentraciones de 0,005 a 10μM. Nuestros resultados están de acuerdo con esta observación inicial, razón por la cual se descartó la participación de PPARγ en la regulación de Cav-1 en los adipocitos 3T3-L1 sin la realización de experimentos adicionales.

Aunque no se observó diferencias en la expresión de Cav-1 entre células tratadas con Rosiglitazona y células control (tratadas con el vehículo del fármaco), si es claro que ocurre una disminución en la expresión de Cav-1 en el tiempo, resultado que es difícil de explicar teniendo en cuenta que se ha reportado que la expresión del ARNm de Cav-1 aumenta con el tiempo en el medio de diferenciación (Scherer y col, 1994).Veinticuatro horas después de iniciado el experimento, no se observaron diferencias importantes en la cantidad de células viables entre los pozos desde donde se extrajo el ARN que pudieran explicar la disminución en la expresión del gen.La disminución en la expresión de Cav-1 en células que no son inducidas a expresar el gen ha sido reportado por otros autores en líneas celulares de carcicoma humano (Burgermeister y col, 2003).

Interesantemente, Wang y col (2007) encontraron que Rosiglitazona 0,5 µM disminuye la expresión de Cav-1 en adipocitos 3T3-L1 después de 48 horas de tratamiento con el fármaco; varias diferencias metodológicas con respecto al diseño de este estudio pueden explicar este resultado diferente al nuestro: 1) el protocolo de diferenciación utilizado por estos autores incluye la presencia de un agonista endógeno de PPARγ(la prostaglandina J_2);2) el medio de diferenciación se mantuvo por 10 días; en dicho momento la cantidad de PPARγ en los adipocitos es mayor que en el día 4 (Fu y col, 2005) lo que en principio induciría una mayor respuesta; 3) concomitante con el fármaco se incluyó en el medio insulina y glucosa en distintas concentraciones lo que podría tener un efecto en la respuesta;4) la expresión genética fue determinada por PCR en tiempo real, que es un método más sensible que la RT-PCR semicuantitativa para detectar diferencias en expresión.

Hasta este punto, nuestro trabajo, tomado en conjunto con el de otros investigadores (Wang y col, 2007; Sandoval, 2008)permitiría concluir que PPARγ no sería responsable de aumentar la expresión de Cav-1 en adipocitos 3T3-L1, como se había planteado inicialmente por nuestro grupo, razón por la cual, en esta tesis no se realizaron experimentos adicionales con Rosiglitazonautilizando células diferenciadas.

Teniendo en cuenta el papel de Caveolina-1 en la formación de la gota lipídica de los adipocitos (Lay y col, 2009), estos resultados podrían explicar por qué agonistas de PPARγ no generan grandes adipocitos sino una gran cantidad de adipocitos pequeños (Kubota y col, 1999); y estarían de acuerdo con lo que se ha reportado en relación a que en el día 10 de diferenciación,Cav-1 no sólo no es inducida sino que es reprimida por Rosiglitazona (Wang y col, 2007)lo que, a juicio de este investigador, podría funcionar como un mecanismo para controlar la entrada de lípidos en adipocitos en etapas tardías de diferenciación.

Por otro lado, células 3T3-L1 no diferenciadastratadas únicamente con Rosiglitazona 1µMpor 7 días como inductor de diferenciación, mostraron signos típicos del fenotipo diferenciado tales como el cambio de forma (de alargada a redondeada) y la acumulación de lípidos, aunque enmenor grado que las células diferenciadas con el protocolo tradicional (Figura 5-8).

Es sabido que las características fenotípicas adquiridas durante la adipogénesis de este modelo celular incluyen el aumento en la expresión de Caveolina-1 (Scherer y col, 1994; Lay y col, 2009), aunque no se encontraron reportes acerca del comportamiento de esta proteína o su ARNm en células diferenciadas con Rosiglitazona. En todo caso, era de esperar que si Rosiglitazona inducía diferenciación, fuera capaz de inducir también un aumento en la expresión de Cav-1 en los pre-adipocitos.Tal efecto fue efectivamente corroborado en experimentos realizados en esta investigación (Figura 5-10). Sin embargo, el aumento en la expresión de Cav-1 en células 3T3-L1 no diferenciadas,después de 4 días de tratamiento con Rosiglitazona (Figura 5-10),resulta controversial considerando que los experimentos discutidos anteriormente, que fueron realizados por nosotros sobre células diferenciadas, parecían descartar la participación de PPARγ en la regulación de Cav-1 en la línea celular 3T3-L1. Por tal razón, es posible considerar que el aumento observado en la expresión del gen en los pre-adipocitos, no implique la participación directa de PPARγ.

Anteriormente en nuestro grupo, se había medido el nivel de la proteína Caveolina-1 de células 3T3-L1 sin diferenciar, en respuesta al tratamiento por 24 horas con Rosiglitazona (concentración entre 0,005μM – 10μM), sin observar ningún cambio significativo en la expresión (Sandoval, 2008). Estos antecedentes indicarían que la respuesta de los pre-adipocitos a Rosiglitazona es lenta, lo que reforzaría el planteamiento de que el efecto inductor podría ocurrir por un mecanismo distinto a la interacción directa del fármaco con el receptor PPARγ.

Las observaciones de Matthews y col (2009) podrían explicar esta hipótesis ya quesugieren que Rosiglitazona induciría la fosforilación del GR (lo cual es un efecto específico de los ligandos que se unen a este receptor), así como su translocación hacia el núcleo en células HeLa y U20S, independiente de la presencia de PPARγ. Otros autores han demostrado también el comportamiento de Rosiglitazona como agonista del GR (Escribano y col, 2009; Liu y col, 2011).Adicionalmente, los autores (Matthews y col, 2009) indican que la translocación del GR inducida por Rosiglitazona ocurre a una velocidad mucho menor a la que ocasionan los GCs. Suponiendo que este mismo evento ocurra en la línea celular utilizada en esta investigación, se podría explicar el hecho de que Sandoval (2008) no haya observado ninguna respuesta en la expresión de la proteína

Caveolina-1 después de 24 horas de tratamiento de los pre-adipocitos con Rosiglitazona, mientras que en nuestros experimentos, Cav-1 resultó inducido en los pre-adipocitos por tratamiento con Rosiglitazona 1µM durante 4 días. Esta respuesta tardía podría ser resultado de la interacción del fármaco con el GR. De ser así, se podría explicar también el hecho de que, en general, la diferenciación con Rosiglitazona tarda varios días máscomparada con la inducida con medio de diferenciación (el cual contiene Dexametasona) como ha sido reportado por otros autores (Fu y col, 2005). Además, en nuestros experimentos, el menor grado de acumulación de lípidos en células 3T3-L1 diferenciadas con Rosiglitazona (Figura 5-8), es consecuente con la observación de que estas células expresan una cantidad menor de Cav-1 en comparación con aquellas que fueron diferenciadas, por el mismo tiempo (4 días) utilizando el protocolo tradicional (Figura 5-10).

