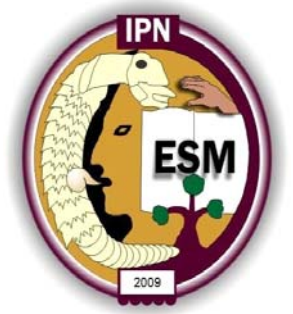




INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

ESCUELA SUPERIOR DE MEDICINA



SECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

“EFECTO DE LA LEUCINA COMO MODULADOR DE LA EXPRESIÓN DE
GENES RELACIONADOS CON LA ADIPOGÉNESIS EN UN CULTIVO
PRIMARIO DE ADIPOCITOS HUMANOS”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO
MAESTRIA EN CIENCIAS DE LA SALUD CON ESPECIALIDAD EN BIOLOGÍA
MOLECULAR

PRESENTA:

NATALIA MARÍA GARAY LUGO

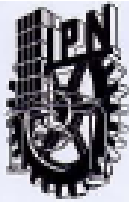
DIRECTOR

DR. ÁNGEL MILIAR GARCÍA

ENERO 2010

ÍNDICE

RESUMEN	6
ABSTRACT	7
INTRODUCCIÓN	8
JUSTIFICACIÓN	35
HIPÓTESIS	37
OBJETIVOS	38
A) GENERAL	38
B) ESPECÍFICOS	38
MATERIALES Y MÉTODOS	39
A) DISEÑO METODOLÓGICO	39
B) POBLACIÓN Y MUESTRA	39
C) CRITERIOS DE SELECCIÓN	39
D) VARIABLES	39
E) PLAN DE TABULACIÓN Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO	41
F) PROCEDIMIENTO	41
RESULTADOS	55
DISCUSIÓN	66
CONCLUSIONES	75
PERSPECTIVAS	76
BIBLIOGRAFÍA	77



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

SIP-14

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de México, D. F. siendo las 13:00 horas del día 17 del mes de Noviembre del 2009 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de la E.S.M. para examinar la tesis de titulada:

“Efecto de la Leucina como Modulador de la Expresión de Genes Relacionados con la Adipogénesis en Cultivo Primario de Adipocitos Humanos”

Presentada por la alumna:

Garay
Apellido paterno

Lugo
Apellido materno

Natalia Maria
Nombre(s)

Con registro:

A	0	8	0	5	1	2
---	---	---	---	---	---	---

aspirante de:

Maestría en Ciencias de la Salud

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **SU APROBACIÓN DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA

Directora de tesis

Dr. Anger Milor Garcia

Dr. Aarón Domínguez López

Dr. Rafael Campos Rodríguez

Dr. José Carlos Basurto

Dr. Héctor Manuel Zapata López

EL PRESIDENTE DEL COLEGIO

DR. ELEAZAR PADILLA



ESCUELA SUPERIOR DE MEDICINA
IPN
SECCION DE ESTUDIOS DE POSGRADO
E INVESTIGACION
A CONTROL ESCOLAR

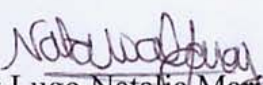


INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de México el día 17 del mes Noviembre del año 2009, el (la) que suscribe Garay Lugo Natalia María alumno (a) del Programa de Maestría en Ciencias de la Salud con número de registro A080512, adscrito a la Escuela Superior de Medicina, manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de Dr. Ángel Miliar García y cede los derechos del trabajo intitulado “Efecto de la Leucina como Modulador de la Expresión de Genes Relacionados con la Adipogénesis en Cultivo Primario de Adipocitos Humanos”, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección natig777@hotmail.com. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.


Garay Lugo Natalia María

Nombre y firma

RESUMEN

La obesidad es un importante problema de salud pública debido a las proporciones alcanzadas a nivel mundial y a las complicaciones metabólicas que conlleva. Con el objetivo de una mejor comprensión acerca del efecto de los nutrientes, con énfasis en la leucina, sobre la regulación del metabolismo y la diferenciación de los adipocitos, se analizaron los principales factores de transcripción adipogénicos y las posibles vías de señalización responsables por su regulación.

En este trabajo se utilizaron adipocitos viscerales maduros de humanos obesos y se encontró que la expresión de los factores transcripcionales PPAR γ , C/EBP α y SREBP1 estaba aumentada sugiriendo que la leucina ejerce un efecto anabólico en estas células y que la actividad de estas proteínas está relacionada con la disponibilidad de nutrientes.

En cuanto a las vías de señalización estudiadas se observó que GCN2 y su blanco eIF2 α estaban disminuidos. Se desconoce el mecanismo de detección de leucina pero se comprobó que GCN2 es sensible al exceso del aminoácido y que esta presente en tejido adiposo. En cuanto a mTOR y UCP3 no se obtuvo respuesta en ninguno de los intentos lo que requiere de más estudios.

Es necesario continuar con más análisis a nivel molecular para comprender mejor el papel positivo de los aminoácidos de cadena ramificada en la regulación del metabolismo energético.

ABSTRACT

Obesity is an important public health concern because of the proportion reached worldwide and the metabolic implications. With the aim of understand the effect of nutrients, with a particular emphasis on leucine, on metabolism regulation and adipocyte differentiation, we analyze the major adipogenic transcription factors and potential signaling pathway involved.

We used viable mature adipocytes form obese subjects and found that expression of the transcription factors PPAR γ , C/EBP α and SREBP1 was higher suggesting an anabolic effect of leucine on this cells and that the activity of these proteins are dependent of nutrient availability.

In regard of the signaling pathways studied we observed that GCN2 and its target eIF2 α were downregulated. The mechanism of leucine detection its unknown but we probed that GCN2 its sensitive to amino acid excess and that can be found on adipose tissue. About mTOR and UCP3 we had no response and propose further investigation. It is necessary to continue with more molecular level analysis to better understand the the positive role of branched-chain amino acids on energetic metabolism regulation.

INTRODUCCIÓN

Los adelantos tecnológicos y la utilización de las técnicas de biología molecular han contribuido considerablemente al inicio de una nueva era de desarrollo para la investigación en todas las áreas biomédicas, incluyendo al campo de la alimentación y nutrición¹. En las últimas décadas ha habido un gran avance en este sentido debido a la creciente interacción entre ambas disciplinas, lo que reveló la importancia de la nutrición en nuevas dimensiones, más allá de su función primordial en el crecimiento, desarrollo y mantenimiento del organismo. Se habla hoy día de su papel en la expresión génica, en la efectividad de la respuesta inmune, en la prevención del daño celular y su relación con las enfermedades crónicas e infecciosas².

Actualmente la investigación moderna en nutrición dirige sus esfuerzos hacia el estudio de los nutrientes y la manera en que estos afectan la expresión génica y la síntesis de proteínas, así como la identificación de nuevos genes y sus productos proteicos, relevantes en el ámbito nutricional. También resultan de interés la caracterización de mutaciones causantes de enfermedades nutricionales, la determinación de variaciones genéticas y su relación con los requerimientos nutricionales y el desarrollo de animales de laboratorio con mutaciones en genes que alteren la estructura o cantidad del producto proteico codificado². Éstas se perfilan como las áreas más importantes y con mayor crecimiento dentro del abanico de posibilidades que ofrecen los extraordinarios progresos alcanzados en biología molecular.

El surgimiento de nuevas herramientas tecnológicas posibilita una exploración más precisa y exhaustiva a nivel bioquímico y gracias a ello se han identificado miles de genes causantes de enfermedades³, de los cuales la mayoría se relaciona con enfermedades monogénicas o de transmisión mendeliana. Sin embargo el abordaje molecular revela nuevos genes candidatos que sugieren que muchos de estos casos son en

realidad genéticamente más complejos de lo que se creía. Por su parte, la base molecular de las enfermedades crónicas como la obesidad todavía no es conocida¹, ya que se debe fundamentalmente a una compleja interacción entre la carga genética individual y diversos factores ambientales que, en última instancia, resultan críticos para la determinación del fenotipo de adiposidad excesiva.

Obesidad: definición y epidemiología

La obesidad, como entidad patológica, es un estado de acumulación anormal y desproporcionado de grasa corporal, que resulta de un desequilibrio crónico derivado del aporte calórico excesivo (por parte de los sustratos encontrados en los alimentos y bebidas) con respecto al gasto de energía. Ese aumento masivo del tejido adiposo puede ser ocasionado por los hábitos alimentarios y estilos de vida inapropiados, factores sociológicos, alteraciones metabólicas y neuroendocrinas junto con la complejidad genética individual y la interacción entre estos⁴.

Actualmente la obesidad es una preocupación mundial creciente y ha alcanzado proporciones epidémicas en un gran número de países, sin importar su grado de desarrollo socioeconómico. De acuerdo con cifras de la Organización Mundial de la Salud – OMS en el año 2005 existía en todo el mundo cerca de 1600 millones de adultos con sobrepeso y por lo menos 400 millones de estos presentaban franca obesidad. En este mismo periodo se pudo observar además que el número de menores de cinco años con sobrepeso rondaba los 20 millones, lo que señala una importante modificación en la edad de inicio de esta enfermedad y también el aumento de la prevalencia a edades más tempranas⁵.

En las últimas décadas el exceso de peso observado en la población viene en aumento y está alcanzando cifras sorprendentes, a pesar de todo el conocimiento acerca de la gravedad de los disturbios metabólicos asociados con esta epidemia global. La

OMS estima que para el año 2015 la cifra de adultos con sobrepeso ($\text{IMC} \geq 25 \text{ kg/m}^2$) habrá superado los dos mil millones, mientras que el número de personas con obesidad ($\text{IMC} \geq 30 \text{ kg/m}^2$) será de aproximadamente 700 millones. (<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/es/index.html>) Esta alarmante tendencia se relaciona estrechamente con otras enfermedades crónicas y con el aumento de la prevalencia entre niños y adolescentes⁶, lo que acentúa aún más el impacto médico, económico y social que el exceso de peso genera en los sistemas de salud del mundo entero. (Figura 1)

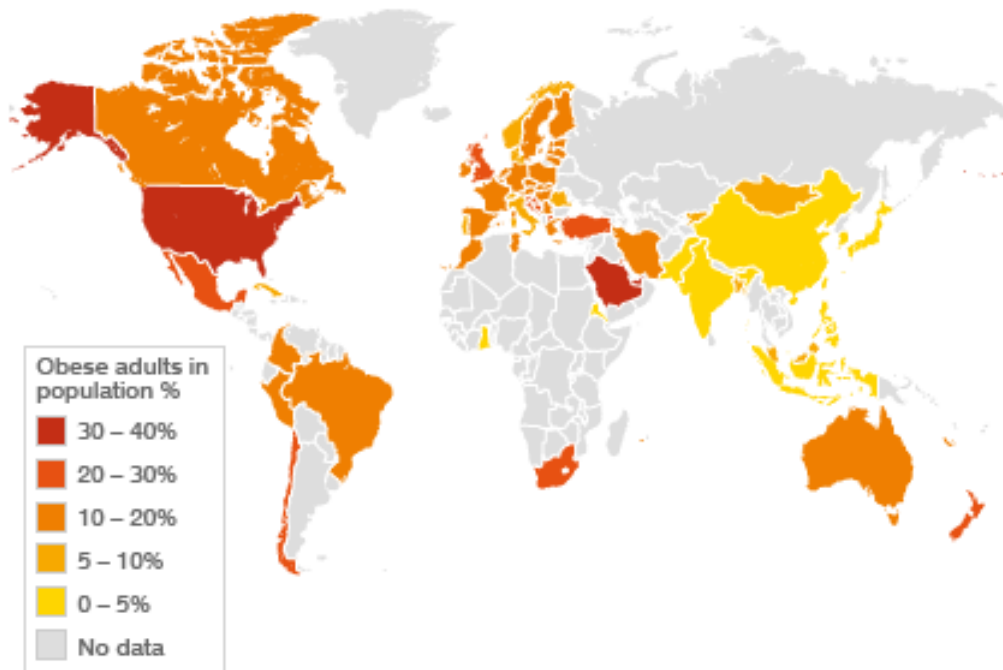


Figura 1
Mapa global de la obesidad

En Estados Unidos las informaciones del estudio NHANES III (1988-1994), revelaron que en ese periodo 14% de los niños y 12% de los adolescentes tenían algún grado de sobrepeso. Entre la población adulta los valores correspondían a 33% y 36% para hombres y mujeres respectivamente, siendo más común entre los grupos de mujeres hispanas y negras. Este aumento en la prevalencia de obesidad observado en la población

estadounidense en relación a estudios previos, fue atribuido básicamente al balance energético positivo persistente, a consecuencia del incremento en el consumo total de calorías. Los gastos de salud estimados para ese período fueron de 30 a 50 millones de dólares por año, sin la obtención de resultados efectivos. Los datos de las encuestas más recientes consideran inclusive que hoy por hoy, 1 entre cada 3 adultos en este país padece obesidad^{7,8}.

En América Latina el panorama epidemiológico no es distinto como lo demuestran los estudios poblacionales y está asociado a la tríada que incluye la transición epidemiológica, demográfica y nutricional, convirtiendo de esta manera a la obesidad en uno de los problemas de salud pública más graves en la actualidad. En México, la Encuesta Nacional en Salud 2000, señaló que aproximadamente dos tercios de la población adulta estaba excedida de peso, siendo 38.4% correspondiente al sobrepeso y 23.7% a la obesidad. La prevalencia de obesidad fue casi del 50% mayor en las mujeres mientras que el sobrepeso fue discretamente más elevado en hombres. Se observó también una relación directa con la edad para ambos sexos, siendo esta mayor a partir de los 30 años. Las poblaciones de los estados de Baja California, Campeche, Coahuila, Colima y Tamaulipas presentaron los mayores índices de obesidad; mientras que el Distrito Federal, Estado de México, Morelos, Sonora y Tlaxcala los mayores índices de sobrepeso⁹. Las últimas informaciones de la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2006 reportaron que la prevalencia de obesidad en todos los grupos de edades ha aumentado de forma dramática. En la población adulta por ejemplo, 66.7% de los hombres mayores de 20 años de edad y 71.9% de las mujeres tienen sobrepeso u obesidad⁸.

El exceso de peso representa además un importante factor de riesgo para el desarrollo de muchas de las enfermedades crónicas que afligen a nuestra sociedad,

incluyendo a las enfermedades cardiovasculares, diabetes mellitus, dislipidemias y algunos tipos de cáncer, ubicándose así entre las principales causas de muerte e incapacidad en la mayoría de los países. Asimismo, la mayor demanda de atención en los servicios de salud a pacientes con estas enfermedades aumenta cada vez más los costos médicos, lo que representa un fuerte impacto económico a nivel internacional.

Genética de la obesidad

Por tratarse de una enfermedad crónica multifactorial, se reconoce que la obesidad es resultado de la suma de complejos factores sociales y biológicos, en individuos genéticamente susceptibles, que son decisivos para la regulación de la expresión fenotípica.

El estilo de vida actual y las comodidades modernas que promueven el sedentarismo y una mala alimentación son los principales responsables del desequilibrio entre el consumo de energía y el gasto calórico que desencadena en la aparición del cuadro clínico de esta enfermedad. En los últimos años se ha observado en la sociedad un cambio significativo en los hábitos alimentarios con aumento del consumo de calorías, derivado de dietas cada vez más ricas en grasas y carbohidratos simples. Por su parte, la disminución del esfuerzo físico en las actividades cotidianas (televisión, escaleras mecánicas, medios de transporte, etc.) y de los espacios habitables, llevaron a una reducción importante en el gasto energético de todos los individuos.

Sin embargo, tampoco se puede ignorar la participación de la herencia en la enmarañada red de factores que rodean a esta enfermedad, pues se reconoce actualmente que esta puede alterar indistintamente ambos lados de la ecuación energética (ingesta vs. gasto). A pesar de que se han identificado diversos genes que participan en las formas monogénicas de obesidad, estos conocimientos no son suficientes para explicar la contribución genética y la gran variabilidad que presentan los casos de obesidad común.

La creciente prevalencia de obesidad observada a nivel mundial es atribuible, en gran medida, a los cambios de estilos de vida que inciden específicamente en una cierta predisposición genética, presumiblemente determinada con la evolución para favorecer la adaptación a condiciones ambientales adversas y garantizar la supervivencia de la especie. Los cambios en las condiciones socioeconómicas y la urbanización, que favorecen la disponibilidad de alimentos con alta densidad calórica y la disminución de actividad física, actúan conjuntamente con el componente hereditario aumentando notablemente en el riesgo de padecer esta enfermedad. Ciertamente, en relación al componente genético, se sabe que determinados genes participan efectivamente en el mantenimiento del peso corporal estable y de la adiposidad por diversos mecanismos, ya sea por la regulación de la ingesta de alimentos, las variaciones en el gasto energético, la oxidación y utilización metabólica específica de los nutrientes energéticos o los procesos de crecimiento, diferenciación y metabolismo de los adipocitos^{4,10}.

