

## **INFORME CIENTÍFICO DE BECA**

*“Participación de Quinasa Dependiente de Ciclina 4 (Cdk4) en la determinación de los precursores adipocitarios del tejido adiposo blanco”*

**BECARIO:** Portales Andrea Estefanía

**DIRECTOR:** Giovambattista Andrés

**TIPO DE BECA:** Beca de Entrenamiento 2014

**DURACIÓN:** 01/10/2014-01/04/2015

**LUGAR DE TRABAJO:** Instituto Multidisciplinario de Biología Celular  
(IMBICE CIC-CONICET)

## INTRODUCCIÓN

La obesidad es una enfermedad multifactorial en la que convergen factores genéticos y ambientales que en conjunto resultan en un balance energético positivo. Se define como un exceso de tejido adiposo (TA) que se vuelve disfuncional y contribuye a la aparición de las alteraciones metabólicas propias de esta enfermedad, tales como: Diabetes Mellitus tipo 2, enfermedades cardiovasculares, hiperglicemia, dislipidemia y varios tipos de cáncer, entre otras <sup>1 2</sup>.

En mamíferos es posible distinguir dos linajes adipocitarios distintos, que se localizan en diferentes regiones anatómicas del organismo; los adipocitos blancos y los adipocitos pardos. Los adipocitos blancos se distribuyen principalmente en dos reservorios de tejido adiposo blanco (TAB) que son el intra-abdominal o visceral y el subcutáneo. Estos adipocitos se caracterizan por ser univacuolares, y aunque la función principal de los mismos es el almacenamiento de la energía excedente en forma de lípidos, también actúan como células endócrinas siendo capaces de secretar hormonas y citoquinas, tales como leptina y adiponectina, que regulan la saciedad y el metabolismo <sup>3</sup>. Estudios epidemiológicos han demostrado que la acumulación de TAB abdominal incrementa el riesgo de desarrollar las alteraciones endocrino-metabólicas asociadas a la obesidad y el sobrepeso, mientras que la acumulación de TAB subcutáneo lo disminuye <sup>4 5</sup>.

Por su parte, los depósitos clásicos de tejido adiposo pardo (TAP) se encuentran localizados en la región interescapular en roedores y en la zona del cuello en humanos. A diferencia de los adipocitos blancos, los adipocitos pardos se caracterizan por ser multivacuolares y contener gran cantidad de mitocondrias lo cual está relacionado con la función que desempeñan; en ellos, la energía se disipa en forma de calor gracias a la presencia en la membrana interna de las mitocondrias de la proteína desacoplante (Ucp-1) que desacopla el gradiente de protones de la síntesis de ATP en un proceso conocido como termogénesis <sup>6 7</sup>.

En los últimos años han aparecido dispersos en los depósitos clásicos de TAB clusters de adipocitos con capacidad termogénica que expresan Ucp-1 a los cuales se los ha denominado beige o brite (por *brown in white*) <sup>8</sup>. Se ha observado que su aparición (*browning* del TA) puede promoverse mediante la estimulación de los receptores  $\beta$  adrenérgicos o el tratamiento con agonistas de PPAR $\gamma$  <sup>9 10</sup>. De manera similar a los adipocitos pardos, los beige son multiloculares, poseen elevado contenido de mitocondrias y expresan marcadores específicos del TAP. No obstante, los adipocitos beige se consideran un tipo celular distinto de los pardos ya que su capacidad termogénica se manifiesta solo si son estimulados de manera adecuada, mientras que en condiciones basales, su fisiología sería más similar a la de los adipocitos blancos.

El interés en este tercer tipo de adipocitos surge de estudios donde se ha demostrado en modelos animales que la estimulación del *browning* del TA genera resistencia al desarrollo de obesidad en animales sometidos a dietas con alto contenido en grasa <sup>11 12</sup>. Otra de las evidencias muestra que ratones transgénicos para Ucp-1 sufren una reducción tanto de la masa de TA como de los niveles de triglicéridos en sangre <sup>13</sup>. De esta manera, promover la diferenciación de las células mesenquimales residentes en la fracción estroma vascular del tejido adiposo blanco a adipocitos beige sería una manera de reducir el balance energético positivo y ayudaría a contrarrestar las afecciones relacionadas con la obesidad y el sobrepeso.