En contraposición con lo anterior, Cav-1 ha mostrado ser inducidorápidamente por agonistas PPARγ en otras líneas celulares, tales como células de adenocarcinoma humano HT-29 (Burgermeister y col, 2003), en las cuales el tratamiento con Rosiglitazona 10µM durante 24 horas, induce un aumento en la expresión de Cav-1 de por lo menos 4 veces con respecto a las células tratadas con el vehículo del fármaco. En macrófagos THP-1, Llaverías y col (2004) observaron que el tratamiento de las células con Rosiglitazona 1µM, aumentaba la expresión de Cav-1 hasta 3 veces, cambio que empieza a ser evidente dentro de las primeras 3 horas de tratamiento. En ambos trabajos, la expresión de Cav-1 fue determinada con RT-PCR, la misma técnica empleada en esta investigación.

Los resultados anteriores indicarían que PPARγ actúa de manera célula- dependiente. Sin embargo, nuestros experimentos no permiten descartar o confirmar con certeza el papel de este receptor nuclear en la regulación de Cav-1 en la línea celular 3T3-L1, experimentos posteriores pretenderán profundizar más en este tema para llegar a una conclusión definitiva. Por ahora podemos concluir que la modulación farmacológica de PPARγ no aumenta el nivel de expresión del ARNm de Cav-1 en adipocitos 3T3-L1 después de 48 horas de tratamiento, pero si induce la expresión del gen en células no diferenciadas, cuando son tratadas por 96 horas con el fármaco.

6.4. La Modulación Farmacológica del Receptor de Glucocorticoides Afecta la Expresión del ARNm de Cav-1

En nuestro trabajo se demostró por primera vez que el agonista del GR, Dexametasona, induce la expresión de Cav-1 tanto en pre-adipocitos 3T3-L1 como en adipocitos diferenciados. A las 24 horas de tratamiento con Dexametasona, el efecto máximo observado en las células diferenciadas fue un aumentocercano a40% en la expresión de Cav-1. El coeficiente de correlación lineal calculado tiene un valor bajo debido a que el tratamiento con Dexametasona 1000 nM induce ya la respuesta máxima con lo que el nivel de expresión de Cav-1 con 10000nM de Dexametasona se sale de la linealidad en la curva. En la curva tiempo-respuesta, el tratamiento con Dexametasona ocasiona igualmente una respuesta lineal (R^2= 84%).

A 48 horas, Dexametasona induce un aumento mucho más relevante en el nivel de expresión de Cav-1 que el observado a 24 horas.A 72 horas, la expresión de Cav-1 observada fue de hasta 4 veces más que la del tiempo cero (datos no mostrados), sin embargo estas observaciones no fueron reproducibles por las razones explicadas anteriormente, en el sentido que los productos de amplificación obtenidos en este tiempo no eran fácilmente cuantificables.

En cuanto a las células que no recibieron tratamiento con Dexametasona, la observación de niveles de Cav-1 disminuidos en el tiempo, semejante a lo observado en los experimentos con Rosiglitazona, podrían ser indicio de que Dexametasona es necesaria para mantener la expresión de Cav-1 en adipocitos maduros, ya que en estas condiciones no se observan mayores diferencias en la intensidad de las bandas obtenidas para el gen de normalización pero si para Cav-1. La disminución de la expresión de Cav-1 en el tiempo, en células que no reciben ninguna señal adicional ya ha sido reportada en otra línea celular (Burgermeister y col, 2003).

En consonancia con los resultados de nuestra investigación están los experimentos de Barar y col, (2007) quienes demostraron que Dexametasona aumenta los niveles del ARNm de Cav-1 en cultivo primario de células epiteliales alveolares tipo II(ATII) de rata y en la línea celular de epitelio de pulmón humano A549. La respuesta de Cav-1 a Dexametasona en cada una de estas líneas celulares resultó ser diferente: mientras que

en ATII Cav-1 fue inducida rápidamente (viéndose aumentada incluso después de 1 hora de tratamiento),las células A549 muestran solo un ligero aumento a 24 horas, que llega a ser significativo a partir de las 48 horas. Este último comportamiento es semejante al observado en células 3T3-L1 en esta investigación y fue también revertido por acción del antagonista del GR, Mifepristona.

Los autores utilizaron igualmente RT-PCR semicuantitativa para obtener estos resultados.Interesantemente, Barar y col (2007) demuestran que los efectos de Dexametasona sobre Cav-1 en estas líneas celulares no involucran la región promotora del gen de Cav-1, mecanismo que podría explicar la tardía respuesta de Cav-1 al tratamiento con Dexametasona.

La menor respuesta de los pre-adipocitos a Dexametasona puede deberse a que estas células expresan menor cantidad de GR que los adipocitos maduros (Fu y col, 2005). El tratamiento con Mifepristona en estas células no devuelve totalmente la expresión de Cav-1 al mismo nivel del control, resultado que era de esperar teniendo en cuenta el bajo nivel de expresión de Cav-1 en pre-adipocitos.

Con los resultados de nuestra investigación se demuestra por primera vez que Dexametasonasería un inductor de la expresión de Cav-1 en células 3T3-L1, y que un antagonista del GR es capaz de revertir dicho efecto, indicando que la expresión de Cav-1 en esta línea celular sería regulada por el receptor nuclear de Glucocorticoides. Todos estos resultados confirman y extienden los experimentos preliminares realizados en el grupo (Sandoval, 2008).

Las observaciones de Matthews y col (2008) respaldan la regulación de Cav-1 por GCs, al demostrar la localización del GR en fracciones caveolares de la membrana celular de la línea A549 y la mediación de Caveolina-1 en algunos de los efectos de Dexametasona en fibroblastos de ratón.

La regulación positiva de Cav-1 por GR observada en este trabajo llama la atención teniendo en cuenta el conocimiento que se tiene hasta ahora sobre el papel de Caveolina-1 comoproteína que favorece la respuesta a insulina, mientras que agonistas del GR, incluyendo Dexametasona, han sido relacionados con resistencia a insulina *in vivo* e *in*

vitro(Jindal y col, 1996; Everson y col, 1999; Ariza y col, 1998; Fischer y col, 1997; Biering y col, 2000; Gulliford y col, 2006; Uzu y col, 2007; Christ-Crain y col 2008; Pinzón, 2010).