Esta teoría puede ser corroborada con el uso de varias estrategias metodológicas⁶. Es más, los variados tipos de estudio que incluyen modelos genéticos específicos indican que todos los cromosomas del genoma humano tienen *loci* relacionados con la obesidad, a excepción del cromosoma Y¹¹, y el hecho de que varios miembros de una misma familia presenten obesidad reafirma la participación de la herencia en la incidencia de esta enfermedad.

La participación aislada de cada uno de los componentes mencionados en el desarrollo de la obesidad es muy pequeña, sin embargo la interacción entre todos estos factores ejerce un efecto aditivo considerable en el incremento de la prevalencia de obesidad en el mundo contemporáneo.

Obesidad y adipogénesis

El fenómeno de la adipogénesis, como es conocido el proceso de diferenciación

del tejido adiposo, está siendo objeto de múltiples estudios a fin de conocer a profundidad la base celular y molecular de su desarrollo y su afectación en estados fisiológicos y patológicos, de forma a conducir al surgimiento de mejores intervenciones terapéuticas y preventivas. La formulación de nuevos abordajes terapéuticos podría ser de gran ayuda para tratar aquellos individuos que padecen tanto de obesidad como para aquellos con problemas relacionados a la escasez de tejido adiposo^{12,13}.

Los estudios muestran que la adipogénesis se inicia en una etapa anterior al nacimiento, puesto que es posible su observación en la fase embrionaria; y el momento en que el tejido adiposo aparece es estrictamente dependiente de la especie y del compartimiento que sea considerado. Una vez transcurrido el nacimiento se da una rápida expansión del tejido que incluye hipertrofia e hiperplasia, y la capacidad para generar nuevas células se conserva hasta la fase adulta^{12,14}. El número de adipocitos puede variar a lo largo de toda la vida ya que la plasticidad de este tejido permite la activación de complejos eventos de reclutamiento, proliferación y diferenciación de los preadipocitos en función de determinados estímulos.

Luego de haber completado el ciclo de desarrollo del tejido adiposo, se ha visto que la grasa se acumula en varios sitios diferentes, dispersa dentro de todo el organismo, preferentemente en las áreas compuestas de tejido conectivo laxo, como son las capas subcutáneas entre el músculo y la dermis. Aunque también pueden encontrarse depósitos de este tejido alrededor del corazón, riñones y otros órganos internos¹⁵.

Las constantes investigaciones han permitido esclarecer la secuencia orquestada de eventos en el sistema de diferenciación y la identificación del programa de factores reguladores de la transcripción que intervienen. El proceso de diferenciación del preadipocito a un adipocito maduro sigue una secuencia temporal ordenada y es altamente controlado debido a que estas células descienden de las células madres

embrionarias multipotentes de origen mesodérmica y tienen la capacidad de diferenciarse en otros tipos celulares de la misma capa embrionaria. Inicialmente ocurre una detención del crecimiento (*growth arrest*) de los preadipocitos proliferantes; se piensa que tal vez una de las señales para este fenómeno pudiera ser la inhibición por contacto, al menos en las líneas celulares¹⁶. Al ser estimuladas con inductores de diferenciación, las células intactas realizan de dos a tres ciclos adicionales de división celular (expansión clonal) para después detener su crecimiento permanentemente y comenzar a expresar coordinadamente los genes típicos de un adipocito, así como el fenotipo completamente diferenciado^{12,14}.

Los estudios realizados en cultivos de células siguen aportando datos relevantes que permiten comprender las bases celulares y moleculares de la adipogénesis. Con el uso de la tecnología es posible proporcionar los fundamentos para el desarrollo de modelos fisiológicos *in vitro* que faciliten el estudio de la patogénesis de las enfermedades así como el impulso de la terapéutica molecular. Sin embargo, los modelos actuales presentan ciertas limitaciones debido a que en muchos casos no logran reproducir la función y el comportamiento de las células a niveles semejantes a las encontradas *in vivo*. Esto se debe principalmente a la influencia de la señalización hormonal, al requerimiento nutricional, la interacción intercelular y la arquitectura espacial y de soporte del tejido adiposo, compuesto por preadipocitos, adipocitos, células del intersticio y un sistema microvascular, todos estos entrelazados en una compleja matriz extracelular¹⁷.

Los factores de transcripción adipogénicos CCAAT/*enhancer-binding proteins* (C/EBPs), PPARs, y en menor grado, SREBP-1c y RXRs, desempeñan un papel central en la compleja cascada transcripcional que ocurre durante la adipogénesis, ya sea de forma directa o por la interacción entre ellos. Son fundamentales tanto para la inducción

de genes adiposo-específicos, como para la manifestación del fenotipo del adipocito totalmente diferenciado. También son importantes en la regulación de este proceso de diferenciación las señales hormonales y nutricionales que pueden influenciar tanto positiva como negativamente¹². (Figura 2)

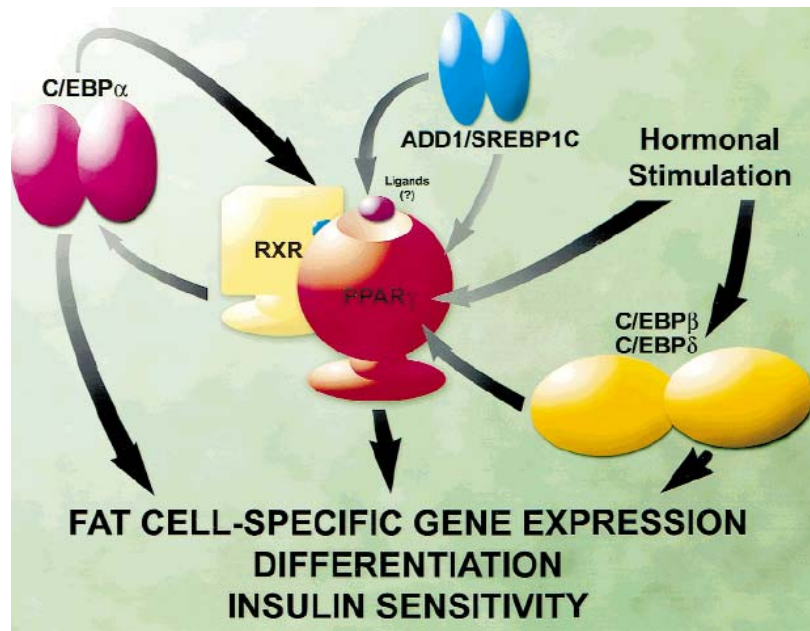


Figura 2
Modelo de red transcripcional de la adipogénesis

La familia del factor de transcripción C/EBP es importante para regular la diferenciación del adipocito y actúan mediante interacción directa con el DNA, a través su característico dominio bZIP (cremallera de leucina básica). Su distribución de tejido no se restringe solo a células grasas puesto que se demostró el papel de estas proteínas en la diferenciación terminal de granulocitos y hepatocitos. Los C/EBPs también desempeñan un papel importante para la resistencia a infecciones y la respuesta de tejidos ante lesiones¹⁶.

La regulación de C/EBPs se da en varios niveles, incluyendo el transcripcional, mediante la presencia de moléculas correguladoras que modulan los niveles de mRNA en la célula. La regulación post-transcripcional ocurre principalmente por cambios en la

fosforilación que pueden modificar la actividad de las proteínas, y finalmente el uso de sitios de inicio de traducción alternativos que resultan en múltiples isoformas. En este sentido, presenta dos isoformas que comúnmente participan en las etapas iniciales de la diferenciación celular, conocidas como C/EBP β y C/EBP δ . Exhiben niveles de mRNA y proteínas aumentados en las etapas tempranas y de forma transitoria para luego disminuir en la fase terminal. Se desconoce la función específica de estas proteínas, no obstante, podría ser que la actividad primaria de ambos factores sea la de inducir a la expresión tardía de las isoformas C/EBP γ y C/EBP α en los adipocitos, siendo esta última indispensable y crítica para el proceso de diferenciación y el control de la homeostasis energética. Se manifiesta durante la fase terminal de diferenciación, pudiendo activar a otros genes adiposo-específicos por la unión a las regiones promotoras¹⁴. C/EBP α ejerce también un feedback positivo sobre PPAR γ , sosteniendo y reforzando la expresión del mismo, esto asegura que una vez iniciado el proceso se mantendrá el estado de diferenciación terminal^{16,18}.

Los PPARs (*peroxisome proliferator-activated receptors*) son miembros de una superfamilia de receptores nucleares que funcionan como factores transcripcionales que regulan la expresión génica, además de pertenecer a la superfamilia de receptores esteroideos¹⁵. Actualmente se conocen cuatro isoformas: PPAR α , PPAR β/δ , PPAR γ 1 y PPAR γ 2, y éstas se encargan de la modulación de varios genes de diversas rutas del metabolismo de lípidos. Se expresan abundantemente en casi todos los tejidos, siendo la isoforma PPAR γ 2, en especial, característica del tejido adiposo. Se conoce genéricamente como PPAR γ y actúa estimulando la transcripción de varios genes específicos del adipocito (aP2, PEPCCK), así como de las etapas tardías de la adipogénesis, hecho que le confiere un papel crucial en el proceso de diferenciación de un preadipocito a adipocito^{12,15}. El resultado de la activación de PPAR γ puede observarse

en todos los aspectos del fenotipo de la célula grasa madura, incluyendo cambios morfológicos, acumulación de lípidos, la adquisición de sensibilidad a insulina y mantenimiento del estado diferenciado^{16,18}. Se ha observado además, que la expresión conjunta de PPAR γ y C/EBP α tiene un efecto sinérgico sobre la inducción del proceso adipogénico, sin embargo PPAR γ por si solo es suficiente para promover la diferenciación del adipocito.

En términos generales, el control de la transcripción mediada por los PPARs se da por la unión del ligando al receptor provocando su activación y la formación de un heterodímero con el receptor del ácido 9-cis retinoico (RXR). A continuación el complejo activado se une a secuencias específicas de DNA denominadas PPRE (Elementos de Respuesta para PPARs), con secuencia consenso AGGTCA y ubicadas en las regiones promotoras de sus genes blanco. También participan en el proceso corre reguladores que activan o suprimen la transcripción de los genes involucrados en la utilización de lípidos^{15,19}. (Figura 3)

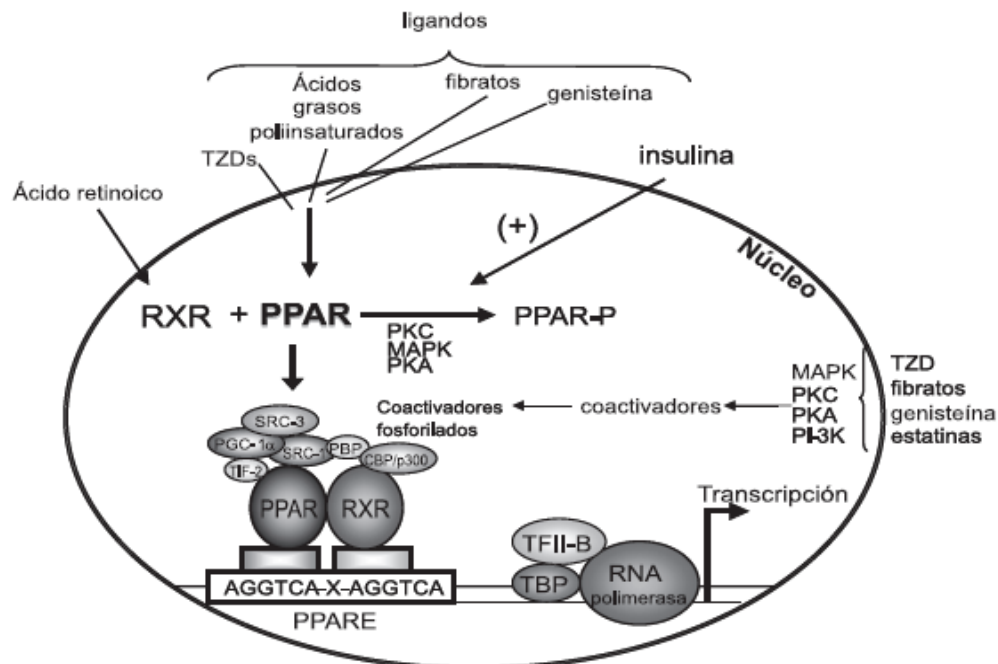


Figura 3

Mecanismo de activación de la transcripción mediado por PPAR

Los principales ligandos vinculados a la activación de este factor transcripcional son los ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs), los eicosanoides derivados de PUFAs esenciales y los fibratos^{14,15}. El PPAR γ puede ser activado sintéticamente por una clase de droga denominada tiazolidinedionas (TZDs), usadas como hipoglucemiantes para el tratamiento de diabetes y otras enfermedades que cursan con resistencia a insulina como manifestación clínica. También puede ser moderadamente activado por ciertos AINEs (antiinflamatorios no esteroideos) y por compuestos denominados indoles.

Los SREBPs (*sterol regulatory elements binding proteins*) son una familia de factores transcripcionales que regulan la homeostasis de lípidos, controlando la expresión de una gama de enzimas requeridas para la síntesis del colesterol endógeno, ácidos grasos, triacilgliceroles y fosfolípidos. Se conocen tres isoformas SREBP-1a, SREBP-1c y SREBP-2 que tienen diferentes funciones en la síntesis de lípidos. Estudios sugieren que SREBP-1c actúa en la síntesis de ácidos grasos y el metabolismo de la glucosa inducido por insulina (particularmente en lipogénesis), mientras que SREBP-2 es específica para la síntesis de colesterol; y finalmente SREBP-1a estaría implicada en ambas vías²⁰. La isoforma SREBP-1c, también conocida como ADD1^{16,20} (*adipocyte determination and differentiation dependent factor 1*), se expresa predominantemente en hígado, tejido adiposo blanco (WAT), músculo esquelético, glándulas adrenales y el cerebro, y tiene una participación indirecta en el proceso de adipogénesis por producción de ligandos endógenos de PPAR γ .

Tejido adiposo y metabolismo proteico

El tejido adiposo, que anteriormente era considerado importante más que nada por su papel significativo como reserva energética del organismo, recibe en la actualidad una distinción especial en relación a su papel endocrino luego del descubrimiento de su capacidad para sintetizar y secretar una variedad de sustancias con efectos biológicos de

gran importancia, denominadas adipocinas, que controlan las funciones de varios órganos. La lista de productos es extensa y crece cada vez más, entre los principales se encuentran la leptina (LEP), el factor de necrosis tumoral alfa (TNF α), interleucinas, factores de crecimiento, angiotensina, adiposina, adiponectina, resistina, perilipinas y proteínas del complemento, entre otras. El reciente reconocimiento de que el tejido muscular esquelético pueda actuar de manera similar en respuesta a determinados estímulos metabólicos hace pensar que tal vez exista una posible interacción entre el tejido adiposo y el músculo esquelético^{12,21-23,43}.

El metabolismo proteico es un proceso dinámico y constante en el que ocurre simultáneamente biosíntesis de nuevas proteínas y degradación de las ya existentes. Este proceso se conoce como renovación o *turnover* y provoca incesantes cambios y remodelación en la masa muscular y las proteínas circulantes. El organismo necesita regularmente de un adecuado aporte de proteínas provenientes de la dieta para asegurar el correcto funcionamiento, crecimiento y mantenimiento a lo largo de la vida. Cuando la ingestión de nutrientes se ve afectada, ya sea en cantidad o en calidad, la proteína muscular sirve como principal reserva para reponer el *pool* de aminoácidos sanguíneos que son consumidos por los tejidos²⁴. En situaciones catabólicas o de estrés estos aminoácidos son utilizados no solamente como precursores para la síntesis de proteínas, sino también como precursores para la gluconeogénesis hepática. Esta capacidad para suplir las demandas orgánicas en condiciones especiales es extraordinaria y se mantendrá solamente hasta un punto en que la depleción de proteínas no se vuelva incompatible con la vida.