En la actualidad todavía no resulta claro cuáles son los factores intervinientes en el proceso de determinación y balance de los progenitores hacia uno u otro linaje adipocitario. Es conocido que diversos componentes de las vías de control del ciclo celular, además de su función descrita en el mismo, también participan en la regulación del metabolismo, cumpliendo un rol integrador entre ambos procesos <sup>14</sup>. Por este motivo, ha surgido la inquietud de estudiar la posible vinculación entre las vías de control del ciclo celular y la determinación de los progenitores adipocitarios.

La regulación del ciclo celular está a cargo de proteín-quinasa heterodiméricas que constan de una subunidad reguladora, a la cual se denomina ciclina, y una subunidad catalítica con actividad quinasa, quinasa dependiente de ciclina (Cdk por sus siglas en inglés). Las Cdk actúan fosforilando sitios reguladores de algunas proteínas modulando así la actividad de las mismas; pero solo son funcionales si se encuentran asociadas a una ciclina, que son las que determinan el sustrato target de fosforilación.

Un paso clave en la diferenciación adipocitaria *in vitro* consiste en la re-entrada de preadipocitos arrestados en G0 al ciclo celular <sup>15</sup>, lo cual implica la activación de las ciclinas/Cdks de fase G1 que controlan la transición G1/S. Particularmente la vía de señalización de la que forma parte Cdk4, la vía ciclinaD/Cdk4-RB-E2F, está presente en la mayoría de las células y actúa en dicho punto de control. Básicamente, cuando el complejo ciclinaD/Cdk4 es activado por señales mitógenas procede fosforilando a RB (proteína del retinoblastoma). En su estado hipofosforilado, RB forma un complejo con los factores E2F impidiendo el progreso a través del ciclo celular. La hiperfosforilación de RB induce la liberación de los factores de transcripción efectores de esta vía (E2F) que funcionan activando o reprimiendo la transcripción de sus genes target <sup>16</sup>.

En lo que al TA respecta, diversos componentes de la vía *cycD/Cdk4-pRB-E2F* han mostrado un rol activo y en ciertas ocasiones independiente en la adipogénesis<sup>17</sup>. Si nos centramos específicamente en Cdk4, se ha propuesto que esta proteína cumple un rol dual en el proceso adipogénico; por un lado, funciona en la fase de expansión clonal mitótica de los preadipocitos por la vía clásica de activación del ciclo celular a través de los complejos E2F que median la transcripción de PPAR $\gamma$ , desencadenando así el inicio de la fase de diferenciación terminal. Por otro lado, se ha demostrado que durante la etapa de diferenciación terminal tiene un rol independiente de su función en el ciclo celular, regulando de manera positiva la sensibilidad a la insulina y el transporte de glucosa en adipocitos maduros, y la diferenciación terminal propiamente dicha a través de la regulación directa de la actividad de PPAR $\gamma$  <sup>18</sup>.

No obstante, hasta el momento no ha sido reportado si Cdk4 desempeña algún papel en la etapa previa a la diferenciación de los precursores, la determinación. En dicha etapa, las células mesenquimales presentes en la fracción estroma vascular de los tejidos adultos se restringen a diferenciarse a un linaje celular específico. En nuestro caso en particular, nos resulto interesante investigar si Cdk4 estaba involucrada en la elección de un linaje adipocitario u otro por las CM del tejido adiposo.

## OBJETIVOS

1. *Estudiar el efecto de la inhibición de la actividad de Cdk4 sobre la determinación de los precursores adipocitarios presentes en el tejido adiposo blanco abdominal y subcutáneo de ratones macho adultos.*
2. *Contribuir a la formación académica de la estudiante.*

## MATERIALES Y MÉTODOS

Para el presente estudio se utilizaron ratones macho adultos de la cepa C57BL/6 criados en el bioterio del IMBICE, los cuales fueron alimentados *ad libitum* y mantenidos en cuartos con temperatura controlada ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ) y ciclos de luz/oscuridad de 12 horas. Entre los 4 y los 6 meses de edad los animales fueron sacrificados por decapitación de acuerdo a las normas internacionalmente aceptadas (NIH Guide for the Care and Use of Laboratory Animals).