En trabajos anteriores de nuestro grupo se ha observado que el tratamiento con Dexametasona10nM o mayor por 48 horas, es capaz de disminuir en un 100%el consumo de glucosa dependiente de insulina en adipocitos 3T3-L1 (Pinzón, 2010). En adipocitos humanos, Christ-Crain y col (2008) observaron que el tratamiento con Dexametasona 1µM por 24 horas inhibe en un 89% la entrada de glucosa estimulada por insulina. Así, queda claro que Dexametasona, en las condiciones estudiadas en este trabajo, produce resistencia a insulina en estas líneas celulares, aunque los mecanismos por los cuales ocurre el efecto no hayan sido bien definidos.

Caveolina-1 ha sido relacionada con una mayor respuesta a insulina. Varios autores reportan que,en ausencia de Caveolina-1, la expresión del IR en células adiposas disminuye (Ishikawaa y col, 2005; Frühbeck y col, 2007; González y col, 2009). Sin embargo, en otros aspectos de la señalización a insulina no existe un consenso entre los autores respecto del papel de Caveolina-1. González y col (2009), encontraron que adipocitos 3T3-L1 con expresión disminuida de Cav-1 por transfección con ARN de interferencia (ARNi), presentan alteraciones en la captura de glucosa inducida por insulina y niveles disminuidos de Glut-4, sin cambios netos en la expresión de su ARNm, lo que supondría que Caveolina-1 estabiliza este transportador y evita su degradación. Yuan y col (2007) en cambio, presentan evidencias de que el ARNi para Cav-1 no afecta la captura de glucosa en células 3T3-L1 pero si disminuye significativamente la internalización de Glut-4 desde la membrana plasmática cuando la señal de la insulina es removida. Ros-Baró y col (2001) ya habían reportado esta misma observación al bloquear la formación de caveolas en células 3T3-L1 por tratamiento con filipina y nistatina.

Las observaciones de estos últimos autores (Ros-Baró y col, 2001; Yuang y col, 2007), podrían explicar la aparentemente contradicción en la regulación positiva de Cav-1 por Dexametasona.Teniendo en cuenta que en condiciones normales los corticoides antagonizan la acción de la insulina para evitar la hipoglicemia cuando los niveles de glucosa en sangre han sido normalizados(Lambillotte, 1997),el aumento en la expresión de Cav-1 por GCs podría ser un mecanismo para facilitar la internalización y disminución de la expresión de Glut-4 y evitar la captura de glucosa por parte de las células una vez la

insulina ha ejercido su efecto. Es probable que una desregulación de este proceso, ocasionado por ejemplo, por la administración exógena de GC como ocurre en los experimentos presentados aquí, evite la disposición del Glut-4 en la membrana celular, efecto que puede ser mediado por Caveolina-1, ocasionando resistencia a insulina.

Otros resultados que soportan los obtenidos aquí, son los reportados por Xu y col (2009) quienes encontraron que Dexametasona induce la fosforilación y regulación negativa de perilipina en cultivo primario de adipocitos, efecto que es restaurado por Mifepristona. Como ya había sido mencionado antes en este trabajo (Marco teórico, sección 1.2.1), perilipina se une a la gota lipídica para evitar la acción de enzimas lipolíticas, y la fosforilación o disminución de expresión de esta proteína, favorece la lipólisis. Al igual que la Dexametasona, Caveolina-1 se ha relacionado con la fosforilación de perilipina en adipocitos de ratón (Cohen y col, 2004). Según esto y los resultados encontrados aquí, la fosforilación de perilipina inducida por Dexametasona podría ser resultado del aumento en la expresión de Cav-1. De este modo, Caveolina-1 puede aportar a la aparición de resistencia a insulina por eventos relacionados con lipotoxicidad.

Experimentos muy preliminares de nuestro grupo, realizados *in vivo*, mostraron también una tendencia al aumento en la expresión de Cav-1 en tejido adiposo de ratones ICR expuestos de manera crónica a Dexametasona 0,075mg/Kg (Salazar, 2010; Gámez y Montoya, 2010). A pesar de que la diferencia con el grupo control no fue estadísticamente significativa, debido probablemente al pequeño número de individuos utilizados y a las variaciones inherentes a los modelos *in vivo*, estos resultados estarían de acuerdo con los obtenidos *in vitro*; de hecho, los ratones expuestos a Dexametasona presentaron una ligera tendenciaa responder menos eficientemente a la insulina en las últimas semanas de tratamiento (Gámez y Montoya, 2010), pero no se midieron otros parámetros metabólicos que refuercen la hipótesis planteada en el párrafo anterior.

Por otro lado, experimentos realizados por Vogel y col (1998) sugieren que, además de Caveolina-1, son requeridos otros factores para la generación de las caveolas. Según esto, es posible que el aumento en la expresión de Cav-1 en células 3T3-L1 no genere necesariamente un mayor número de caveolas por lo cual no es de esperar que haya una mejor respuesta a insulina en estas condiciones.

Los resultados de esta investigación abren un nuevo camino para la investigación del papel de Cav-1 en la función del tejido adiposo y su relación con respuesta a insulina.

7. Conclusiones

1. El medio de diferenciación afecta negativamente la adherencia de la monocapa celular 3T3-L1 al plato de cultivo, efecto que es revertido por pre-tratamiento del plato con gelatina.

2. Rosiglitazona no afectó la expresión de Cav-1 en células 3T3-L1 diferenciadas, pero sí lo hizo en células no diferenciadas, lo cual mantiene en duda el papel de PPARγ en la regulación de este gen en células 3T3-L1.

3. Dexametasonaafectó positivamente la expresión de Cav-1 en células 3T3-L1 diferenciadas y no diferenciadas, efecto que fue revertido por Mifepristona.Estosugiere un papel regulador positivo del GR sobre la expresión génica de Cav-1 en células 3T3-L1.

4. Dexametasona sería, al menos en parte, responsable del aumento en la expresión de Cav-1 durante la adipogénesis de pre-adipocitos 3T3-L1, efecto que sería mediado por su receptor endógeno (GR).

Bibliografía

Agarwal, A. & Garg, A., (2006).Genetic Disorders of Adipose Tissue Development, Differentiation, and Death.*Annu Rev Genomics Hum Genet*, 7: 175 – 199.