Así, el papel del tejido muscular es esencial en condiciones de estrés o de pérdida progresiva de la masa muscular (sarcopenia, caquexia), pero también debe ser considerado en otras situaciones, como por ejemplo, por su contribución para la

prevención de obesidad²⁴. Como se comentó anteriormente la obesidad es el resultado de un desequilibrio energético crónico que se da cuando la ingesta calórica supera el gasto total de energía. El gasto energético total está compuesto por el gasto energético en reposo (GER), la termogénesis inducida por la dieta (TID) y el gasto relacionado con actividad física voluntaria (AF); y bajo la mayoría de las circunstancias el GER es el mayor componente del gasto total. El GER puede variar considerablemente entre los individuos y está directamente relacionado con la masa muscular total y la tasa de renovación o *turnover* del músculo esquelético. Estimaciones conservadoras calculan que la energía liberada en base a la síntesis de proteína muscular (sin considerar la degradación), puede oscilar entre ~ 120-500 kcal/día, dependiendo de la actividad y del grado de desarrollo muscular, y estos valores podrían traducirse en una ganancia o pérdida de hasta 1.5 kg grasa/mes. Estas estimaciones ponen en evidencia el significativo impacto de las diferencias en la masa muscular para la regulación del balance energético a largo plazo. Por cada 10 kg de diferencia en la masa magra se observa una diferencia en el balance energético ~ 100 kcal/día, y esto podría traducirse finalmente en un aumento o pérdida de cerca de 5 kg/grasa/año²³.

Por lo anterior, el mantenimiento de una mayor masa muscular y por consiguiente del *turnover* de proteínas, podría contribuir para la prevención de la obesidad. Además, el aumento de masa muscular con el tiempo también se acompaña de una disminución de la grasa corporal²⁴, ya que el sustrato energético preferido del músculo en reposo para proveer de ATP al *turnover* de proteínas proviene de la oxidación de lípidos. Aplicando estos conocimientos al contexto de la práctica nutricional, se esperaría que dietas hipocalóricas y con mayor porcentaje de proteínas sean más favorables para la reducción de peso y una mejor corrección de la composición corporal en individuos obesos.

Aminoácidos de cadena ramificada

Existen factores que controlan el *turnover* de proteínas como por ejemplo la insulina y los aminoácidos. Las primeras experiencias señalaron que el suministro de una mezcla completa de aminoácidos (esenciales y no esenciales), estimulaba la síntesis de proteínas e inhibía la degradación, principalmente en el músculo esquelético. Asimismo, se demostró que este efecto podía reproducirse a un grado similar cuando se administraban solamente los aminoácidos de cadena ramificada (esenciales), lo que aumentó el interés hacia el estudio de estas moléculas^{25,26}.

En los últimos años varias investigaciones se han enfocado en el metabolismo de los aminoácidos de cadena ramificada (*BCAAs – branched-chain amino acids*) debido a sus características particulares y al potencial papel en la regulación de varias funciones metabólicas. Los tres BCAA (leucina, isoleucina y valina), se encuentran entre los aminoácidos más hidrofóbicos y esta característica les confiere un papel esencial en la determinación de la estructura y función de ciertas proteínas, como las proteínas globulares, de membrana y estructuras helicoidales²⁷. Son los aminoácidos esenciales más abundantes y desempeñan una importante función en la estructura de las proteínas, pues la mayoría de ellas tiene una proporción relativamente elevada de estos aminoácidos en su interior y representan además ~ 20% del total de las proteínas dietéticas, evidenciando su importancia y una cierta abundancia en relación a los demás aminoácidos^{27,28}. (Figura 4)

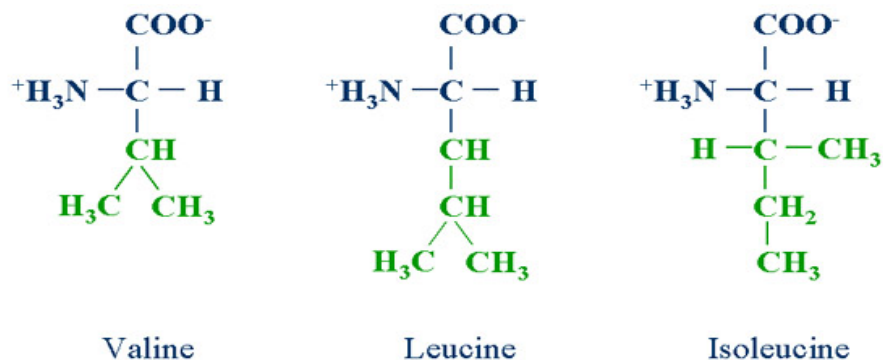


Figura 4

Estructura de los aminoácidos de cadena ramificada

Estos aminoácidos se distinguen del resto porque no son metabolizados como moléculas únicas, el catabolismo comprende dos pasos que son puntos comunes para los tres y también porque este proceso se lleva a cabo principalmente en tejidos periféricos, a diferencia de los demás aminoácidos que son dependientes del catabolismo hepático. Solo una pequeña fracción de la oxidación los BCAA se lleva a cabo en el hígado, cerca de 50% de la capacidad metabólica total depende del músculo esquelético y otra porción considerable de esta actividad reside en el tejido adiposo²⁸.

El primer paso en el catabolismo es la transaminación reversible para formar los α -cetoácidos, en una reacción catalizada por la enzima BCAT (*branched-chain amino acid aminotransferase*). Esta enzima presenta dos isoformas, una mitocondrial (BCATm) y otra citosólica (BCATc), producto de diferentes genes. En humanos la BCATm es la más ampliamente distribuida, con elevada expresión en el músculo esquelético, colon, riñón y baja expresión en el hígado. El segundo paso es la descarboxilación oxidativa e irreversible de los α -cetoácidos, catalizada por el complejo enzimático mitocondrial BCKD (*branched-chain α -keto acid dehydrogenase*), compuesto por múltiples copias de tres enzimas: E1, E2 y E3. La actividad de este complejo es regulada por fosforilación (BCKDK) y desfosforilación (fosfatasa), y se cree que la BCKDK es el punto clave en la regulación de la actividad del complejo BCKD (inactivación en presencia de BCKDK). Por otro lado, la actividad de esta quinasa es inhibida principalmente por el α -ceto-isocapróico, producto de la transaminación de leucina, lo que explica porqué el exceso de este aminoácido provoca un desequilibrio y consecuente disminución de los otros dos BCAA²⁸⁻³⁰. (Figura 5)

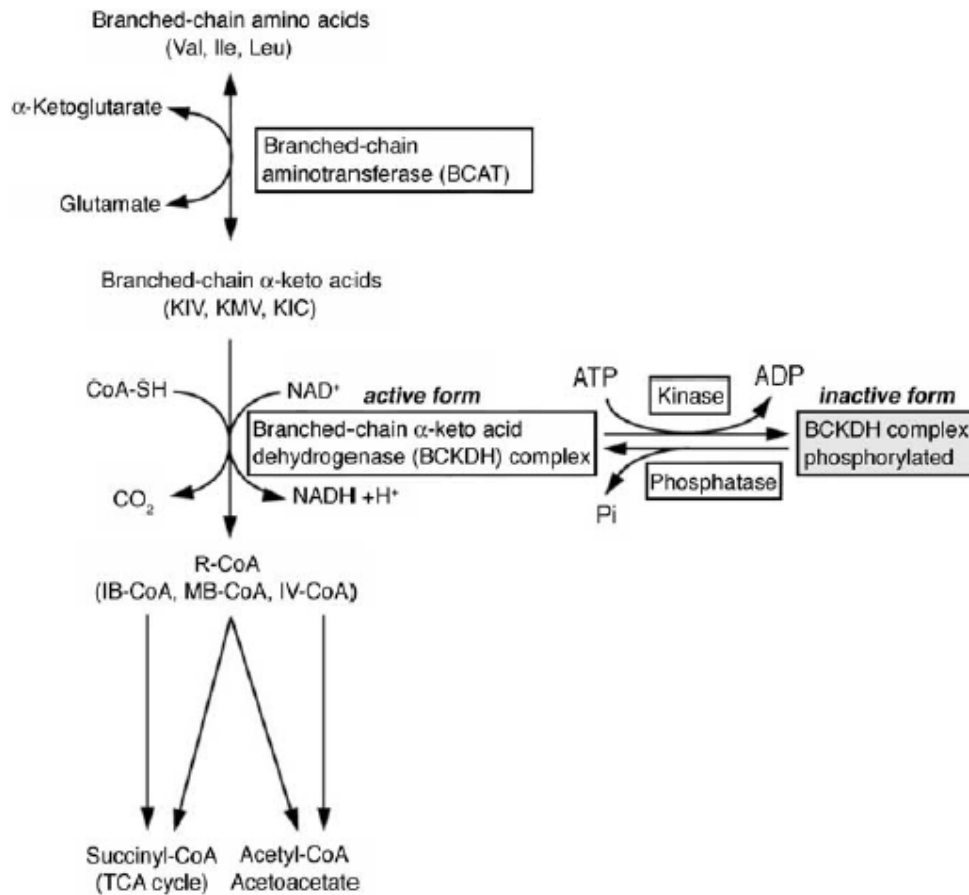


Figura 5
Vía catabólica de los BCAA

Los BCAA participan de numerosos procesos metabólicos, que incluyen su papel fundamental como constituyentes estructurales de las proteínas hasta su rol metabólico como sustratos energéticos. Actúan también como precursores para la producción de alanina y glutamina, en la modulación de la síntesis de proteína muscular por medio de la vía de señalización de insulina, en la síntesis de neurotransmisores en el cerebro y en la secreción de insulina^{27,28,30,31}. La primera asociación reportada de los BCAA fue con respecto a la regulación del metabolismo glucémico y más específicamente al ciclo de la glucosa-alanina. Esta ligación se vio reforzada luego con los hallazgos sobre la importancia de los aminoácidos como combustible hepático y principal fuente de carbono para la gluconeogénesis hepática³¹.

Como resultado de la acción de estos aminoácidos las recientes investigaciones a nivel molecular sugieren un potencial terapéutico para la leucina, que ha demostrado tener efectos regulatorios únicos, inclusive en ausencia los demás BCAA^{26-28,32}. En el músculo esquelético la leucina actúa como regulador clave del inicio de la traducción durante la síntesis proteica *in vitro* e *in vivo*, como modulador de la señal de cascada insulina PI3-K (fosfoinositol 3 quinasa) y como un donante de N para la producción muscular de alanina y glutamina. Varios estudios proponen tratamientos con leucina basados en su capacidad para estimular la síntesis de proteína en el músculo, y así promover la curación de heridas y disminuir la pérdida de masa magra relacionada con el envejecimiento. Durante condiciones catabólicas este efecto evita el encogimiento del tejido muscular resultante de la pérdida de peso y favorece la recuperación del músculo luego del ejercicio exhaustivo^{30,32}.

Inicialmente y durante mucho tiempo se habló del potencial de los BCAA provenientes de la dieta para influenciar la homeostasis de la glucosa, más adelante se percibió que la leucina, específicamente, afectaba la renovación proteica y por lo tanto el mantenimiento de la masa muscular, particularmente en periodos de restricción calórica o luego del ejercicio físico intenso³³. En el 2003, al tratar pacientes obesas con dietas hipocalóricas con diferente razón de carbohidrato/proteína (3.5 vs. 1.5) acompañadas de un aumento del aporte proteico, inclusive el de leucina (5g vs. 10g), durante 16 semanas, Layman observó cambios favorables en el peso y en la corrección de la composición corporal, especialmente en aquellas mujeres que realizaban actividad física constante. Los resultados mostraron mayor pérdida de peso, esencialmente en forma de grasa y preservación de la masa magra, además de un mejor control glucémico (estabilización de glucosa sanguínea y disminución de la respuesta insulínica postprandial)³¹. Estos

hallazgos clínicos fueron más adelante corroborados y ampliados con los de otras intervenciones, realizadas por diferentes grupos³⁴⁻³⁶.

La intensificación en estudios posteriores mostró además que la leucina modula la función endocrina del tejido adiposo y muscular, favoreciendo a la elevación del gasto energético en el tejido adiposo y promoviendo la síntesis de proteínas en el músculo esquelético. Según Sun, la leucina inhibe la expresión de FAS (*fatty acid sintase*) y PPAR γ , mientras que aumenta la producción de adiponectina y UCP (*uncoupling protein*) 3 en los adipocitos y células musculares. Estos cambios son acompañados por el control de la producción de IL-15 e IL-6, y se ha demostrado que ambas estimulan la oxidación de los ácidos grasos²¹.

Un grupo de científicos de Nueva York estudió el efecto de la leucina en ratones alimentados *ad libitum* con una fórmula comercial para roedores y una dieta especial con alto contenido en grasa. En este último grupo se observaron cambios significativos en el peso y la adiposidad, como resultado de un mayor gasto energético en reposo asociado a la expresión aumentada de UCP3 en los tejidos adiposo y muscular. También se observó un mejor control glucémico además de una disminución del colesterol total y de su fracción LDL³⁶.

Por lo tanto, y a raíz de esas evidencias, se consideró que la leucina funciona como una molécula de señalización nutricional activa al ser administrada de forma oral y que actúa directamente en el tejido muscular, y tal vez el adiposo, para la regulación de la síntesis de proteínas.

Esta notable capacidad para afectar directamente la tasa de síntesis de proteína muscular, la acción de la insulina y la homeostasis glucémica depende de la disponibilidad y las concentraciones intracelulares, mediadas por la presencia de las enzimas catalíticas. Esto se relaciona, al menos en parte, a la relativa ausencia de la

BCAT en el hígado, lo que permite un enriquecido suministro a los tejidos periféricos a partir de la sangre. No obstante, las concentraciones intracelulares son estrictamente controladas para evitar una posible toxicidad a consecuencia del aporte excesivo, como parte de un mecanismo de seguridad. Esta situación es posible debido a que los BCAA son autolimitantes, pues controlan su propia disposición activando la degradación oxidativa en situaciones abundancia. Se cree que el punto clave de la regulación es el complejo BCKD, ya que el aumento intracelular en las concentraciones de los BCAA, y en especial de leucina, estimulan su actividad comprometiéndolos irreversiblemente a ser oxidados. Por lo tanto, aunque solamente la leucina promueve la síntesis de proteína, esta no debe ser consumida en grandes cantidades sin equilibrar los niveles de valina e isoleucina, ya que eso resultaría en la inhibición final de la síntesis proteica^{30,27,28}.

Vía de señalización mTOR

De acuerdo con estudios *in vitro*, la acción de leucina sobre la síntesis de proteínas implica en la estimulación de una vía de señalización citosólica que incluye una quinasa conocida como mTOR (*mammalian target of rapamycin*) o FRAP/RAFT1, la cual activa el montaje de la maquinaria estructural de síntesis proteica en un proceso conocido como iniciación. Los componentes básicos de este proceso incluyen a las subunidades ribosomales 60S y 40s, el mRNA codificante para la proteína, el tRNA para los aminoácidos y varias proteínas catalíticas identificadas como eIFs (*eukaryotic initiation factors*), siendo las más importantes eIF2, el complejo eIF4F y S6K1 (*S6 Kinase 1*). Estos factores de iniciación coordinan el montaje en diversos puntos y son sensibles a cambios agudos en la disponibilidad de energía, aminoácidos y factores de crecimiento³². (Figura 6)