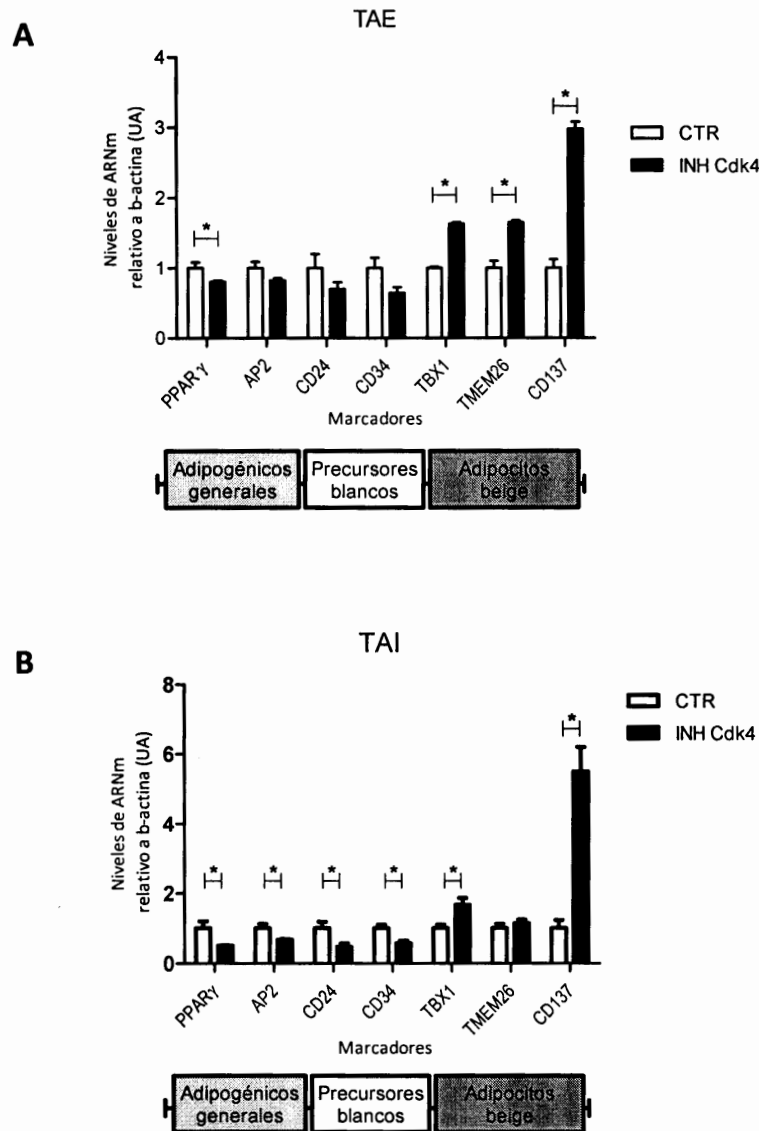
De los mismos, se obtuvieron en condiciones de esterilidad el tejido adiposo inguinal (TAI) y el epididimal (TAE). A partir de ellos se procedió al aislamiento de las células de la fracción estroma vascular (FEV) las cuales fueron cultivadas en medio DMEM/F12 suplementado con 10 % de SFB y los antibióticos penicilina (100 UI/mL, Richet) y gentamicina (0,04 mg/mL, Richet) hasta llegar a confluencia, momento en el cual fueron tratadas con el inhibidor de Cdk4 (PD0332991-HCl (Palbocidib),  $1\mu\text{M}$ ) o con DMSO como control durante 48 hs. Luego de este período, las células fueron levantadas con Trizol para proceder al aislamiento del ARN total a partir del cual se sintetizó por transcripción reversa el ADN complementario. Finalmente, el mismo fue utilizado para la determinación de los niveles de expresión de distintos marcadores por PCR tiempo real. Los genes medidos este experimento fueron: adipogénicos generales (PPAR $\gamma$ , AP2), de células precursoras adipocitarias de adipocitos blancos (CD24, CD34), y de adipocitos beige (TBX1, TEMEM26, CD137).