Albrektsen, T., Frederiksen, K., Holmes, W., Boel, E., Taylor, K., Fleckner, J (2002). Novel Genes Regulated by the Insulin Sensitizer Rosiglitazone During Adipocyte Differentiation. *Diabetes*, 51:1042–1051.

Ariza, R., Barile, L. A., Frati, A. C., & Baltazar, P., (1998). Risk factors for steroid diabetes in rheumatic patients.*Arch Med Res*, 29: 259– 262.

Arner P., Eckel R.H., (1998). Adipose tissue as a storage organ. In: Bray GA, Bouchard C, James WPT, eds. Handbook of obesity. New York: Marcel Dekker, Inc.; 379–395p.

Bakopanos, E., Silva E., (2000). Thiazolidinediones Inhibit the Expression of β3 Adrenergic Receptors at a Transcriptional Level. *Diabetes,*49:2108–2115.

Barar, J., Campbell, L., Hollins, A., et al., (2007).Cell selective glucocorticoid induction of caveolin-1 and caveolae in differentiating pulmonary alveolar epithelial cell cultures.*Biochem Biophys Res Commun*, 359: 360–366.

Beltowski, J., (2006). Leptin and atherosclerosis.*Atherosclerosis*, 189: 47–60.

Biering, H., Knappe, G., Gerl, H., & Lochs, H., (2000).Prevalence of diabetes in acromegaly and Cushing syndrome.*Acta Med Austriaca,* 27: 27– 31.

BioForum. Cell Biology / 3T3-L1. http://www.protocol-online.org/forums/index.php. Consultado en 10-02-11.

Bist, a., Fielding, PE., Fielding, CJ., (1997). Two sterol regulatory element-like sequences mediate up-regulation of caveolin gene transcription in response to low density lipoprotein free cholesterol*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A*., 94:10693-10698.

Blanquart, C., Barbier, O., Fruchart, J., Staels, B., Glineur, C., (2003). Peroxisome proliferator-activated receptors: regulation of transcriptional activities and roles in inflammation*. J Steroid Biochem Mol Biol,* 85:267-273.

Bodwell, J., Webster, J., Jewell, C., Cidlowski, J., Hu, J., Munck, A., (1998).Glucocorticoid Receptor Phosphorylation: Overview, Function and Cell Cycle-Dependence. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol*, 65:91-99.

Bollag, GE., Roth, RA., Beaudoin, J., Mochly-Rosen, D., Koshland, DE., (1986). Protein kinase C directly phosphorylates the insulin receptor in vitro and reduces its protein-tyrosine kinase activity. *PNAS*, 83:5822-5824.

Bouloumie A., Sengene`s C., Portolan G., Galitzky J., Lafontan M., (2001). Adipocyte produces matrix metalloproteinases 2 and 9: involvement in adipose differentiation. *Diabetes,* 50:2080–2086.

Brunton, L., Goodman, L., Blumenthal, D., Buxton, I. Goodman and Gilman's manual of pharmacology and therapeutics. Ed. Illustrated, McGraw-Hill Professional, 2007. 1032-1035p.

Burgermeister, E., Tencer, L., Liscovitch, M., (2003).Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma upregulates caveolin-1 and caveolin-2 expression in human carcinoma cells.*Oncogene,* 22: 3888-3900.

Caperuto, L.C., Anhe, G.F., Amanso, A.M., et al, (2006). Distinct regulation of IRS proteins in adipose tissue from obese aged and dexamethasone-treated rats*. Endocrine*, 29:391–398.

Chen, W., Dang, T., Blind, R., et al., (2008). Glucocorticoid Receptor Phosphorylation Differentially Affects Target Gene Expression. *Mol Endocrinol,* 22:1754-1766.

Cheung CY, Li S., Chen D., Brace RA., (2010). Regulation of caveolin-1 expression and phosphorylation by VEGF in ovine amnion cells.*Reprod Sci*., 17:1112-1119.

Chinetti, G., Fruchart JC., Staels, B., (2005). Role of the PPAR family of nuclear receptors in the regulation of metabolic and cardiovascular homeostasis: new approaches to therapy. *Curr Opin in Pharmacol*, 5:177–183.

Chou, F., Wang, P., Kulp, S., Pinzone J., (2007).Effects of Thiazolidinediones on Differentiation, Proliferation, and Apoptosis.*Mol Cancer Res*, 5:523-530.

Christ-Crain, M., Kola, B., Lolli, F., et al, (2008). AMP-activated protein kinase mediates glucocorticoidinduced metabolic changes: a novel mechanism in Cushing's syndrome. *FASEB J*., 22:1672–1683.

Christodoulidesa,C., Vidal, A., (2010). PPARs and adipocyte function. *Mol Cell Endocrinol*, 318:61–68.

Cinti S., (2005). The adipose organ. *PLEFA*, 77: 9-15.

Clavijo, MA., Gómez-Camargo, D., Gómez-Alegría, C., (2007). Adipogénesis in vitro de células 3T3-L1. *Revista MED,* 15: 170-176.

Cohen, AW., Razani, B., Wang, XB., et al., (2003). Caveolin-1-deficient mice show insulin resistance and defective insulin receptor protein expression in adipose tissue. *Am J Physiol Cell Physiol*, 285:C222-C235.

Cohen, A., Razani, B., Schubert, W., et al., (2004), Role of caveolin-1 in the modulation of lipolysis and lipid droplet formation, *Diabetes*, 53: 1261–1270.

Costas, G., Athina, G., Stamatios, T., (2009).Peroxisome proliferator-activated receptor-γ (PPAR-γ) ligands as potential therapeutic agents to treat arthritis.*Pharmacol Res* 60:160–169.

Couet J., Li S., Okamoto T., Ikezu T., Lisanti MP., (1997a). Identification of peptide and protein ligands for the caveolinscaffolding domain: implications for the interaction of caveolin with caveolae-associated proteins*. J Biol Chem*, 272:6525–6533.

Couet J,.Li S., Okamoto T., Scherer PS., Lisanti MP. (1997b). Molecular and cellular biology of caveolae: paradoxes and plasticities. *Trends Cardiovasc Med,* 7:103–110.

Couet J., Sargiacomo M., Lisanti MP., (1997c). Interaction of a receptor tyrosine kinase, EGF-R, with caveolins: caveolin binding negatively regulates tyrosine and serine/threonine kinase activities. *J Biol Chem,* 272:30429–30438.

Datson, NA., Morsink, MC., Meijer, OC., de Kloet, ER., (2008). Central corticosteroid actions: Search for gene targets. *Eur J Pharmacol,* 583: 272-289.