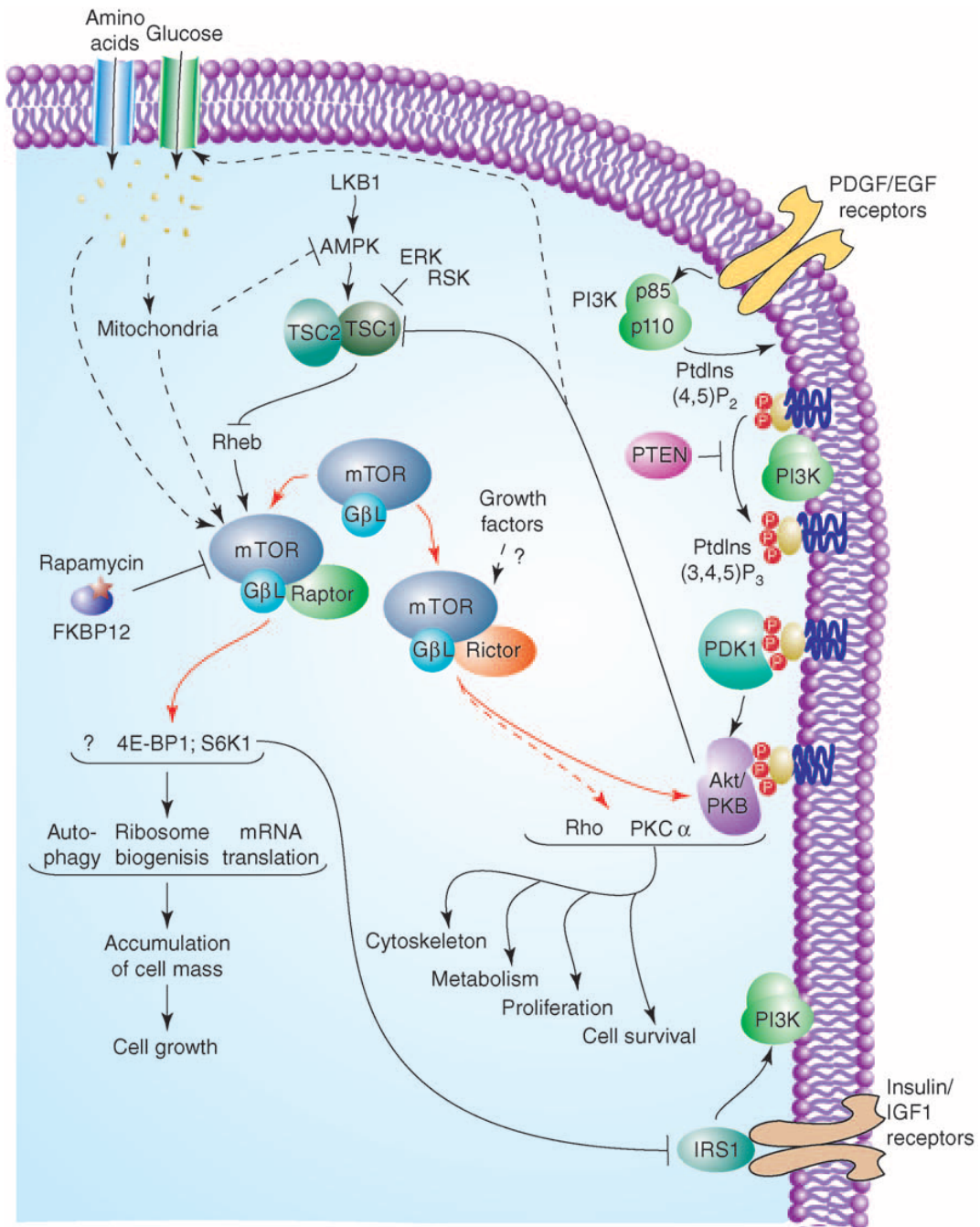


Figura 6

Modelo esquematizado de la vía de señalización mTOR

El primer paso de la secuencia de iniciación corresponde a la activación de la subunidad 40s por medio de su fijación con eIF2, que culmina con la formación de un complejo de preiniciación. A continuación, este complejo debe unirse al mRNA para completar el proceso de iniciación y continuar con la traducción. Este paso es mediado

por eIF4F, otro importante complejo formado por 3 unidades (eIF4E, eIF4G y eIF4A), que sirve para reconocer, desplegar y dirigir al mRNA en su unión con el ribosoma. La activación del complejo eIF4F depende de la disponibilidad de eIF4E libre para unirse con eIF4G en su estado activo (fosforilado). Esta disponibilidad es controlada por las 4E-BPs (*inhibitory binding proteins*), que compiten con eIF4G por un mismo sitio de ligación en eIF4E y por lo tanto impiden la formación del complejo activo (eIF4E-eIF4G). La fosforilación de 4E-BP1 por mTOR disminuye su afinidad por eIF4E, mientras que la desfosforilación incrementa la afinidad de eIF4E-BP1. Otro blanco de mTOR es S6K1 (p70^{S6K} – *ribosomal protein S6 kinase*), que se activa por la fosforilación resultante de la estimulación de mTOR. La activación de S6K1 provoca la traducción preferencial de mRNAs que codifican los componentes del mecanismo de síntesis de proteínas, incluyendo eIF4G, eEF1 y eEF2 (*eukaryotic elongation factors*) y la proteína de unión a poli A (*PABP – poly A binding protein*); de esta manera, la activación de rpS6 contribuye para aumentar la capacidad celular de síntesis proteica. Además de los importantes efectos en la estimulación de síntesis de proteína desencadenados por la activación de mTOR, la leucina actúa también por un mecanismo independiente de mTOR, a través de la activación directa de eIF4G para la formación del complejo eIF4E-eIF4G, aún en bajas concentraciones³².

Aunque el efecto de la leucina a corto plazo sobre la respuesta sintética de proteínas en el músculo esquelético depende en gran medida de la contribución de la insulina, una porción del efecto estimulante sobre la síntesis proteica se da por un mecanismo independiente de esta hormona. El mecanismo dependiente de insulina se asocia con la señalización mediada por mTOR sobre 4E-BP1 y S6K1, que son dos proteínas esenciales para regular la síntesis de proteína, como lo demuestran los estudios con modelos experimentales que utilizan somatostatina y ratas diabéticas. Mientras tanto,

el mecanismo independiente de insulina actúa por la estimulación de eIF4G y su asociación con eIF4E. Ambos mecanismos operan en situaciones específicas y de forma independiente como sugieren los experimentos, pero en situaciones normales (administración oral) la leucina actúa inicialmente por el proceso independiente, mientras que la señalización mediada por mTOR actúa sinérgicamente a medida que aumentan las concentraciones séricas del aminoácido. Por el contrario, la administración oral de leucina no estimula la tasa global de síntesis de proteína en el hígado como lo hace en el músculo. Sin embargo promueve la fosforilación de los dos principales sustratos de mTOR, 4E-BP1 y S6K1, así como un aumento en la traducción de mRNAs codificantes de proteínas ribosomales específicas, relacionadas a los cambios en la asociación de mRNAs con polisomas. Estos hallazgos sugieren que la leucina activa la vía de señalización de mTOR en ambos tejidos, músculo e hígado, y este efecto puede ser comprobado con el uso de rapamicina (inhibidor de la enzima mTOR)²⁶.

La mayoría de las investigaciones acerca del efecto de la leucina se han enfocado en el metabolismo proteico y en el músculo esquelético. Sin embargo este efecto puede ocurrir no solo en el músculo esquelético sino también en otros tejidos, como por ejemplo el tejido adiposo²⁶⁻²⁸. Estudios iniciales reportaron que en presencia de rapamicina ocurre un bloqueo de la activación de S6K1 y del aumento de la síntesis proteica que la acompaña, así como de la aglomeración multicelular de adipocitos en cultivos tridimensionales. Debido a que la aglomeración multicelular se asocia con la morfogénesis del tejido adiposo, estos resultados levantaron la hipótesis de que la vía mTOR pudiera participar de este proceso³⁶. En los últimos años y con la ayuda de estudios *in vitro*, se comprobó que en el tejido adiposo, la vía de señalización mTOR desempeña un papel específico en la diferenciación de preadipocitos, en la morfogénesis del tejido, en el crecimiento hipertrófico y en la secreción de leptina; y se cree que 4E-

BP1 podría estar relacionado con la regulación de la adipogénesis y del metabolismo^{27,28,44}.

Más adelante se demostró de manera directa, en un sistema de células 3T3-L1, que mTOR es requerido para la adipogénesis y que su acción catalítica es indispensable por sus funciones adipogénicas⁴⁴. Al examinar la red transcripcional de regulación de la diferenciación para revelar el mecanismo de acción de mTOR se observó que este regula específicamente la actividad de transactivación de PPAR γ , que a su vez controla la expresión de C/EBP α por feedback positivo, así como la expresión del programa de genes adipogénicos. Además de esto mTOR sirve para transducir señales de disponibilidad de nutrientes para controlar la actividad de PPAR γ .

GCN2 y la homeostasis de aminoácidos esenciales

Como pudo apreciarse los aminoácidos esenciales, y en especial los de cadena ramificada, son de gran importancia para el mantenimiento de la renovación proteica del músculo esquelético y por su papel en los diversos procesos metabólicos del organismo. Por lo tanto es indispensable la selección de una dieta balanceada que incluya adecuados niveles de estos aminoácidos esenciales para evitar el riesgo de una deficiencia. En ratas y otros omnívoros se observa un comportamiento alimentario poco comprendido, en el cual hay un rechazo de aquellas dietas en las que se tenga la ausencia de un aminoácido esencial³⁶. También es sabido de la existencia de prácticas culturales bien establecidas que combinan patrones complementarios de aminoácidos esenciales en proteína de origen vegetal (ej: arroz y frijoles), y este comportamiento precede el conocimiento sobre los aminoácidos esenciales e implica la existencia de una detección innata de deficiencia de estas moléculas. Hace algunos años estudiando la levadura *Saccharomyces cerevisiae* se descubrió un conservado sistema general de control de aminoácidos – GAAC o GC

(por su siglas en inglés), que actúa como una vía cruzada de regulación de la biosíntesis de aminoácidos. Este mecanismo básico de manejo del estrés nutricional funciona tanto en levaduras como en mamíferos guiando la selección de alimentos apropiados para la supervivencia antes que los aminoácidos remanentes sean metabolizados y perdidos.^{37,38}

(Figura 7)

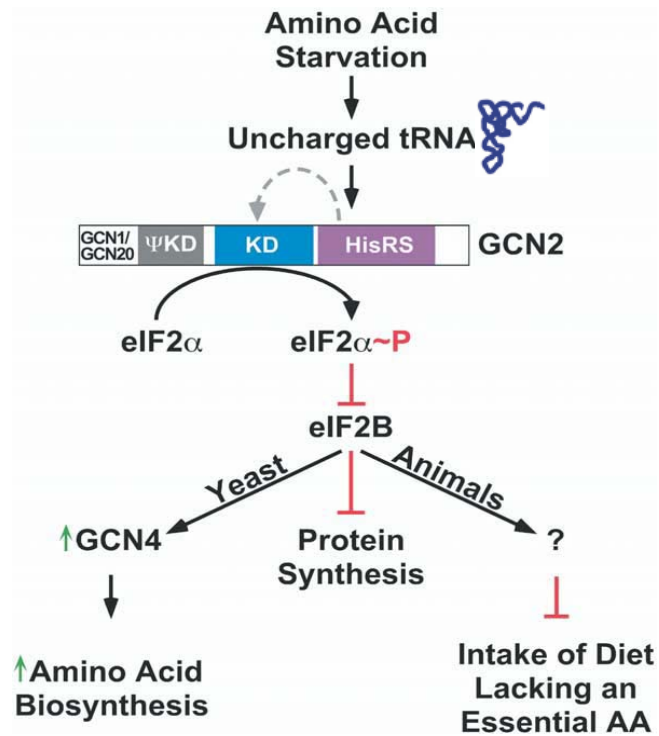


Figura 7

GCN2 y su papel en el mantenimiento de la homeostasis de aminoácidos

La quinasa *GC nonderepressing 2* o simplemente GCN2 se conoce como un sensor primario de escasez de aminoácidos, y una vez activada lleva a adaptaciones celulares marcadas por la disminución de la síntesis global de proteínas acompañada del aumento en la transcripción de genes relacionados con la biosíntesis de aminoácidos. Además de su típico dominio de proteína quinasa contiene un dominio relacionado con histidil-tRNA sintetasa (HisRS) que participa en la activación de GCN2 en respuesta a la falta de aminoácidos y que se une a tRNA no cargados. Los tRNA no cargados se acumulan durante la limitación de aminoácidos y se unen directamente al dominio HisRS

para activar el dominio quinasa adyacente, y el único sustrato conocido es factor de iniciación de la traducción y unión a GTP: eIF2, que es fosforilado en su subunidad α . El factor eIF2 actúa en el primer paso del inicio de la traducción formando un complejo ternario con GTP y el iniciador metionil-tRNA (Met-tRNA) para acercar el Met-tRNA a la subunidad pequeña del ribosoma. El complejo ribosomal resultante se une al mRNA, hace un barrido hasta encontrar el codón iniciador AUG y libera el eIF2-GDP luego de la hidrólisis del GTP. El factor eIF2B es un factor de intercambio de guanina y recicla el eIF2-GDP a eIF2-GTP funcional, pero esta reacción se bloquea por la fosforilación de eIF2 α ³⁷. El resultado final de la activación de GCN2 y fosforilación de eIF2 α es la inhibición de la síntesis de proteína a nivel traduccional y limitación del consumo de aminoácidos.

GCN2 está conservada en todos los eucariotas y se activa por limitación de aminoácidos en cultivos celulares³⁷. Posteriormente se determinó que la corteza piriforme anterior (APC) en el cerebro es la responsable de la respuesta adaptativa de rechazo de dietas limitantes en aminoácidos esenciales. Las neuronas piramidales de esta región se activan por deficiencia intracelular de aminoácidos esenciales sin un receptor selectivo extracelular. Siendo así, la notable presencia de GCN2 en el cerebro de mamíferos y el aumento de eIF2 α fosforilado en la APC de animales alimentados con dietas deficientes de aminoácidos provocó mayor interés en el estudio de GCN2 y de la vía de transducción de señal que culmina con el rechazo de las dietas deficientes en aminoácidos esenciales. Investigaciones subsiguientes³⁷⁻³⁹ mostraron que ocurre un aumento de eIF2 α fosforilado en ratones *wild-type* GCN2^{+/+} pero no en los *null* GCN2^{-/-} luego de 20 minutos de la ingestión de las dietas deficientes. Además, en relación al comportamiento alimentario, se observó que por un lado los ratones GCN2^{+/+} fácilmente rechazaban una dieta carente de leucina o treonina y por el otro los GCN2^{-/-} tenían una respuesta aversiva deficiente e

inclusively consumían más de la dieta deficiente en relación a la dieta balanceada. Estos hechos demostraron que GCN2 tiene una función conservada de mantener la homeostasis de aminoácidos mediante modulación de la biosíntesis en levaduras y por el control del comportamiento alimentario en los mamíferos. También se detectó la presencia de GCN2 en el hígado de ratones en situación de limitación de aminoácidos esenciales en la dieta, por lo que adicionalmente funcionaría en este órgano para suprimir la síntesis proteica como una forma de preservar la masa muscular en animales con privación de alimentos.

En trabajos recientes^{39,40} se demostró que el regulador metabólico GCN2 no solo funciona para modular la síntesis de proteínas, sino que también controla el metabolismo de lípidos en respuesta a la privación de aminoácidos. Normalmente la ausencia de aminoácidos en la dieta es más probable que ocurra en épocas de escasez energética general y esta situación motivó que los científicos buscaran el potencial papel de GCN2 en la regulación de otras vías y no solo el metabolismo de aminoácidos. Se observó que la ausencia de leucina en la dieta de ratones provocaba represión en la síntesis de triglicéridos en el hígado junto con aumento de la movilización de éstos de las reservas adiposas. Por el contrario, los ratones knockout para GCN2 mostraban aumento en la lipogénesis hepática con consecuente esteatosis y reducción de la movilización de lípidos a partir del tejido adiposo. La acumulación de grasa en el hígado se correlacionó con una falla para suprimir a SREBP-1c, un activador transcripcional clave de la vía lipogénica *de novo* y que activa enzimas importantes como la sintasa de ácidos grasos (FAS).

JUSTIFICACIÓN

Sin duda alguna la obesidad es una enfermedad que trasciende fronteras y afecta a todos sin importar la condición social, el género o la edad y para empeorar este cuadro las estadísticas apuntan hacia un incesante y rápido crecimiento. Esta enfermedad por si sola representa una importante carga social que compromete la calidad de vida de las personas y si se toma en cuenta la presencia adicional de otras enfermedades crónicas relacionadas a ella, definitivamente se disminuye la productividad y el tiempo de vida de quienes la padecen, reflejando de esta forma las grandes repercusiones económicas y psicosociales en la sociedad.

El hecho de que la obesidad resulta de la acumulación excesiva de grasa en el organismo es incuestionable, aunque la gran diversidad en las características y manifestaciones clínicas apuntan hacia un fenotipo más complejo. De esta manera se puede apreciar su naturaleza poligénica y la influencia de las interacciones con el medio ambiente en el desarrollo de esta condición. Esta situación confirma las dificultades en la interpretación de las múltiples complicaciones y consecuencias de la enfermedad, así como las dificultades que condicionan las acciones preventivas y el adecuado tratamiento. Con respecto a este punto, el tratamiento empleado actualmente continúa produciendo resultados insatisfactorios, en gran medida derivados de estrategias equivocadas y por el mal uso de los recursos terapéuticos disponibles.

En los últimos años numerosos estudios se han enfocado en identificar el mecanismo de desarrollo de obesidad, que es un proceso que comprende un aumento tanto en el número de células adiposas (hiperplasia a partir de células precursoras) como en el tamaño de estas, haciendo que cada célula retenga mayores cantidades de grasa en su interior (hipertrofia). La habilidad para regular el ciclo celular y de diferenciación de

los adipocitos es crucial para el desarrollo y la fisiología de la obesidad, como también en el origen de otras enfermedades importantes.

Por consiguiente, se hace necesario entender a fondo estos procesos biológicos y eso solo será posible con nuevos abordajes de estudio y la inclusión de los resultados de investigaciones a nivel molecular. La mejor comprensión acerca de los procesos fisiopatológicos será útil para un enfoque más racional en el tratamiento de la obesidad y por lo tanto para la formulación de novedosas estrategias terapéuticas, más efectivas en la obtención de resultados favorables y que a la vez sean capaces de prolongar los logros y minimizar las tan frecuentes recaídas. Estos avances podrán traducirse posteriormente en el planeamiento de programas de actuación tanto a nivel individual como poblacional que permitirán tratar a los pacientes afectados y mejorar su calidad de vida. El enfoque preventivo, a través de la promoción de los estilos de vida saludables, actuando en conjunto con los demás esfuerzos contribuirá para disminuir la aparición de nuevos casos y evitar así que la prevalencia de obesidad en el país continúe creciendo.