En cultivos adicionales, luego de la incubación con el inhibidor de Cdk4 o DMSO se indujo la diferenciación adipocitaria (día 0). Para ello se utilizó medio basal conteniendo 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX, Sigma) 0,5 mM; dexametasona (DEXA, Sidus) 5  $\mu\text{M}$ ; 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$  de insulina (INS, 100UI/mL Humulin R, Laboratorio Lilly); rosiglitazona (Rosi, Sigma)  $1\mu\text{M}$  y T3 1nM. Al día 4, el medio de diferenciación fue reemplazado por medio de mantenimiento, que contenía solo insulina y T3, el cual se mantuvo hasta el día 8 post-diferenciación. En este caso, al igual que en los cultivos previos también se extrajo el ARN total para la determinación de la expresión génica. Los marcadores determinados fueron de tres tipos: adipogénicos generales (PPAR $\gamma$ , Adipo, AP2, Glut4), selectivos de adipocitos beige, y algunos indicadores de la activación de la termogénesis (Ucp-1, Dio-2 y Pgc-1 $\alpha$ ).

Por último, al día 8 post-diferenciación las células fueron tratadas por 4hs con forksolina, un activador de la adenililciclase que induce, de esta manera, un incremento en la concentración intracelular de AMPc. Al final del tratamiento, se utilizaron las células para la determinación de los niveles de expresión de marcadores de interés por PCR tiempo real. En este caso solo se determinó la expresión de los genes termogénicos citados anteriormente.

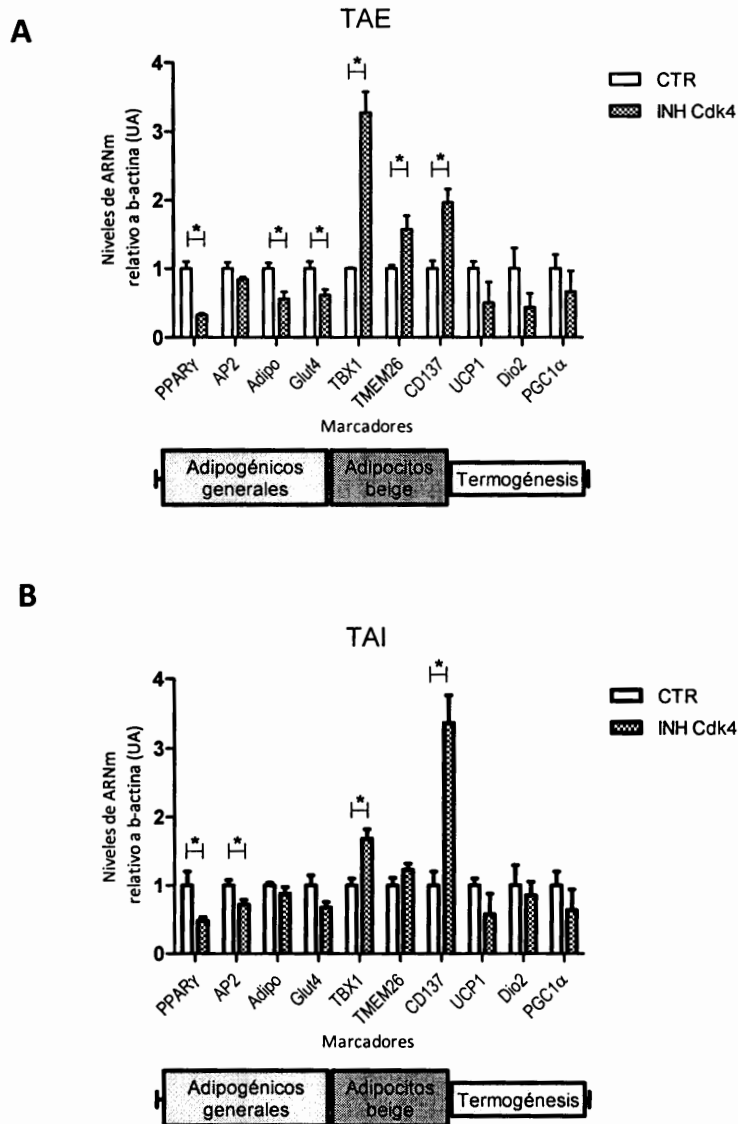
## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para comenzar con el estudio del rol de Cdk4 sobre la determinación de los precursores adipocitarios del TAB se inhibió su actividad durante 48 hs en células obtenidas de la FEV de distintos depósitos de TA cuando estas alcanzaron confluencia. Los resultados mostraron que sobre las células de TAI la inhibición de Cdk4 indujo un descenso significativo en los marcadores adipogénicos generales y en los de precursores de adipocitos blancos, mientras que los marcadores selectivos del linaje adipocitario beige se vieron incrementados (Fig. 1). Cuando se trataron células de TAE los resultados fueron similares, se registró un aumento en los marcadores de adipocitos beige que estuvo acompañado de una disminución de PPAR $\gamma$ . Si bien en este caso las diferencias de expresión de AP2 y de los marcadores de precursores blancos en ausencia y presencia del inhibidor no fueron significativas, existe una clara tendencia a la disminución cuando Cdk4 está inhibida.