Encío IJ., Detera-Wadleigh SD., (1991). The genomic structure of the human glucocorticoid receptor.*J Biol Chem,*266:7182-7188.

Engelman, J., Zhang, X., Galbiati, F., et al., (1998a). Molecular Genetics of the Caveolin Gene Family: Implications for Human Cancers, Diabetes, Alzheimer Disease, and Muscular Dystrophy. *Am. J. Hum. Genet*, 63: 1578–1587.

Engelman, J., Zhang, X., Galbiati, F., Lisanti, MP., (1998b). Chromosomal localization, genomic organization, and developmental expression of the murine caveolin gene family (Cav-1, -2, and -3): Cav-1 and Cav-2 genes map to a known tumor suppressor locus (6-A2/7q31). *FEBS Letters*, 429:330-336.

Engelman, J., Zhang, X., Lisanti, MP., (1999). Sequence and detailed organization of the human caveolin-1 and -2 genes located near the D7S522 locus (7q31.1) Methylation of a CpG island in the 5P promoter region of the caveolin-1 gene in human breast cancer cell lines. *FEBS Letters*, 448:221-230.

Escribano, L., Simóna, AM., Pérez-Mediavillaa, A., Salazar-Colochoa, P., Del Ríoa, J., Frechilla, D., (2009). Rosiglitazone reverses memory decline and hippocampal glucocorticoid receptor down-regulation in an Alzheimer's disease mouse model. *Biochem Biophys Res Commun*, 379:406-410.

Everson, G. T., Trouillot, T., Wachs, M., et al., (1999). Early steroid withdrawal in liver transplantation is safe and beneficial. *Liver Transpl Surg,* 5:S48– S57.

Felig P., Frohman L., (2001). Endocrinology & metabolism.4th edition.McGraw-Hill Professional, México D.F. 837-838p.

Fielding, C., Bist, A., Fielding, PE., (1997). Caveolin mRNA leves are up-regulated by free cholesterol and down-regulated by oxysterols in fibroblast monolayers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*, 94: 3753-3758.

Fielding C., (2006). Lipid rafts and caveolae: from membrane biophysics to cell biology. Ed Ilustrada. Wiley-VCH.177p.

Fisher, J. E., Smith, R. S., Lagrandeur, R., & Loren, R. P. (1997). Gestational diabetes mellitus in women receiving beta-adrenergics and corticosteroids for threatened preterm delivery. *Obstet Gynecol,* 90: 880–883.

Fischer, P., Möller, P., Bindl, L., Melzner, I., Tornqvist, H., Debatin, KM., Wabitsch, M., (2002). Induction of Adipocyte Differentiation by a Thiazolidinedione in Cultured, Subepidermal, Fibroblast-Like Cells of an Infant with Congenital Generalized Lipodystrophy .*J Clin Endocrinol Metab*, 87:2384-2390.

Fra, A., Pasqualetto, P., Mancini, M., Sitia, R., (2000).Genomic organization and transcriptional analysis of the human genes coding for caveolin-1 and caveolin-2.*Gene* 243:75–83.

Frühbeck G., Gomez-Ambrosi J., Muruzabal F.J., Burrell M.A., (2001).The adipocyte: a model for integration of endocrine and metabolic signaling in energy metabolism regulation. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 280: 827-847.

Fruhbeck, G., López M., & Diéguez, C., (2007). Role of caveolins in body weight and insulin resistance regulation.*Trends Endocrinol Metab*, 18: 177-182.

Fu, M., Sun, T., Bookout, A., Downes, M., Yu, R., Evans, R., Mangelsdorf, D., (2005). A Nuclear Receptor Atlas: 3T3-L1 Adipogenesis,*Mol Endocrinol,* 19:2437–2450.

Gámez, M., Montoya, J., (2010). Estudio exploratorio para el desarrollo de un modelo animal de resistencia a insulina inducido por corticoides. Trabajo de grado Pre-grado en Farmacia. Departamento de Farmacia, Universidad Nacional de Colombia.

Germain, P., Altucci, L., Bourguet, W., Rochette-Egly, C., Gronemeyer, H., (2003). Nuclear receptor superfamily: Principles of signaling. *Pure Appl. Chem.*, 75: 1619–1664.

Germain, P., Satels, B., Dacquet, C., Spedding, M., Laudet, V., (2006).Overview of Nomenclature of Nuclear Receptors.*Pharmacol Rev,* 58:685–704.

González, E., Lopez C., Calvo, M., Palacin M., Zorzano A., Camps, M., (2009). Caveolin-1 loss of function accelerates glucose transporter 4 and insulin receptor degradation in 3T3-L1 adipocytes. *Endocrinology,* 150: 3493-3502.

Goossens, G., (2008). The role of adipose tissue dysfunction in the pathogenesis of obesity-related insulin resistance.*Physiology & Behavior*, 94:206–218.

Gregoire FM., Smas CM., Sul, HS., (1998). Understanding adipocyte differentiation.*Physiol Rev*, 78:783–809.

Gregoire, F., (2001). Adipocyte Differentiation: From Fibroblast to Endocrine Cell. *Exp Biol Med*, 226:997–1002.

Griffin, ME., Marcucci, MJ., Cline, GW., et al., (1999). Free fatty acid-induced insulin resistance is associated with activation of protein kinase C theta and alterations in the insulin signaling cascade. *Diabetes*, 48:1270–1274.

Gross, B., Fruchart, JC.,& Stael, B., (2005). Peroxisome Proliferator-Activated Receptor β/δ: A novel target for the reduction of atherosclerosis. *Drug Discovery Today,* 2: 237-243.

Gulliford, M.C., Charlton, J., & Latinovic, R., (2006). Risk of Diabetes Associated With Prescribed Glucocorticoids in a Large Population. *Diabetes Care*, 29: 2728-2729.

Gupta, BP., & Lalchhandama, K., (2002). Molecular mechanisms of glucocorticoid action.*Curr. Sci.*, 83: 1103 – 1111.

Henegariu, O., Heerema, NA., Dlouhy, SR., Vance, GH., Vogt, PH., (1997). Multiplex PCR: critical parameters and step-by-step protocol. *BioTechniques*, 23:504-511.

Hong, S., Huo, H., Xu, J.,Liao, K., (2004). Insulin-like growth factor-1 recpetor signaling in 3T3-L1 adipocyte differentiation requires lipid rafts but not caveolae. *Cell Death Differ*, 11: 714-723.