Este estudio pretende contribuir a la comprensión de los mecanismos de regulación del proceso de adipogénesis y para ello cuenta con los recursos materiales y tecnológicos necesarios, además de estar en concordancia con los intereses institucionales y las líneas de investigación de la entidad educativa.

HIPÓTESIS

Verificar si la leucina actúa a nivel de modular la adipogénesis para explicar los efectos en la reducción de peso y de la masa grasa.

Es probable que la leucina module la expresión de genes adipogénicos mediante las vías de señalización mTOR y GCN2, y como consecuencia se espera que en el cultivo primario de adipocitos humanos ocurra una disminución en los niveles de expresión de GCN2, PPAR γ , C/EBP α , eIF2 α y SREBP-1c y aumento de mTOR y UCP3.

OBJETIVOS

a) General

Analizar adipocitos humanos en cultivo y determinar cómo la leucina afecta la expresión de genes relacionados con la adipogénesis y el metabolismo de los aminoácidos.

b) Específicos

- Obtener células adiposas viables para cultivo primario a partir de unas biopsias de tejido adiposo visceral almacenadas en el laboratorio.
- Determinar los niveles de expresión de mRNA de los genes de interés mencionados.
- Verificar si la leucina interfiere de alguna manera el proceso de adipogénesis y si actúa por medio de la vía mTOR.
- Constatar la existencia de una relación entre la vía de señalización mTOR y la disminución de genes implicados en el proceso de adipogénesis.
- Comprobar si la vía mediada por GCN2 tiene participación en los efectos atribuidos a la leucina
- Comparación de los resultados obtenidos con estudios similares.

MATERIALES Y MÉTODOS

a) Diseño metodológico

Se trata de un estudio experimental, analítico, prospectivo, longitudinal, comparativo o ensayo clínico controlado (ECC).

b) Población y muestra

Población objetivo: células adiposas del tejido adiposo visceral de humanos obesos en población mexicana.

Población accesible y elegible: biopsias de epiplón extraídas de humanos obesos, sometidos a cirugía bariátrica y almacenadas en el Laboratorio de Biología Molecular.

El tipo de muestreo es por conveniencia y el tamaño de la muestra se estimó en cultivos celulares de aproximadamente un millón de células para cada condición. Los estudios de expresión se realizaron en cuadruplicado y en tres repeticiones como mínimo.

c) Criterios de selección

Inclusión: células adiposas maduras y diferenciadas o preadipocitos inmaduros de TAB, viables para cultivo.

Exclusión: muestras de tejido que no sea de grasa visceral o de diferente linaje celular.

Eliminación: contaminación de las cajas o alteración del medio de cultivo.

d) Variables

Operacionalización de las variables:

- Nombramiento de las variables

Variable Independiente: Tratamiento con leucina.

Variables Dependientes: Expresión génica de PPAR γ , C/EBP α , SREBP-1c, GCN2, eIF2 α , mTOR y UCP3.

Variable Interviniente: Medio de cultivo

- Definición operacional

Tratamiento con leucina: aporte total del aminoácido que será administrado a los cultivos, disuelto en el medio.

Expresión génica: cantidad de mRNA presente en el cultivo en un determinado momento, para crear perfiles de expresión para los genes de interés.

- Indicadores y unidades de medición

Dimensión	Indicador	
	Controles	Casos
Leucina	mM	mM
mRNA PPAR γ	URE	URE
mRNA C/EBP α	URE	URE
mRNA SREBP-1c	URE	URE
mRNA Mtor	URE	URE
mRNA GCN2	URE	URE
mRNA eIF2 α	URE	URE
mRNA UCP3	URE	URE

mM: milimolar, URE: Unidades relativas de expresión

- Escala de medición

Cuantitativas:

Continuas: mRNA PPAR γ , mRNA C/EBP α , mRNA SREBP-1c, mRNA mTOR, mRNA GCN2, mRNA eIF2 α y mRNA UCP3.

Cualitativas:

Nominal simple o dicotómica: tratamiento con leucina

- Definición de los tiempos de medición

De 24 a 48 horas luego del sembrado del cultivo primario para asegurar que las células se adhirieron a las cajas de cultivo.

De 1 a 8 horas de tratamiento con leucina.

e) Plan de tabulación y análisis estadístico

La variable independiente es la presencia de leucina en el medio de cultivo y la variable dependiente está relacionada con la expresión de varios genes que se considera que siguen una distribución normal. Por lo tanto prueba estadística adecuada corresponde al análisis de varianza (ANOVA).

También se harán análisis con la prueba de t de Student para muestras pareadas y la prueba de Chi cuadrada. Se considerará un valor de $p < 0.05$ como estadísticamente significativo.

f) Procedimiento

o Obtención de las muestras de tejido adiposo y digestión del mismo.

El paso inicial para la preparación de un cultivo primario de adipocitos implica la obtención de panículos adiposos que sirvan como fuente de dichas células. Para estos fines hay que contar con sujetos, ya sean humanos o animales, que puedan servir como donantes del tejido que se requiere. Los sujetos deben ser preparados y la remoción del tejido realizada en una cirugía bajo condiciones de asepsia. En este caso particular, esta etapa fue realizada por terceros ya que se partieron de biopsias congeladas de pacientes que serían sometidos a cirugía bariátrica y que fueron extraídas para posteriores análisis. Las muestras fueron donadas y almacenadas en el Laboratorio.

La digestión enzimática es requerida para disociar el tejido en sus componentes celulares y para acelerar el proceso se pica la muestra lo más que se pueda y esto aumenta la superficie de contacto y facilita la acción de la enzima.

Materiales

Biopsia congelada de epiplón en solución de RNA later.

Colagenasa tipo I, a 3mg/ml.

Placas de Petri estériles.

Balanza de precisión.

Pinzas y tijera puntiaguda (de cirugía) estériles.

Solución Hank's.

Ciprofloxacino.

Antibiótico antimicótico (Anti/Anti).

Tubos para centrifugación.

Vórtex.

Procedimientos

- Retirar el tejido o trozos de biopsia del recipiente y colocarlos en una placa de Petri estéril, con cuidado de llevar lo menos posible de la solución RNA later.
- Lavar la sangre y los eritrocitos con una solución preparada a base de Hank's, ciprofloxacino y Anti/Anti. En este paso se pretende disminuir a contaminación de origen. Realizar al menos 2 a 3 lavados.
- Una vez lavado el tejido pesar en una nueva placa de Petri estéril y previamente pesada. Se requiere de al menos ~ 1.5 g de tejido graso.
- A continuación cortar y picar el tejido lo más que se pueda hasta conseguir una consistencia de puré de manzana. Utilizar las tijeras de punta afilada o cualquier otro material que permita el adecuado corte del tejido.

- Con la ayuda de unas pinzas transferir el tejido cortado a un tubo de centrifugación y agregar la Colagensa tipo 1 con un poco de Anti/Anti.
- Llevar todo a baño maría, si es posible con agitación, a 37°C por 40 minutos en adelante hasta comprobar que el tejido está completamente disgregado.
- Aplicar vórtex suave durante 5 minutos para finalizar la disgregación.

○ **Separación de las células y sembrado en los frascos de cultivo.**

El tejido adiposo blanco está compuesto de adipocitos maduros de tamaños variados junto con vasos sanguíneos, linfonodos, nervios y células del estroma vascular. Dentro de la heterogénea población de células del estroma vascular residen además los preadipocitos, fibroblastos, eritrocitos, macrófagos, células endoteliales y otros tipos celulares. Siendo así es crucial aislar y estudiar subpoblaciones específicas de células en estos cultivos; para este fin se utiliza la centrifugación, que ayuda a separar los adipocitos maduros de los otros tipos celulares por su diferencia de densidad (camada flotante del tubo).

Materiales

Centrifuga.

Tubos eppendorf de 2ml.

Cámara contadora de Neubauer.

Reactivos para tinción (Rojo oleoso, naranja de acridina y yoduro de propidio)

Cajas de cultivo (cajas de 24 pozos y cámaras Lab-Tek[®])

Procedimientos

- Centrifugar la suspensión de células a 2000 rpm por 10 minutos a temperatura ambiente para poder separar las células grasas de la solución de disgregación y otros restos celulares.

- Con una pipeta retirar la camada de células flotantes y separarlas en tubos eppendorf.
- Realizar un conteo de las células mediante tinciones especiales utilizando pequeñas alícuotas de la suspensión celular con la cámara de Neubauer.
- Sembrar la cantidad determinada de células en sus respectivas cajas de cultivo (Cajas de 24 pozos y Lab-Tek[®]).
- Dejar reposar por lo menos una hora antes de agregar el medio de cultivo para asegurar que las células se adhieran correctamente a la caja.
- Almacenar en una incubadora a 37°C y 5% de CO₂.

○ **Cultivo celular de adipocitos en medios diferenciados.**

Una vez aislada, la fracción a ser estudiada se separa y siembra en las correspondientes cajas de cultivo. La adhesión de las células a las placas es facilitada por la inclusión del suero fetal bovino al medio de cultivo y puede llegar a contener hasta 10% de suero, dependiendo del tipo celular con que se esté trabajando. El crecimiento de adipocitos diferenciados es optimizado mediante el uso de tiempos de cultivo, medio y suplementos apropiados.

Materiales

Frascos estériles.

Medio RPMI.

FGF básico o tipo 2.

EGF.

Insulina.

Transferrina.

Glucosa.

Suero fetal bovino (FBS).

Antibiótico/Antimicótico.

Procedimientos

- Preparar el medio RPMI por reconstitución y luego filtrarlo en una campana de flujo laminar.
- Preparar el medio adipogénico agregando el RPMI y los reactivos en las cantidades requeridas. Almacenar a temperaturas de 4-8°C.
- Agregar una pequeña cantidad a las cajas de cultivo a fin de que se puedan cubrir todas las células.
- Almacenar a 37°C y 5% de CO₂ y realizar cambios cada 2 a 3 días.

○ **Aplicación del tratamiento experimental a las células en cultivo.**

El tratamiento experimental debe ser aplicado generalmente durante la proliferación o durante varias etapas de diferenciación. En este caso las células utilizadas son ya maduras y están completamente diferenciadas por lo que el tratamiento se aplica en el menor tiempo posible, ~24h luego del sembrado, lo que facilita que las células se adapten mejor al medio y a las condiciones de cultivo.

La sustancia a ser administrada debe ser preparada teniendo en cuenta sus características y de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Cuando está lista, se debe esterilizar para mantener las condiciones del cultivo ya que se agrega directamente al medio.

Materiales

Frasco estéril.

Balanza de precisión.

L-Leucina (MP Biomedicals).

Solución Hank's.

Autoclave

Procedimientos

- Pesar una cantidad determinada de L-leucina y disolverla en un volumen de solución Hank's.
- Colocar en un frasco y llevar a esterilizar en una autoclave por 20 minutos. Luego almacenar en refrigerador.
- Una vez estéril manipularlo en una campana de flujo laminar y agregar la cantidad adecuada directamente en el medio de cultivo a las células a ser tratadas.
- Dejar reposar y luego cosechar las células.

○ **Cosechado y lisis de las células en los tiempos determinados.**

Una vez transcurrido el tiempo de tratamiento las cajas se retiran de la incubadora y se dejan a temperatura ambiente, pudiendo ser manipuladas fuera de las condiciones de esterilidad. Los medios deben ser retirados por completo y se procede directamente a la aplicación del buffer de lisis para la extracción de RNA posterior.

Materiales

Kit de extracción de RNA.

PBS.

Tubos eppendorf.

Microcentrífuga.

Procedimientos

- Una vez transcurrido el tiempo de tratamiento retirar el medio de cultivo de las cajas y colocarlos en tubos eppendorf para recuperar las células que no se adhirieron.

- Centrifugar por 10 minutos a 2000 rpm y luego recuperar el sobrenadante. Colocar en un nuevo tubo eppendorf y reservar.
- En las cajas de cultivo agregar un volumen de buffer de lisis del kit y con la ayuda de un gendarme o una punta de pipeta raspar bien toda la superficie del frasco para despegar las células.
- Retirar el buffer de lisis y juntar todo en el tubo que se había procesado anteriormente.
- Enjuagar con un volumen de PBS y recuperar todo en el mismo tubo.
- Proceder inmediatamente a la extracción o almacenar a -20°C hasta su uso.

○ **Extracción de RNA total con kits comerciales estandarizados.**

El aislamiento de RNA de alta calidad y largo total de los tejidos es de fundamental importancia para la práctica de investigación. Las técnicas más idóneas deben ser capaces de inhibir a las ubicuas/omnipresentes RNAsas hasta que el RNA sea separado de las proteínas celulares. El tiocianato de guanidina es el reactivo más efectivo y ampliamente utilizado en el aislamiento del RNA por su fuerte poder para inhibir las ribonucleasas.

El kit empleado está diseñado para ser utilizado a pequeña escala (mini), especial para la purificación de RNA total de células de cultivo.

Materiales

High Pure RNA Isolation Kit de Roche

Microcentrífuga.

Tubos eppendorf.

Procedimientos

- Aplicar 15 segundos de vórtex a las muestras y transferirlas dentro de las columnas proporcionadas en el kit.
- Colocar los tubos bien tapados en una centrifuga, y centrifugarlos por 15 segundos a 8000 x g (~ 10.000 rpm).
- Luego de la centrifugación remover la columna del tubo colector y descartar el líquido que pasó a través de la misma. Combinar nuevamente la columna con el tubo colector usado.
- En caso de que haya sobrado algo de muestra volver a repetir todo el procedimiento.
- Agregar 500 µl del *Wash Buffer I* y centrifugar por 15 segundos a 8000 x g (~ 10.000 rpm). Descartar el líquido sobrante y volver a combinar la columna.
- Agregar 500 µl del *Wash Buffer II* y centrifugar por 15 segundos a 8000 x g (~ 10.000 rpm). Descartar el líquido sobrante y volver a combinar la columna.
- Agregar 200 µl del *Wash Buffer II* y centrifugar por 2 minutos a velocidad máxima (~ 13.000 x g) para remover cualquier residuo de los *Wash Buffer*.
- Descartar el tubo colector e insertar la columna en un tubo eppendorf de 1.5 ml nuevo, limpio y estéril.
- Eluir el RNA. Agregar de 20 a 25 µl del *Elution Buffer* en el centro de la columna y centrifugar por 1 minuto a 8000 x g (~ 10.000 rpm).
- Rotular el tubo y almacenarlo a -80°C hasta su uso.

○ **Cuantificación del RNA y gel de electroforesis.**

En este paso se comprobó la calidad de la extracción de RNA por medio de electroforesis en gel de agarosa. La pureza final y la cuantificación de las muestras se calcularon con la razón de absorbancia obtenida con dos mediciones, a 260 y 280 nm.

Una vez cuantificado en RNA de cada muestra se realizaron diluciones para dejar todas las muestras a una concentración de 100 ng.

Materiales

Espectrofotómetro (JENWAY 6305).

Agua bidestilada.

Agarosa grado biología molecular.

MOPS 5X

Formaldehído al 37%

Bromuro de etidio.

Cámara de electroforesis.

Procedimientos

- Para la cuantificación se utilizan longitudes de onda de 260nm y 280 nm para determinar la absorbancia de las muestras.
- Se utilizaron 2µl de RNA y 998 µl de agua bidestilada para realizar las correspondientes lecturas.
- Una vez concluida la cuantificación se realizaron los cálculos necesarios para la determinación de los valores en ng.
- Para el gel de agarosa a 1.5% se mezclan la agarosa, el agua bidestilada, el MOPS 5X y el bromuro de etidio hasta conseguir una mezcla homogénea que luego es puesta a solidificar.
- Cuando está listo se coloca en la cámara de electroforesis, adicionando el buffer específico de RNA y luego la muestra con el colorante en cada uno de los pozos del gel (3µl de muestra + 2µl de colorante).
- Se cierra la cámara y se deja corriendo por 20 minutos a ~60 volts.
- Revelar el gel en una cámara con luz ultravioleta.

○ **Síntesis de cDNA con kits comerciales estandarizados (RT-PCR).**

La RT-PCR (reverse transcription-polymerase chain reaction) es un método sensible para la detección de los niveles de expresión de mRNA. Tradicionalmente implica dos pasos: la reacción de RT y la amplificación por PCR. El RNA es primero transcrito a cDNA usando una transcriptasa inversa y el cDNA resultante es usado como templado para la posterior amplificación por PCR usando primers específicos para uno o más genes. La RT-PCR también puede ser llevada a cabo como una reacción de un solo paso en el cual todos los componentes están mezclados en un tubo antes del inicio de la reacción. Aunque la RT-PCR de un solo paso ofrece simplicidad y conveniencia y minimiza la posibilidad de contaminación, el cDNA resultante no puede ser usado reiteradamente como en el caso de la RT-PCR de dos pasos.