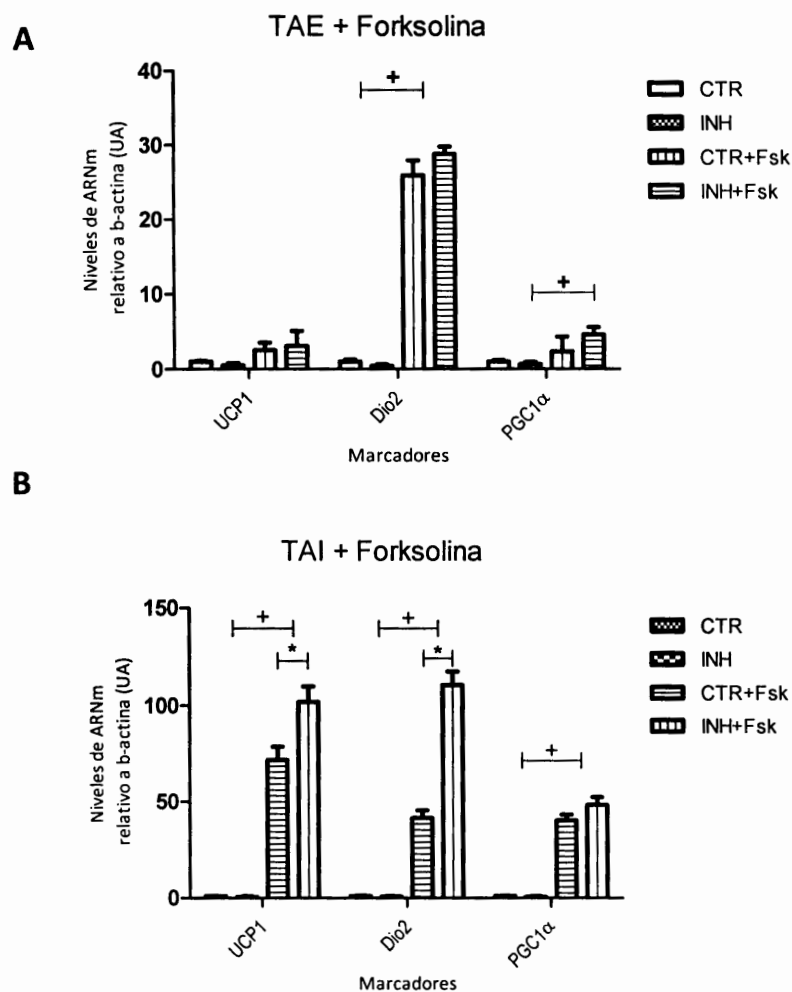
**Figura 1 | Niveles de expresión de distintos marcadores post-inhibición de Cdk4 sin diferenciación:** A) Tejido Adiposo Epididimal (TAE) B) Tejido Adiposo Inguinal (TAI). Media  $\pm$  EEM, n=6, \*p < 0,05 vs CTR.