Huber, K., Christ, G., Wojta, J., Gulba, D., (2001). Plasminogen activator inhibitor type-1 in cardiovascular disease.*Thromb Res*, 103 (S1):S7-S19.

Ishikawaa, Y., Otsua, K., Oshikawaa, J., (2005). Caveolin; different roles for insulin signal?.*Cell Signal*, 17: 1175 – 1182.

Jiang, G., Dallas-Yang, Q., Li, Z., Szalkowski, D., Liu, F., Shen, X., (2002).Potentiation of insulin signaling in tissues of Zucker obese rats after acute and longterm treatment with PPARγ agonists.*Diabetes*, 51:2412–2419.

Jindal RM, Sidner RA, Hughes D, et al., (1996). Metabolic problems in recipients of liver transplants.*Clin Transplant,* 10: 213-217.

Kallen CB., Lazar MA., (1996). Antidiabetic thiazolidinediones inhibit leptin (ob) gene expression in 3T3-L1 adipocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93: 5793-5796.

Kato, K., Satoh, H., Endo, Y. et al., (1999). Thiazolidinediones down-regulate plasminogen activator inhibitor type 1 expression in human vascular endothelial cells: A possible role for PPARgamma in endothelial function. *Biochem Biophys Res Commun*, 258:431-435.

Kim, Y., Cho, H., Jung, W., Kim, S., Cheon, H., (2007). Phosphatase and Tensin Homolog Deleted on Chromosome 10 Suppression Is an Important Process in Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-γSignaling in Adipocytes and Myotubes. *Mol Pharmacol* 71:1554–1562.

Kubota N., Terauchi Y., Miki H., et al, (1999). PPAR gamma mediates high-fat diet-induced adipocyte hypertrophy and insulin resistance. *Mol Cell,* 4: 597–609.

Lambillotte, C., Gilon, P., Henquin, J.C., (1997). Direct glucocorticoid inhibition of insulin secretion. An in vitro study of dexamethasone effects in mouse islets. *J. Clin. Invest*. 99: 414–423.

Lay, S., Blouin, C., Hajduch, E., Dugail, I., (2009). Filling up adipocytes with lipids.Lessons from Caveolin-1 deficiency.*Bichim Biophys Acta,* 1791: 514-518.

Lazennec, G., Canaple, L., Saugy, D., Wahli, W., (2000). Activation of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) by their ligands and protein kinase A activators. *Mol. Endocrinol,* 14: 1962–1975.

Le, C., Teeters, K., Miyasato, S., et al., (2008). Down-regulation of Caveolin-1, an Inhibitor of Transforming Growth Factor-β Signaling, in Acute Allergen-induced Airway Remodeling.*J Biol Chem,* 283: 5760-5768.

Lei, M., Tan, X., Qureshi, N., Morrison, D., (2005). Regulation of Cellular Caveolin-1 Protein Expression in Murine Macrophages by Microbial Products.*Infect Immun*, 73: 8136-8143.

Lilla, J., Stickens, D., Werb, Z., (2002). Metalloproteases and Adipogenesis: A Weighty Subject. *Am J Pathol,* 160: 1551-1554.

Liu, N., Liu, JT., Ji, YY., Lu, PP., (2011). Rosiglitazone Regulates C-reactive Protein-induced Inflammatory Responses Via Glucocorticoid Receptor-mediated Inhibition of p38 Mitogen-activated Protein Kinase-Toll-like Receptor 4 Signal Pathway in Vascular Smooth Muscle Cells.*J Cardiovasc Pharmacol*,57:348-356.

Llaverías, G., Vázquez-Carrera, M., Sánchez, RM., Noé, V., Ciudad, CJ., Laguna, JC., Alegret, M., (2004). Rosiglitazone upregulates caveolin-1 expression in THP-1 cells through a PPAR-dependent mechanism. *J Lipid Res*, 45: 2015-2024.

Mariman, E., Wang, P., (2010). Adipocyte extracellular matrix composition, dynamics and role in obesity.*Cell. Mol. Life Sci.,* 67:1277–1292.

Martínez, L., Berenguer, M., Bruce, C., Marchand-Brustel, Y., Govers, R., (2010). Rosiglitazone increases cell surface GLUT4 levels in 3T3-L1 adipocytes through an enhancement of endosomal recycling. *Biochem Pharmacol,* 79:1300–1309.

Matthews,L., Berry, A., Ohanian, V., Ohanian, J., Garside, H., Ray D., (2008). Caveolin Mediates Rapid Glucocorticoid Effects and Couples Glucocorticoid Action to the Antiproliferative Program. *Mol Endocrinol,* 22:1320–1330.

Matthews, L., Berry, A., Tersigni, M., D'Acquisto, F., Ianaro, A., Ray, D., (2009). Thiazolidinediones Are Partial Agonists for the Glucocorticoid Receptor. *Endocrinology,* 150:75-86.

Mayerson, AB., Hundal, RS., Dufour, S., et al., (2002). The Effects of Rosiglitazone on Insulin Sensitivity, Lipolysis, and Hepatic and Skeletal Muscle Triglyceride Content in Patients With Type 2 Diabetes. *Diabetes,* 51: 797-802.

Michalik, L., Auwerx, J., Berger, J., et al., (2006). International Union of Pharmacology. LXI. Peroxisome Proliferator-Activated Receptors. *Pharmacol Rev,* 58:726–741.

Miles, PB., Barak, Y., He, W., Evans, RM., Olefsky, JM., (2000). Impoved insulin-sensitivity in mice heterozygous for PPAR-gamma deficiency.*J Clim Invest,* 105: 287-292.

Murphy, G., Holder, J., (2000). PPAR-g agonists: therapeutic role in diabetes, inflammation and cancer. *TiPS*, 21: 469-474.

Nishimura, M., Koeda, A., Suzuki, E.,et al., (2006). Effects of prototypical drug-metabolizing enzyme inducers on mRNA expression of housekeeping genes in primary cultures of human and rat hepatocytes.*Biochem Biophys Res Commun*, 346: 1033–1039.

Nishimura M., Nikawa, T., Kawano, Y., Nakayama, M., Ikeda, M., (2008).Effects of dimethyl sulfoxide and dexamethasone on mRNA expression of housekeeping genes in cultures of C2C12 myotubes.*Biochem Biophys Res Commun*, 367: 603–608.

Nissen, S., Wolski, K., (2007).Effect of Rosiglitazone on the Risk of Myocardial Infarction and Death from Cardiovascular Causes.*N Engl J Med*, 356:2457-2471.