El kit empleado está diseñado para hacer la transcripción reversa de RNA de una variedad de fuentes y para distintas aplicaciones con muy buenos resultados.

Materiales

Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit de Roche.

Tubos de reacción para PCR.

Microcentrífuga.

Termociclador con tapa térmica.

Procedimientos

- Descongelar y centrifugar todos los reactivos manteniéndolos todo el tiempo en hielo.
- En los tubos de PCR agregar 2µl de *Random Hexamer Primer* y un volumen variable de agua bidestilada y del RNA de la muestra para completar 13µl.

- Desnaturalizar la muestra calentando el tubo por 10 minutos a 65°C en el termociclador de tapa térmica. Al terminar colocar inmediatamente en hielo.
- A seguir agregar los demás reactivos hasta completar un volumen de 20µl: *Transcriptor Reverse Transcriptase Buffer, Protector RNase Inhibitor, Deoxinucleotide Mix* y *Transcriptor Reverse Transcriptase*.
- Cerrar los tubos y mezclarlos con cuidado utilizando la mano. Centrifugar brevemente para asegurarse que todo el material quede en la parte baja del tubo.
- Colocar nuevamente en el termociclador e incubar por 10 minutos a 25°C seguidos de 30 minutos a 55°C. Por último inactivar la enzima a 85°C por 5 minutos.
- Para detener toda la reacción colocar los tubos en hielo al finalizar la incubación y luego almacenar a -20°C hasta su uso.
- Cuantificar con espectrofotómetro para verificar la reacción.

o **Detección y cuantificación de secuencias de DNA por PCR en tiempo real.**

La PCR en tiempo real, también conocida como qPCR o PCR cinética, es un método cuantitativo para la determinación absoluta de un gran número de templados de PCR (como DNA o cDNA) en una reacción. Hay 2 clases de PCR tiempo real y ambos métodos requieren un termociclador especial equipado con una cámara sensible que monitorea la fluorescencia en cada capilar, a intervalos frecuentes durante toda la reacción. La PCR tiempo real basada en sondas específicas, también se conoce como PCR TaqMan, requiere de un par de primers (cebadores) como la PCR convencional y una sonda fluorogénica adicional que es un oligonucleotido con dos fluorocromos que hibrida en el amplicón, en una zona intermedia entre el cebador directo (*forward*) y el inverso (*reverse*). En la técnica basada en fluorocromos inespecíficos, también

conocida como método SYBR Green, se requiere un fluorocromo para DNA de doble cadena que se une inespecíficamente al amplicón recién sintetizado y le otorga fluorescencia. El método TaqMan es más exacto y confiable pero también más caro.

El objetivo de este procedimiento es determinar la expresión relativa de los genes de interés, y para esto se emplean sondas LNA TaqMan pertenecientes a una librería del transcriptoma de humanos (Roche). En la mezcla de reacción tipo TaqMan también se requieren además de cebadores específicos sentido y antisentido diseñados para cada uno de los genes estudiados (PPAR γ , C/EBP α , SREBP1, GCN2, eIF2 α , mTOR y UCP3) y el 18S ribosomal como gen constitutivo de referencia para la normalización y cuantificación de la expresión relativa de los genes considerados.

Materiales

LightCycler® FastStart DNA Master^{PLUS} HyProbe de Roche.

Tubos eppendorf de 500 μ l.

Tubos capilares (Roche Diagnostics GMBH).

Microcentrífuga.

Termociclador LightCycler 1.5 con sistema basado en carrusel.

Software de análisis LightCycler versión 1.5

Procedimientos

- Primeramente se deben descongelar todos los reactivos y mantenerlos durante toda la manipulación en hielo.
- A continuación se prepara el *mix* o mezcla de reacción para un volumen final de 10 μ l. Se agregan todos los componentes, se agita suavemente y por último se centrifuga brevemente para asegurar que la preparación quede al fondo del tubo.

Reactivo	Volumen
H ₂ O MilliQ	4.9 µl
Master TaqMan	2 µl
Cebador F	0.5 µl
Cebador R	0.5 µl
Sonda	0.1 µl
cDNA de la muestra	2 µl
Volumen final	10 µl

- Se agregan 8µl de la mezcla dentro de cada capilar y a seguir 2µl de cDNA obtenido de cada muestra. Se prepara un capilar demás al no se le pone el cDNA y actúa como control negativo de la reacción.
- Una vez preparados los capilares son cerrados con una tapa apropiada y centrifugados para que la mezcla descienda y quede bien posicionada para la reacción.
- Se colocan los tubos ordenados dentro del carrusel del termociclador y se activa el programa que incluye una preincubación, la reacción propiamente dicha y un enfriamiento final.

Programa	Ciclos	Temperatura	Tiempo
Preincubación	1	95°C	10 minutos
Amplificación	45	95°C	10 segundos
		60°C	35 segundos
		72°C	4 segundos
Enfriamiento	1	40°C	30 segundos

- La cuantificación se realizó por medio de interpolación de los valores dentro de una curva estándar. Las curvas estándar para todos los genes se realizaron a diferentes diluciones exponenciales de la concentración inicial del cDNA. En este caso se usó una dilución de 1/10.000.
- Los datos fueron normalizados usando un gen constitutivo 18S para determinar las diferencias en la eficiencia de la amplificación y la cantidad de templado en cada reacción.

Diseño de cebadores

Se llevó a cabo con la ayuda del programa de cómputo ProbeFinder versión 2.45 (Roche, CA).

PPAR γ

C/EBP α

SREBP1

GCN2

eIF2 α

mTOR

UCP3

18S

RESULTADOS

Para preparar el cultivo primario de adipocitos humanos se utilizaron como fuente de dichas células biopsias de epiplón, correspondientes a tejido adiposo visceral, de pacientes que se sometieron a cirugía bariátrica para el tratamiento de la obesidad. El epiplón u omento es un repliegue específico que forma el peritoneo al unir ciertas vísceras entre sí. Está constituido por dos hojas entre las cuales transcurren los vasos sanguíneos y nervios que se distribuyen por los órganos de la cavidad abdominal. Se divide en dos partes, el menor o gastrohepático y el mayor o gastrocólico, y es en este último donde se observa una característica acumulación de tejido adiposo en las personas que padecen de obesidad.

Las muestras en su mayoría pertenecían a pacientes del sexo femenino y la media de edades fue de 35.2 años. Al realizarse el procedimiento quirúrgico se extrajeron pequeños cortes de grasa que se depositaron en tubos de 15 ml inmersos en solución de RNA later para su conservación. Este reactivo es ampliamente utilizado para el almacenamiento de tejidos ya que estabiliza y protege rápidamente el RNA celular. Su uso evita la necesidad de procesar inmediatamente las muestras de tejido o de emplear la congelación en nitrógeno líquido para su uso posterior. Las biopsias fueron donadas al Laboratorio y almacenadas a -20°C hasta el momento de uso. El tiempo medio de almacenamiento fue de ~ 25 días, siendo que las muestras que llevaban más de 3 meses en congelación presentaban muy bajo rendimiento de RNA total para los estudios de expresión génica pero seguían siendo viables para la realización de las tinciones.

Luego de la digestión y centrifugación se forma una capa lipídica flotante en donde se encuentran tanto las células adiposas así como gotas de grasa pura (que no son células). Esta capa superficial es luego recuperada y homogenizada para el sembrado en las respectivas cajas de cultivo. Para los estudios de expresión se utilizaron cajas de 24

pozos y para las tinciones cámaras Lab-Tek[®] de 8 pozos, siendo que a cada uno se le administró un colorante específico o la combinación de los mismos.

En un inicio se habían sembrado todas las capas que se forman luego de la centrifugación pero se observó que solo se obtenían células viables de la capa superior. La capa del medio no contiene células y la del fondo contiene los distintos tipos celulares que no son adipocitos; dichas células corresponderían a la variada población de células del estroma vascular.

La congelación a la que es sometida la muestra muy probablemente afectó a las células del estroma de tal forma que no pudieron ser cultivadas. En los adipocitos se observan grandes acúmulos de lípidos y un escaso citoplasma lo que pudo ejercer un efecto protector ante las bajas temperaturas. La congelación supone la solidificación del agua contenida dentro de las células con consecuente formación de cristales de hielo de diferentes tamaños. Hay que tener en cuenta que también puede ocurrir deshidratación, desnaturalización de proteínas y dependiendo de la velocidad de la formación de los cristales, van a ocurrir cambios que son capaces de romper y alterar la estructura e integridad de las células.

Es necesario tener en cuenta todos estos puntos a la hora de trabajar con cultivos primarios. Se deben monitorear cuidadosamente todos los pasos desde la preparación de los pacientes para la toma de la muestra hasta el procesado final a fin de obtener el mejor rendimiento posible en cuanto al número de células viables por cada tejido. Así, es importante tener control de la cantidad mínima de tejido que se requiere, la forma en que se realiza la toma de muestra y cuanto tejido no adiposo es colectado junto con la misma y el tiempo y las condiciones de almacenamiento; estos son los principales factores a ser considerados y de los cuales van a depender los resultados del trabajo.

Tinción celular

La tinción es un procedimiento utilizado para identificar y hacer visibles los tejidos biológicos o determinadas estructuras que componen a las células, y para esto se hacen uso de diversos colorantes orgánicos. La elección del tipo de colorante a ser empleado depende del tipo de análisis que se desea realizar y de la afinidad específica del mismo hacia los componentes celulares que serán visualizados.

La tinción con azul tripano es un procedimiento bien establecido⁴¹ que se utiliza para el recuento y detección de células viables. Se trata de un colorante soluble en agua cuyos grupos cargados amino y sulfato le impiden atravesar las membranas celulares intactas; por tanto solo tiñe células muertas o dañadas. Sin embargo con los adipocitos esta técnica es difícil de realizar debido a la escasa cantidad de citoplasma que presentan. Siendo así, se deben contemplar otros métodos de tinción que permitan distinguir los adipocitos diferenciados como tal, los adipocitos viables, además de la necesidad de diferenciar las células de las gotas de grasa.

En este caso particular se realizó primeramente el procedimiento de tinción del rojo oleoso (*Oil red O staining*) para evidenciar y comprobar la presencia de células adiposas íntegras extraídas a partir de las biopsias congeladas. Esta técnica también se utiliza para obtener un registro visual del efecto de un determinado tratamiento en la deposición de lípidos o para determinar el efecto de dicho tratamiento en el tamaño de la célula adiposa⁴².

El rojo oleoso es un colorante que puede ser observado en un microscopio invertido convencional, a luz visible y que tiñe los adipocitos y las grasas en un tono rojo ladrillo. Se observa que el pigmento se une con mucha afinidad a los cultivos, confirmando la presencia de lípidos, aunque se deben realizar tinciones diferenciales para identificar claramente las células viables de las grasas libres. En su mayoría se

observaron células y no tantas gotas de grasa libre lo que puede deberse a que se utilizaron células adheridas a las cajas de cultivo y no células en suspensión. (Imagen 1)

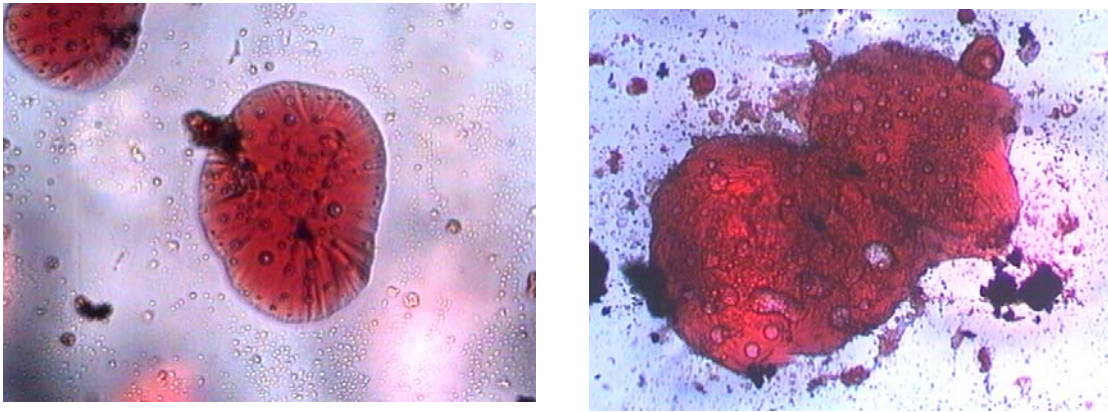


Imagen 1. Tinción de las células adiposas con rojo oleoso (10X)

A continuación para distinguir los adipocitos de las gotas de lípidos flotantes liberadas por las células dañadas se aplicó una combinación del rojo oleoso junto con naranja de acridina. Este fluorocromo se une a los ácidos nucleicos, en especial al DNA, por lo que actúa como marcador incorporándose solo a las células y no a las grasas libres.

Esta imagen presenta el aspecto de unas células vistas con luz visible y sin una coloración particular (campo brillante) y las mismas células luego de ser teñidas con naranja de acridina, mostrando una intensa fluorescencia al ser expuestas a luz ultravioleta. (Imagen 2) En teoría las células deberían teñir el núcleo de un color y el citoplasma de otro, pero en estas células que tienen un núcleo pequeño desplazado hacia la periferia y citoplasma reducido, el patrón de tinción fue muy particular. La mayoría de las células se colorean totalmente en presencia de luz UV, y otras se muestran menos intensas en su interior y con un halo más marcado alrededor (flecha amarilla). No pudimos determinar el motivo de esto pero suponemos que se puedan tratar de células llenas de lípidos que se están despegando de la superficie de la caja.

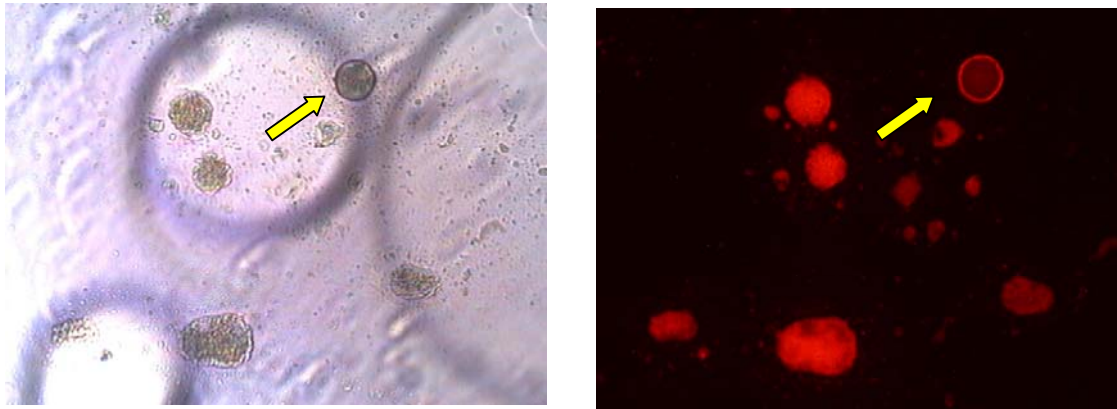


Imagen 2. Tinción de las células con naranja de acridina (10X). Campo brillante (izq.) y naranja de acridina (der.)

Las siguientes imágenes presentan la combinación de ambos colorantes para detectar un adipocito viable, que aparece como positivo para rojo oleoso y para naranja de acridina. Se observa una célula de gran tamaño teñida con rojo oleoso y la misma célula vista con luz UV con la marca fluorescente característica. (Imagen 3)

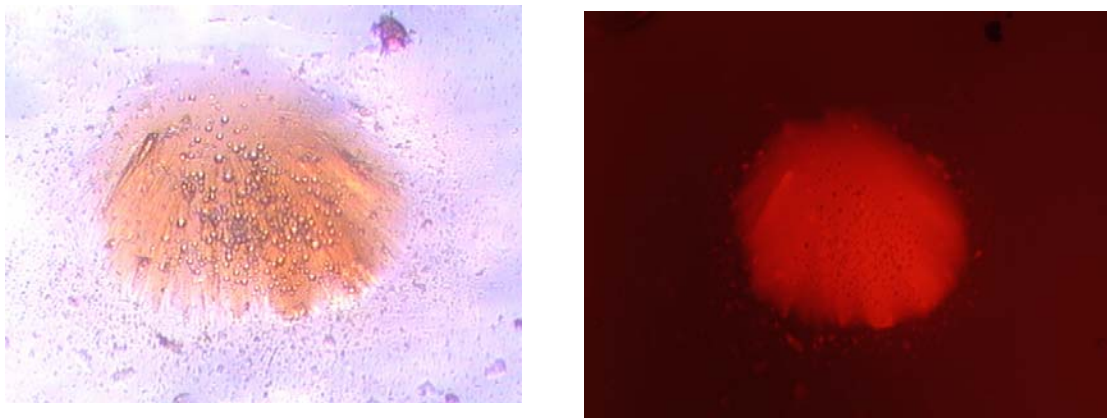


Imagen 3. Tinción de una célula madura con rojo oleoso y naranja de acridina (10X). Rojo oleoso (izq.) y naranja de acridina (der.)