Para indagar si este cambio en la expresión de marcadores de distintos linajes adipocitarios luego de la inhibición de Cdk4 podía deberse a un cambio en el tipo de precursores presentes y por ende se reflejaba en un cambio en el tipo de adipocitos generados, se indujo la diferenciación de las células post-inhibición de Cdk4. El análisis de la expresión génica de marcadores adipogénicos generales al día 8 post diferenciación mostro que, de manera general en ambos depósitos, su expresión decaía en las células diferenciadas donde se había inhibido la actividad de Cdk4 (Fig. 2). Por su parte los marcadores selectivos de adipocitos beige mostraron un aumento en su expresión en ausencia de actividad de Cdk4. En conjunto, estos resultados estarían sugiriendo que la inhibición de Cdk4 se correlaciona con una disminución de la capacidad adipogénica de las células de la FEV de TA, la cual está acompañada de un cambio en el tipo de precursores adipocitarios presentes; de blancos a beige. Esto se traduce luego, en un cambio en el tipo de adipocitos generados en la diferenciación.



**Figura 2 | Niveles de expresión de distintos marcadores post-inhibición de Cdk4 y diferenciación adipocitaria: A) Tejido Adiposo Epididimal (TAE) B) Tejido Adiposo Inguinal (TAI). Media  $\pm$  EEM, n=6, \*p < 0,05 vs CTR.**

Como se había registrado un incremento en la expresión de marcadores selectivos de adipocitos beige ante el tratamiento con el inhibidor de Cdk4, y considerando que este tipo de adipocitos poseen capacidad termogénica, lo próximo fue determinar la expresión de genes relacionados con la activación de este proceso (Ucp-1, Dio2, Pgc1 $\alpha$ ) luego de la diferenciación. En este caso, no se obtuvieron diferencias significativas para ninguno de los marcadores en los depósitos de TAB evaluados. Este resultado es coincidente con lo descrito en bibliografía acerca de que los adipocitos beige solo manifiestan su capacidad termogénica si son estimulados por agonistas de los receptores  $\beta$ -adrenérgicos o de PPAR $\gamma$ <sup>9,10</sup>. Por esta razón, se decidió estimular a los adipocitos con forskolina al día 8 post-diferenciación con el objetivo de aumentar la concentración intracelular de AMPc imitando así la vía de señalización intracelular desencadenada por la activación de los receptores  $\beta$  adrenérgicos. No obstante, sobre los adipocitos de TAE no se obtuvieron diferencias significativas en la expresión de los marcadores termogénicos cuando se inhibió la actividad de Cdk4. En el caso de TAI, si bien la presencia de forskolina produce un aumento basal en la expresión de todos los genes en estudio (CTR+Fsk vs CTR), los niveles de expresión en presencia del inhibidor de Cdk4 (INH+Fsk vs CTR+Fsk) aumentan de manera significativa para dos de los genes con respecto al control sin inhibidor. Estos hallazgos indicarían que en TAI la inhibición de Cdk4 generaría adipocitos que poseen capacidad termogénica, la cual se pone de manifiesto solo si son estimulados.



**Figura 3 | Niveles de expresión de marcadores indicadores del proceso termogénico post-inhibición de Cdk4 y diferenciación con estímulo de forskolina: A) Tejido Adiposo Epididimal (TAE) B) Tejido Adiposo Inguinal (TAI). Media  $\pm$  EEM, n=6, +p < 0,05 vs CTR / INH; \*p < 0,05 vs CTR+Fsk.**

En conclusión, los resultados de este estudio indican que Cdk4 controla, al menos parcialmente, el tipo de precursores adipocitarios que se generan durante la determinación, favoreciendo el linaje blanco por sobre el beige. Esto se evidenció por la disminución registrada en la expresión de marcadores propios de precursores blancos y el concomitante aumento en la expresión de marcadores selectivos de adipocitos beige cuando se inhibió su actividad tanto previo a la diferenciación como luego de la misma. Consistente con el aumento de los marcadores del linaje beige, hallamos que en TAI esos adipocitos eran capaces de activar el programa termogénico si eran estimulados con forskolina. No obstante, esto no ocurre en TAE, lo cual es coincidente con lo reportado en bibliografía de que el TAI es más propenso al *browning* que el TAE.

Por otra parte, nuestros hallazgos muestran que Cdk4 influencia la capacidad diferenciación de los precursores ya que durante su inhibición se registra una disminución de la expresión de marcadores de diferenciación adipocitaria generales, lo cual está de acuerdo con el rol conocido de Cdk4 en la adipogénesis<sup>18</sup>.