Ost, A., Ortegren, U., Gustavsson, J., Nystrom, FH., Stralfors, P., (2005). Triacylglycerol is synthesized in a specific subclass of caveolae in primary adipocytes, *J. Biol. Chem.*, 280: 5–8.

Pedersen, SB., Jonler, M., Richelsen, B., (1994).Characterization of regional and gender differences in glucocorticoid receptors and lipoprotein lipase activity in human adipose tissue.*J Clin Endocrinol Metab,* 78:1354-1359.

Pinzón, A., (2010). Desarrollo preliminar de un modelo celular de resistencia a insulina: Estudio Preliminar. Tesis de Maestría en Ciencias Farmacéuticas. Departamento de Farmacia, Universidad Nacional de Colombia.

R Development Core Team, (2008). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL http://www.R-project.org.

Rasband, W.S., ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, http://rsb.info.nih.gov/ij/, 1997-2005.

Razani, B., Rubin, CS., & Lisanti, MP., (1999). Regulation of cAMP-mediated Signal Transduction via Interaction of Caveolins with the Catalytic Subunit of Protein Kinase A. *J. Biol. Chem*, 274: 26353- 26360.

Razani, B., Combst, T., Wang, et al., (2002). Caveolin-1-deficient mice are lean, resistant to diet-induced obesity, and show hypertriglyceridemia with adipocyte abnormalities. *J. Biol. Chem*, 277: 8635- 8647.

Rivers C., Levy A., Hancock J., Lightman S., Norman MJ., (1999). Insertion of an amino acid in the DNA-binding domain of the glucocorticoid receptor as a result of alternative splicing.*Clin Endocrinol Metab*, 84:4283-4286.

Rodríguez-Escudero, I., Roelants, F.M., Thorner, J., Nombela, C., Molina, M. & Cid, V.J. (2005). Reconstitution of the mammalian PI3K/PTEN/Akt pathway in yeast.*Biochem. J.*, 390: 613–623.

Ros-Baró, A., López-Iglesias, C., Peiró, S., Bellido, D., Palacín, M., Zorzano, A., Camps, M., (2001). Lipid rafts are required for GLUT4 internalization in adipose cells. *PNAS*, 98:12050-12055.

Rubin CS., Hirsch A., Fung C., Rosen OM., (1978). Development of hormone receptors and hormonal responsiveness in vitro.Insulin receptors and insulin sensitivity in the preadipocyte and adipocyte forms of 3T3-L1 cells.*J Biol Chem,* 253: 7570-7578.

Salazar, D., (2010). Efecto de dexametasona sobre la expresión de CAV-1, IRS-2 y GLUT-1 en tejido adiposo de ratón. Trabajo de grado Pre-grado en Farmacia. Departamento de Farmacia, Universidad Nacional de Colombia.

Sandoval A., (2008). Modulación farmacológica de PPARγ y su efecto en la expresión de caveolina-1 en células 3T3-L1. Tesis de Maestría en Ciencias Farmacéuticas. Departamento de Farmacia, Universidad Nacional de Colombia.

Schäcke, H., Döcke, W., Asadullah, K., (2002). Mechanisms involved in the side effects of glucocorticoids. *Pharmacol Ther*, 96:23– 43.

Scherer PE., Lisanti MP., Baldini G., Sargiacomo M., Mastick CC., Lodish HF., (1994). Induction of caveolin during adipogenesis and association of GLUT4 with caveolin-rich vesicles.*J Cell Biol,* 127:1233-1243.

Scherer PE., Okamoto T., Chun M., Nishimoto I., Lodish HF., Lisanti MP., (1996). Identification, sequence, and expression of caveolin-2 defines a caveolin gene family. *Proc Natl Acad Sci USA*, 93:131–135.

Schoonjans K., Peinado J., Lefebvre A.M., et al, (1996). PPARalpha and PPARgamma activators direct a distinct tissue-specific transcriptional response via a PPRE in the lipoprotein lipase gene. *EMBO J,* 15: 5336-5348.

Schwencke, C., Braun-Dullaeus, R., Wunderlich, C., Strasser, R., (2006). Caveolae and caveolin in transmembrane signaling: Implications for human disease. *Cardiovasc Res,* 70: 42 – 49.

Scientist solutions. LIFE SCIENCE DISCUSSIONS/ General Tissue Culture / 3T3-L1 cells die in culture. www.scientistsolutions.com/. Consultado en 10-02-11.

Semple, R.K., Chatterjee, V.K., O'Rahilly, S., (2006). PPAR gamma and human metabolic disease.*J. Clin. Invest.*, 116: 581–589.

Sevillano J., de Castro, J., Bocos, C., Herrera, E., Ramos, P., (2007). Role of Insulin Receptor Substrate-1 Serine 307 Phosphorylation and Adiponectin in Adipose Tissue Insulin Resistance in Late Pregnancy.*Endocrinology*, 148: 5933-5942.

Shaw, N., Elholm, M., Noy, N., (2003). Retinoic Acid Is a High Affinity Selective Ligand for the Peroxisome Proliferator-activated Receptor β/δ. *J Biol Chem*, 278: 41589-41592.

Shibasaki, M., Takahashi, K., Itou, T., et al., (2002).Alterations of insulin sensitivity by the implantation of 3T3-L1 cells in nude mice. A role for TNF-α?.*Diabetologia*, 45: 518-526.

Simonyte, K., Rask, E., Näslund, I., et al., (2009). Obesity Is Accompanied by Disturbances in Peripheral Glucocorticoid Metabolism and Changes in FA Recycling. *Obesity*, 17: 1982–1987.

Smith, RM., Harada, S., Smith, JA., Zhang, S., Jarett, L., (1998). Insulin-induced protein tyrosine phosphorylation cascade and signaling molecules are localized in a caveolin-enriched cell membrane domain. *Cell Signal*, 10: 355-362.

Smith, U., Gogg, S., Johansson, A., Olausson, T., Rotter, V., y Svalstedt, B., (2001). Thiazolidinediones (PPARγ agonists) but not PPARα agonists increase IRS-2 gene expression in 3T3-L1 and human adipocytes, *FASEB*, 15: 215–220.

Sonoda, J., Pei, L., Evans, R., (2008). Nuclear Receptors: Decoding Metabolic Disease. *FEBS Lett*, 582: 2–9.

Su, AI., Wiltshire, T., Batalov, S., et al., (2004). A gene atlas of the mouse and human protein-encoding transcriptomes.*Proc Nat. Acad Sc. U.S.A*., 101: 6062–6067.