El yoduro de propidio también es un agente intercalante que se inserta entre los pares de bases apilados del DNA gracias a su estructura aromática. Posee propiedades fluorescentes y al ser excitado con luz UV emite luz visible. Pero a diferencia del naranja de acridina, que entra libremente en todas las células, el yoduro de propidio es excluido y solo entra en las células dañadas. Ambos compuestos presentan fluorescencia intensa en

el núcleo pero la fluorescencia del yoduro de propidio enmascara la del naranja de acridina en las células muertas.

Primero se tiñeron los cultivos con rojo oleoso y yoduro de propidio para identificar adipocitos muertos, pero se encontró que las células eran positivas para rojo oleoso y negativas para yoduro de propidio. La falta de señal para el yoduro de propidio puede deberse a que las células estaban intactas o sin daños. Sería razonable suponer esto ya que los cultivos utilizados tenían menos de una semana de haber sido sembrados, eran monitoreados constantemente y los medios de cultivo fueron reemplazados por más medio fresco en los tiempos y condiciones apropiadas. (Imagen 4)

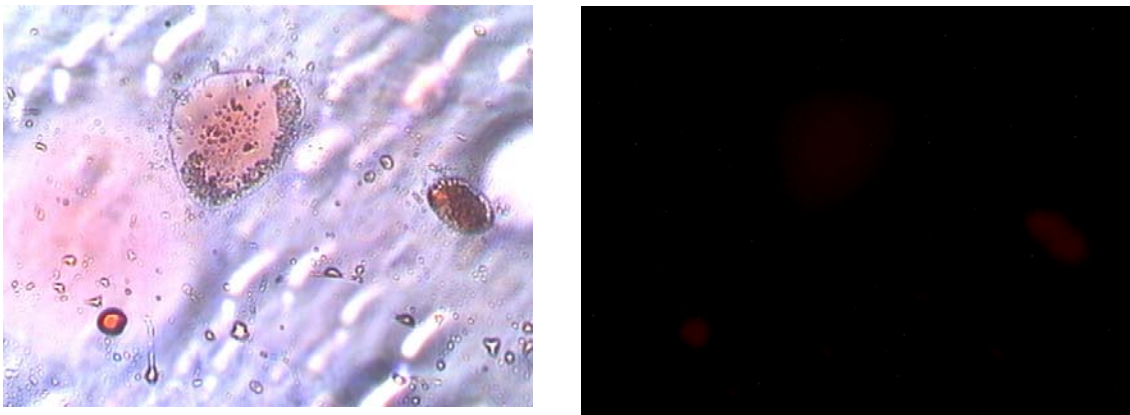


Imagen 4. Células teñidas con rojo oleoso y yoduro de propidio (10X). Rojo oleoso (izq.) y yoduro de propidio (der.)

En las imágenes que siguen se muestran unas células teñidas con naranja de acridina y yoduro de propidio. Como se mencionó anteriormente ambos colorantes presentan señal evidente al ser expuestos a la luz UV y en este caso solo hubo tal señal por parte del naranja de acridina. (Imagen 5) En estos cultivos no se observó la marca roja fluorescente que es característica del yoduro de propidio, lo que resulta consistente con las imágenes anteriores en donde se observó la marca del rojo oleoso pero no del yoduro de propidio, confirmando una vez más que en estos cultivos no se aprecia la señal de este colorante.

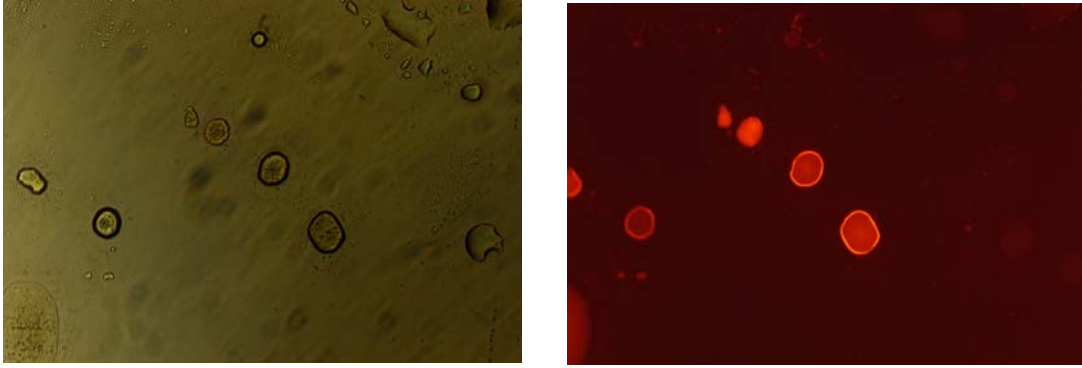


Imagen 5. Células teñidas con naranja de acridina y yoduro de propidio (10X). Campo brillante (izq.) y fluorescencia con luz UV (der.)

Viabilidad

El MTT o bromuro 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol es un ensayo colorimétrico que se basa en la reducción metabólica del bromuro por la succinato-deshidrogenasa mitocondrial activa de células viables, dando como resultado un producto muy coloreado de azul. Es ampliamente utilizado para medir la supervivencia y proliferación celular de las células tratadas. Este ensayo proporciona una buena correlación entre el número de células viables y los valores de absorbancia del formazan resultante, pero no es específico para adipocitos.

Cristal violeta? El cristal violeta es un colorante catiónico comúnmente empleado para realizar tinciones diferenciales como en el caso de la tinción de Gram.

En ambos casos se observó una disminución de la absorbancia a medida que transcurría en tiempo. Inicialmente se registraron valores altos de cristal violeta y medios de MTT que fueron disminuyendo gradualmente durante el curso del tratamiento. En el caso del MTT la disminución inicial fue menor que de la segunda a la tercera semana que fue la máxima. Con el cristal violeta la disminución fue más o menos constante sugiriendo que mejor tiempo para utilizar las células es dentro de las 2 primeras semanas ya que luego de eso se ve una disminución considerable de la actividad mitocondrial.

(Figura 8)

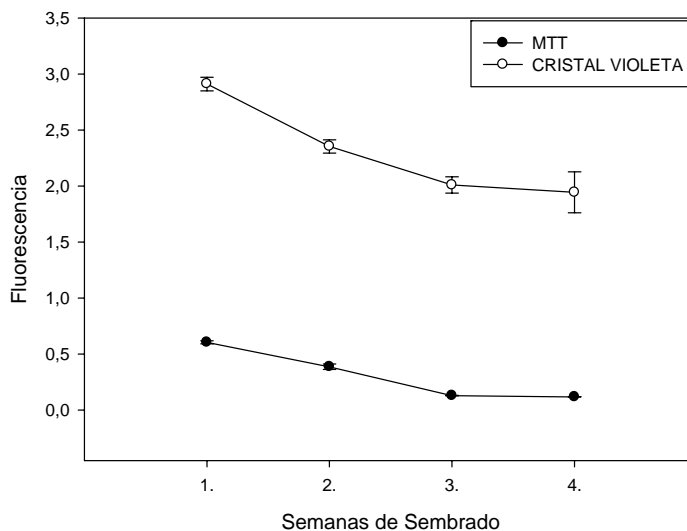


Figura 8

Ensayos de viabilidad con MTT y cristal violeta aplicados a diferentes tiempos en un cultivo primario de adipocitos humanos

Expresión génica

Las células fueron sembradas luego de la digestión y centrifugación en las cajas de cultivo e incubadas por 24 horas antes de la aplicación del tratamiento. En cada pozo, que contenía 500µl del medio adipogénico, se agregaron distintas cantidades de la solución de leucina para alcanzar las concentraciones deseadas (2.5, 5, 10 y 20mM). La excepción fueron las muestras de control (C) y vehiculo (V), en la primera no se agregó nada y en la segunda se agregó un volumen del agua MilliQ en la que se disolvió la leucina para controlar así esa fuente de posible variabilidad. La solución se agregó directamente al medio y se dejó incubar por algunas horas, una vez transcurrido el tiempo de tratamiento se procedió inmediatamente la extracción del RNA total.

Efecto de la leucina en la expresión de los principales factores transcripcionales adipogénicos.

Los factores de transcripción adipogénicos son los responsables del desarrollo y la funcionalidad de la célula grasa. El C/EBPα es uno de los primeros factores transcripcionales que aparecen durante la diferenciación de los adipocitos. En este trabajo

se observó que la expresión de $C/EBP\alpha$ aumentó a medida que aumentaron las concentraciones de leucina, siendo que el mayor valor encontrado fue a 10mM del aminoácido. En relación a $PPAR\gamma$ practicamente no hubo variación hasta llegar a 20mM en donde la expresión aumentó significativamente. Para $SREBP-1$ se vio que no había expresión en las muestras de control y vehiculo, este gen solo se expresó en las muestras que recibieron tratamiento y también mostró un aumento gradual consistente con el aumento de concentraciones de leucina. (Figura 8)

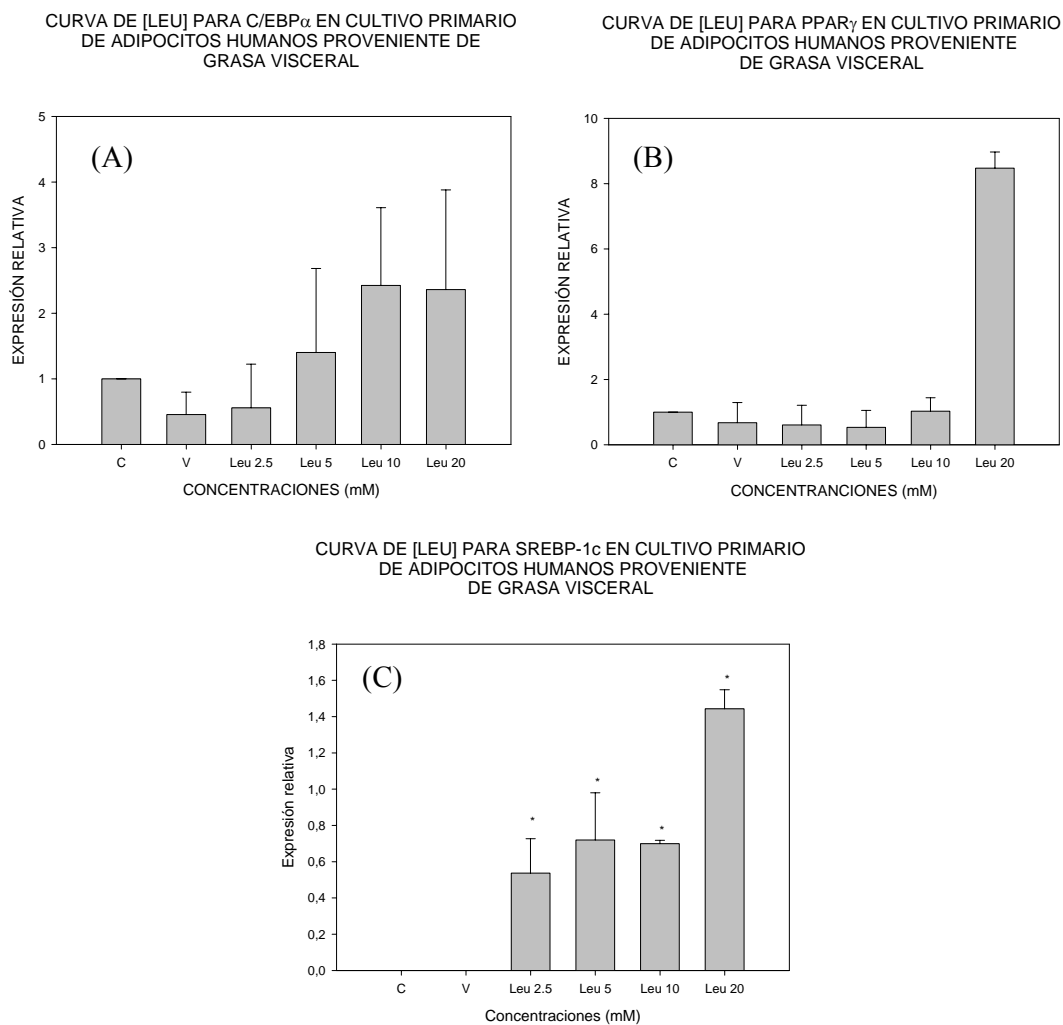


Figura 9

Efecto de las diferentes concentraciones de leucina en los factores transcripcionales adipogénicos $C/EBP\alpha$ (A), $PPAR\gamma$ (B) y $SREBP-1c$ (C)

Estos resultados sugieren que al ser estimulados con leucina, los cultivos de adipocitos viscerales de humanos obesos muestran una tendencia de aumento en la expresión de los factores de transcripción adipogénicos más importantes.

Presencia de GCN2 en tejido adiposo visceral

GCN2 es un sensor metabólico que se activa ante la falta de un aminoácido esencial y conlleva a adaptaciones metabólicas y comportamentales en mamíferos para regular la síntesis de proteínas y la disponibilidad de aminoácidos circulantes. Se sabe de la presencia abundante de esta proteína en el cerebro y así como en el hígado de roedores. En este modelo se encontró que GCN2 aparece normalmente en las células adiposas sin tratamiento y que luego de la introducción de la leucina los valores del mRNA caen dramáticamente. (Figura 10 A)

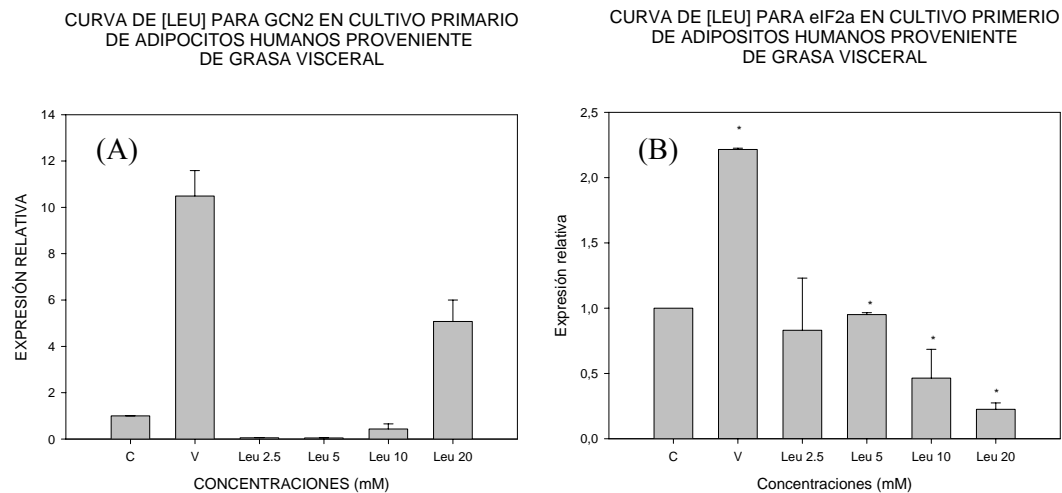


Figura 10

Efecto de las diferentes concentraciones de leucina en la expresión de GCN2 (A) y eIF2α (B)

El factor eIF2α es uno de los componentes principales de la maquinaria de inicio de la traducción de proteínas y es hasta el momento el único blanco rí abajo conocido de GCN2. En este trabajo se observó un comportamiento similar con esta proteína donde se apreció también disminución, aunque mucho más gradual que GCN2. (Figura 10 B)

Time course de GCN2

En la gráfica se observa que en los primeros 20 minutos luego de la aplicación del tratamiento experimental ocurre una ligera disminución en la expresión de GCN2 que se mantiene constante hasta los 40 minutos. A partir de ese momento los niveles comienzan a aumentar hasta un punto máximo que es alcanzado entre las 2 y 4 horas.

Este resultado sugiere el tiempo en el que ocurre una mayor expresión de GCN2 es alrededor de las 4 horas y que en este modelo de células adiposas viscerales en cultivo es capaz de detectar el estímulo de la leucina un poco más temprano, entre 40 y 60 minutos.