En conjunto, estos resultados estarían sugiriendo que la inhibición de Cdk4 se correlaciona con una disminución de la capacidad de las células de la FEV del TAB a diferenciarse a adipocitos blancos. Este hecho tendría en principio dos consecuencias notables: primero, una reducción de la capacidad adipogénica global ya que la FEV de los depósitos blancos está compuesta mayoritariamente por precursores de adipocitos blancos; segundo, un aumento relativo de los precursores beige que se sabe también están presentes en la FEV de los depósitos blancos, aunque en menor proporción.

Además del aporte científico, este trabajo me permitió entrenarme en tareas y técnicas generales de laboratorio tales como: manejo de animales de experimentación, cultivos celulares, extracción de ARN, transcripción reversa, PCR tiempo real y procesamiento e interpretación de resultados.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Lloyd-Jones, D. *et al.* Heart disease and stroke statistics--2009 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. *Circulation***119**, e21–181 (2009).
2. Bornfeldt, K. E. & Tabas, I. Insulin resistance, hyperglycemia, and atherosclerosis. *Cell Metab.***14**, 575–85 (2011).
3. Galic, S., Oakhill, J. S. & Steinberg, G. R. Adipose tissue as an endocrine organ. *Mol. Cell. Endocrinol.***316**, 129–139 (2010).
4. Fox, C. S. *et al.* Abdominal visceral and subcutaneous adipose tissue compartments: association with metabolic risk factors in the Framingham Heart Study. *Circulation***116**, 39–48 (2007).
5. Ross, R., Fortier, L. & Hudson, R. Separate associations between visceral and subcutaneous adipose tissue distribution, insulin and glucose levels in obese women. *Diabetes Care***19**, 1404–11 (1996).
6. Cannon, B. & Nedergaard, J. Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol. Rev.***84**, 277–359 (2004).
7. Tseng, Y.-H., Cypess, A. M. & Kahn, C. R. Cellular bioenergetics as a target for obesity therapy. *Nat. Rev. Drug Discov.***9**, 465–82 (2010).
8. Vitali, A. *et al.* The adipose organ of obesity-prone C57BL/6J mice is composed of mixed white and brown adipocytes. *J. Lipid Res.***53**, 619–29 (2012).
9. Petrovic, N. *et al.* Chronic peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) activation of epididymally derived white adipocyte cultures reveals a population of thermogenically competent, UCP1-containing adipocytes molecularly distinct from classic brown adipocytes. *J. Biol. Chem.***285**, 7153–64 (2010).
10. Ghorbani, M. & Himms-Hagen, J. Appearance of brown adipocytes in white adipose tissue during CL 316,243-induced reversal of obesity and diabetes in Zucker fa/fa rats. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.***21**, 465–75 (1997).
11. Seale, P. *et al.* Prdm16 determines the thermogenic program of subcutaneous white adipose tissue in mice. *J. Clin. Invest.***121**, 96–105 (2011).
12. Vegiopoulos, A. *et al.* Cyclooxygenase-2 controls energy homeostasis in mice by de novo recruitment of brown adipocytes. *Science***328**, 1158–61 (2010).
13. Kopecky, J., Clarke, G., Enerbäck, S., Spiegelman, B. & Kozak, L. P. Expression of the mitochondrial uncoupling protein gene from the aP2 gene promoter prevents genetic obesity. *J. Clin. Invest.***96**, 2914–23 (1995).
14. Blanchet, E., Annicotte, J.-S. & Fajas, L. Cell cycle regulators in the control of metabolism. *Cell Cycle***8**, 4029–31 (2009).
15. Reichert, M. & Eick, D. Analysis of cell cycle arrest in adipocyte differentiation. *Oncogene***18**, 459–66 (1999).
16. Richon, V. M., Lyle, R. E. & McGehee, R. E. Regulation and expression of retinoblastoma proteins p107 and p130 during 3T3-L1 adipocyte differentiation. *J. Biol. Chem.***272**, 10117–24 (1997).
17. Lee, Y. *et al.* Cyclin D1-Cdk4 controls glucose metabolism independently of cell cycle progression. *Nature***510**, 547–551 (2014).
18. Abella, A. *et al.* Cdk4 promotes adipogenesis through PPARgamma activation. *Cell Metab.***2**, 239–249 (2005).