Tamori, Y., Masugi, J., Nishino, N., Kasuga, M., (2002). Role of Peroxisome Proliferator–Activated Receptor in Maintenance of the Characteristics of Mature 3T3-L1 Adipocytes.*Diabetes*, 51: 2045- 55.

Tonelli, J., Li, W., Kishore, P., Pajvani, UB., Kwon, E., Weaver, C., Scherer, PE., Hawkins, M., (2004). Mechanisms of early insulin-sensitizing effects of thiazolidinediones in type 2 diabetes.*Diabetes*, 53: 1621–1629.

Tontonoz, P., Hu, E., Spiegelman, BM., (1995). Regulation of adipocyte gene expression and differentiation by peroxisome proliferator activated receptor gamma. *Curr Opin Genet Dev*, 5: 571-76.

Turner, J., Muller C., (2005). Structure of the glucocorticoid receptor (NR3C1) gene 5' untranslated region: identification, and tissue distribution of multiple new human exon 1. *J Mol Endocrinol*, 35:283-292.

Urs, S., Smith, C., Campbell, B., et al., (2004). Gene Expression Profiling in Human Preadipocytes and Adipocytes by Microarray Analysis.*J. Nutr,* 134: 762–770.

Uzu, T., Harada, T., Sakaguchi, M., et al., (2007). Glucocorticoid-Induced Diabetes Mellitus: Prevalence and Risk Factors in Primary Renal Diseases. *Nephron Clin Pract,* 105: 54-57.

Van Den Heuvel, P., Schulze,A., Burgering, B., (2005). Direct control of caveolin-1 expression by FOXO transcription factors.*Biochem. J*., 385: 795–802.

Van der Horst, A., Burgering, BM., (2007). Stressing the role of FoxO proteins in lifespan and disease.*Nat Rev Mol Cell Biol*, 8: 440–450.

Vegiopoulos, A., Herzig, S., (2007).Glucocorticoids, metabolism and metabolic diseases.*Mol Cell Endocrinol*, 275: 43–61.

Vogel, U., Sandvig, K., Van Deurs, B., (1998). Expression of caveolin-1 and polarized formation of invaginated caveolae in Caco-2 and MDCK II cell. *J Cell Sci*, 111: 825-832.

Wang, L., Takaku, S., Wang, P., et al., (2006). Ganglioside GD1a regulation of caveolin-1 and Stim1 expression in mouse FBJ cells: Augmented expression of caveolin-1 and Stim1 in cells with increased GD1a content. *Glycoconjugate J,* 23: 303-315.

Wang P., Renes J., Bouwman F., Bunschoten A., Mariman E., Keijer J., (2007). Absence of an adipogenic effect of rosiglitazone on mature 3T3-L1 adipocytes: increase of lipid catabolism and reduction of adipokine expression. *Diabetologia,* 50:654-665.

Weatherman, RV., Fletterick, RJ., Scanlan, TS., (1999). Nuclear-receptor ligands and ligand-binding domains.*Annu Rev Biochem,* 68: 559-81.

Wilding, J., (2006). Thiazolidinediones, Insulin Resistance And Obesity: Finding A Balance. *Int J Clin Pract.*, 60:1272-1280.

Williams, TM., Lisanti, MP., (2004). The caveolin proteins.*Genome Biol*, 5: 214.

Wu, Z., Xie, Y., Morrison, RF., Bucher, NL., y Farmer, SR., (1998). PPARγ induces the insulin-dependent glucose transporter GLUT4 in the absence of C/EBPα during the conversion of 3T3 fibroblasts into adipocytes, *J Clin Invest*, 101: 22–32.

Xie, W., Evans, RM., (2001). Orphan nuclear receptors: the exotics of xenobiotics. *J Biol Chem*, 276:37739–37742.

Xu, Ch., He, J., Jiang, H., et al., (2009). Direct Effect of Glucocorticoids on Lipolysis in Adipocytes. *Mol Endocrinol*, 23: 1161–1170.

Yamamoto, M., Toya, Y., Schwencke, C., Lisanti, MP., Myers, M., Ishikawa, Y., (1998). Caveolin is an activator of insulin receptor signaling. *J Biol Chem*, 273:26962-26968.

Yuan, T., Hong S., Yao, Y., Liao, K., (2007). Glut-4 is translocated to both caveolae and non-caveolar lipid rafts, but is partially internalized through caveolae in insulin-stimulated adipocytes. *Cell Research*, 17:772–782.

ZenBio, Inc, (2010). 3T3-L1 Cell Care Manual Maintenance and Differentiation of 3T3-L1 Preadipocytes to Adipocytes.Disponible en http://www.zen-bio.com/pdf/ZBM0009.013T3L1CareprotocolRV08.08.pdf.

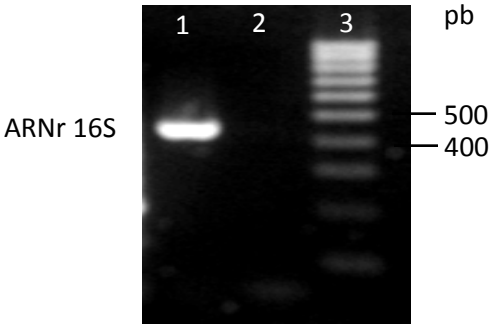
Anexo A: Diagnóstico de Micoplasma en Cultivo de Células 3T3-L1 por PCR

Para el diagnostico de micoplasma se utilizó un par de cebadores que amplifican un fragmento de 463 pb del gen del ARN ribosomal (ARNr) 16S de micoplasma que cubre un amplio espectro de especies de esta bacteria. La secuencia de los cebadores utilizados fue la siguiente:

Sentido: 5´- GGC GAA TGG GTG AGT AAC ACG – 3´
Antisentido: 5´- CGG ATA ACG CTT GCG ACC TAT G – 3´

La amplificación se llevo a cabo según las instrucciones del proveedor(IDT, USA) utilizando como plantilla 5µL del sobrenadante del cultivo de células 3T3-L1 con al menos 7 días de crecimiento. Como control positivo se utilizó sobrenadante de un cultivo contaminado con micoplasma.

La siguiente figura muestra que el cultivo de células 3T3-L1 utilizado en estos experimentos está libre de micoplasma, este diagnostico se repitió en varias ocasiones para hacer seguimiento al cultivo celular obteniendo siempre resultados negativos.



Diagnóstico de contaminación con micoplasma en el cultivo de células 3T3-L1. Carril1: Control positivo, fragmento del gen del ARNr 16S de micoplasma; carril 2: Sobrenadante de células 3T3-L1, libre de micoplasma; carril3: Marcador de Peso molecular.