TIME COURSE DE GCN2 A 10mM DE LEU EN CULTIVO PRIMARIO DE ADIPOCITOS HUMANOS, DE GRASA VISCERAL

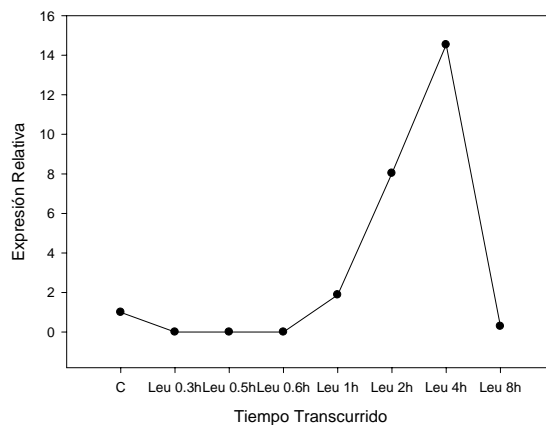


Figura 11

Efecto del tiempo de incubación con leucina a 10mM en la expresión de GCN2

En cuanto a la expresión de mTOR y UCP3 se vio que en estas condiciones no fue posible obtener respuesta de ninguno de los dos genes. Ambos fueron probados en diversas ocasiones y con muestras diferentes pero en ninguna de las veces se obtuvo expresión o detección de amplicones.

DISCUSIÓN

Desde ya hace muchos años el tejido adiposo viene siendo objeto de un intenso escrutinio por parte de la comunidad científica, en diversos ámbitos y por varias razones. Una de las razones por la que ha recibido semejante protagonismo es porque este tejido funciona como un enlace crítico en el mantenimiento del balance energético sistémico. No solo sirve como sitio principal para el almacenamiento de energía en la forma de triglicéridos sino que también contribuye en el metabolismo sistémico de glucosa y lípidos por medio de su papel como órgano endócrino^{16,43,44}. La creciente explosión en la incidencia de obesidad y otras enfermedades crónicas relacionadas como la diabetes tipo 2 han enfocado la atención en todos los aspectos de la biología del adipocito, incluyendo el proceso de adipogénesis.

Funcionalmente la diferenciación celular puede ser vista como un cambio en los patrones de expresión génica, donde los transcritos que determinan el estado primitivo y multipotente dan paso a aquellos que definen el fenotipo final¹⁶. Los cambios morfológicos como las alteraciones en la forma de la célula y la acumulación de lípidos que acompañan la adipogénesis son el resultado de la acción de genes que son inducidos a medida que la célula se va diferenciando. En este caso, los cambios en la expresión y actividad de factores transcripcionales definen el proceso de diferenciación.

En el desarrollo del adipocito se da una secuencia muy ordenada de eventos que van desde un cambio de preadipocitos en división a células con detención del crecimiento y finalmente a células completamente diferenciadas. Se ha propuesto que la detención del crecimiento está asociada a cambios en la expresión de varias quinasas inhibitoras dependientes de ciclina, incluyendo p18, p21 y posiblemente p27¹⁶. Este hecho coincide con la capacidad de PPAR γ de inducir específicamente la expresión de p18 y p21 en

líneas celulares; así como también que la propiedad antimitótica de C/EBP α se ejerce a través de la expresión y estabilización de p21.

El proceso de diferenciación terminal ocurre en un periodo de varios días en células en cultivo. Luego del segundo y permanente estado de detención del crecimiento sigue la acumulación de marcadores fenotípicos del adipocito maduro. Los primeros eventos incluyen el redondeo de los preadipocitos y la expresión de mRNAs como el de la lipasa lipoproteica (LPL) y la inducción de los componentes transcripcionales mencionados anteriormente. Esto genera la activación de la expresión, ya sea *de novo* o mejorada, de la mayoría o de todos los genes que caracterizan el fenotipo adipocítico. Algunos de ellos son glicerolfosfato deshidrogenasa, sintasa de ácidos grasos (FAS), acetil CoA carboxilasa, enzima málica, Glut 4, receptor de insulina y aP2. A lo largo de este proceso las gotículas de lípidos comienzan a aparecer en el citoplasma, con el tiempo se vuelven bastante grandes y a menudo se fusionan en una o unas pocas gotas mayores.

En este trabajo se analizaron adipocitos viscerales maduros de humanos y se encontró que en presencia de leucina ocurre un aumento de los factores de transcripción adipogénicos más importantes. La función de estos factores en las células es el de mantener el estado de diferenciación terminal y promover la expresión de los genes requeridos para la función adipocítica. En un inicio habíamos pensado en la hipótesis de que si la leucina actuaba a nivel de adipogénesis debería modular la expresión de los factores de transcripción. Entonces se vería una afectación de la diferenciación de los preadipocitos y en el mantenimiento del estado diferenciado en las células maduras. Pero al parecer lo que ocurre es justamente lo contrario, ya que al parecer el efecto que tiene la leucina es promover es el proceso como un todo.

Cabe destacar que fue posible realizar cultivos primarios viables de células que llevaban un tiempo bajo congelación. A pesar de los efectos del tiempo y de las bajas

temperaturas se obtuvieron células íntegras aunque la viabilidad disminuía rápidamente después del sembrado. Aun así, tanto los estudios de expresión génica, como las tinciones y ensayos de viabilidad se realizaron con buenos resultados.

Los últimos avances en investigación biomédica refuerzan el papel de los aminoácidos como señales nutricionales en la regulación de varios procesos celulares, entre ellos el control de la expresión génica a través de la modulación de la traducción del mRNA. Las células son capaces de reconocer cambios en la disponibilidad de aminoácidos y responder alterando vías de transducción de señal, lo que resulta en reducción o incremento del inicio de la traducción. (Figura 12)

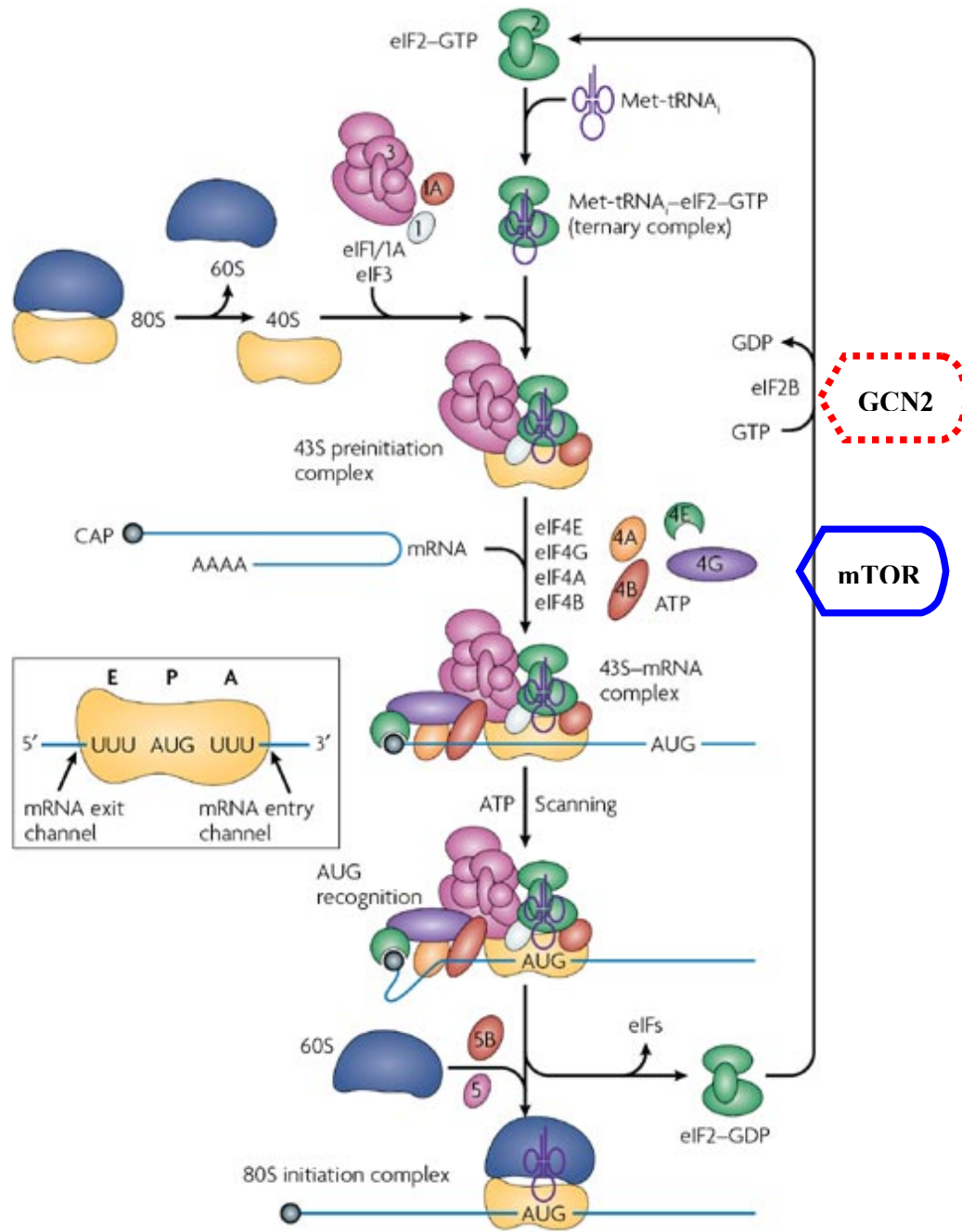


Figura 12

Esquema del inicio de la traducción y los puntos donde interfieren las vías de señalización mTOR y GCN2

A grandes rasgos este proceso implica la unión del iniciador metionil-tRNA (met-tRNA_i) y del mRNA a la subunidad ribosomal 40S, seguida de la asociación de la subunidad ribosomal 60S para dar lugar a la forma transcripcionalmente competente del ribosoma 80S. La respuesta a cambios en la disponibilidad de aminoácidos puede ser

general (afectar la traducción de la mayoría o todos los mRNA) y/o específica (afectar la traducción de una clase o subgrupo de mRNA). En la respuesta específica se puede incluir otro sitio adicional de regulación, el estado de fosforilación de la proteína ribosomal rpS6, que forma parte de de la subunidad ribosomal 40S.

El primer punto de regulación del inicio de la traducción implica la unión del met-tRNA_i a 40S mediante el complejo eIF2-GTP. El encargado de mantener el GTP (que se hidroliza en la reacción) para que pueda ser reutilizado en el complejo activo es el factor de intercambio de GDP conocido como eIF2B. La actividad de este factor está controlada por la fosforilación de eIF2 en la subunidad α , que pasa de ser un sustrato a ser un inhibidor competitivo con consecuente represión de la traducción de la mayoría de los mRNA. Una de las quinasas responsables por este evento, aunque no sea la única, es la GCN2 de mamíferos, ortóloga a la de las levaduras, y que fue detectada en cultivo de células adiposas utilizadas en este trabajo.

Tanto en células en cultivo como en hígado de animales, la depleción de un aminoácido esencial promueve la fosforilación de eIF2 α , con inhibición concomitante de eIF2B, mediante GCN2^{36-39,45}. En ratas sometidas a ayuno, la ingesta de dietas con una mezcla completa de aminoácidos esenciales estimula la síntesis de proteínas en el hígado y músculo esquelético pero no tiene efecto en la fosforilación de eIF2 α o la actividad de eIF2B. En contraste, la ingesta de una dieta carente en algún aminoácido esencial resulta en un aumento de la fosforilación de eIF2 α y reducción de la actividad de eIF2B⁴⁵. Estos datos evidencian que el desequilibrio en las concentraciones plasmáticas de aminoácidos esenciales resulta en la activación de la vía de señalización de GCN2, al menos en esos modelos.

Se ha visto que la administración de dietas deficientes en leucina provocan activación de esta vía en ratones *wildtype* y que en ratones *knockout* para GCN2 no

ocurre fosforilación de eIF2 α o inhibición de eIF2B. Sin embargo, en este trabajo se ofreció un aporte adicional de leucina y con esto se observó que ocurre disminución de GCN2 y de su blanco eIF2 α , aunque no se sabe si este efecto sea directo o indirecto.

Lo que si podemos asegurar es que en el modelo de células adiposas viscerales hay expresión constitutiva de GCN2 y que esta se ve disminuida en presencia de leucina. Parece ser que hay una aparente inhibición de esta vía de señalización provocada por exceso del aminoácido lo que estaría de acuerdo con su función en casos de deficiencia.

El segundo punto de regulación del inicio de la traducción involucra la unión del mRNA a 40S, que contiene el complejo eIF2-GTP-met-tRNA_i y eIF3, mediado por el complejo heterotrimérico conocido como eIF4F. Este complejo consiste en los factores iniciadores eIF4A, eIF4E y eIF4G; donde eIF4A actúa como una helicasa para desenrollar estructuras secundarias en la región 5'-UTR del mRNA y permitir que la subunidad ribosomal pueda migrar desde la caperuza hasta el codón iniciador, eIF4E auxilia en la unión del mRNA y el ribosoma, y eIF4G es una proteína de andamiaje que hace de puente molecular para unir eIF4A, eIF4E y eIF3. El ensamblado del complejo eIF4F es regulado, al menos en parte, por la unión reversible de eIF4E con los represores de la traducción llamados 4E-BPs (1,2 y 3), que impiden la unión del complejo eIF4E-mRNA con eIF4G y por lo tanto la unión del mRNA a la subunidad ribosomal 40S.

El mTOR es un miembro de una familia de quinasas de Ser/Thr relacionadas con las quinasas de fosfatidil inositol. Varios estudios han establecido el papel de la vía mTOR mediando la señalización de nutrientes y hormonas para regular el crecimiento celular y la proliferación por integración de la respuesta anabólica a dichos estímulos^{44,45}. Los aminoácidos, en especial, pueden activar una vía dependiente de mTOR que resulta en la fosforilación de sus 2 efectores río abajo: 4E-BP1 y S6K1, principalmente en tejido

muscular. En adipocitos, se cree que mTOR pueda regular la síntesis de proteínas, la morfogénesis del tejido y la síntesis/secreción de leptina.

Paradójicamente se plantea que los niveles de proteína de mTOR en adipocitos totalmente diferenciados a partir de células 3T3-L1 son mayores que en los preadipocitos⁴⁴, hecho que contrasta con los resultados de este trabajo puesto que no fue posible encontrar expresión del mRNA, al menos con el modelo de células que se utilizó.

La vía de señalización mTOR es mejor conocida por su papel en la regulación de la traducción, aunque también se cree que pueda tener una función nuclear para la regulación de la transcripción, pero se desconocen los mecanismos. Hasta el momento los reguladores transcripcionales identificados son STAT3 y PPAR γ , aunque la forma en la interactúan todavía no ha sido desvendada, se piensa que se pueda dar por acción directa en cofactores nucleares o en el reclutamiento del complejo de cofactores.

Actualmente se piensa que mTOR pueda no ser el blanco directo de los nutrientes y señales hormonales, y que el responsable por este efecto sea el complejo TSC1-TSC2⁴⁵. Se sugiere un modelo en el que la insulina y la leucina reprimen la acción inhibitoria de TSC1-TSC2 sobre la vía de señalización, siendo la primera a través de fosforilación de TSC2 mediada por Akt y en el caso de la leucina aun se desconoce el mecanismo. Lo que si se sabe es que la leucina puede alterar la asociación de mTOR con sus proteínas reguladoras, que son la proteína reguladora asociada a mTOR (raptor) y la proteína G con subunidad β semejante a proteína (G β L), y que esto finalmente va impactar en la actividad de mTOR sobre sus blancos 4E-BP1 y S6K1.

Otra proteína involucrada en transducir la señal de los aminoácidos a través de mTOR, y la proteína río arriba más proximal es Rheb (Ras homolog enriched in brain). Es una pequeña proteína G que aumenta la fosforilación de S6K1, rpS6 y 4E-BP1 de forma dependiente de mTOR.

Paciente normal vs obesos mórbidos

En el estado fisiológico normal el exceso de sustrato combustible es derivado al tejido adiposo donde se almacena en la forma de triglicéridos hasta su posterior liberación como ácidos grasos no esterificados en el marco de un aumento en los requerimientos de combustible. Disturbios fisiopatológicos del tejido adiposo como obesidad y lipodistrofia se asocian a desregulación de este proceso, y consecuentemente el exceso de ácidos grasos se libera en la circulación y posteriormente se acumula en depósitos de tejido extra adiposo, como músculo e hígado, lo que favorece a dislipidemia, resistencia a insulina y finalmente diabetes¹⁸.

Tejido visceral vs tejido subcutáneo

Hace más de 60 años⁴³ se estableció la posibilidad de que los riesgos de salud obesidad-relativos pudieran estar particularmente asociados a los depósitos regionales de grasa corporal, sobre todo aquella que se encuentra en el compartimiento visceral. La grasa visceral se encuentra en toda la parte interna de las cavidades corporales, envolviendo los órganos abdominales, y está compuesta por grasa mesentérica y grasa de los epiplones. Por su parte, los depósitos subcutáneos de grasa se ubican inmediatamente por debajo de la piel en todo el cuerpo y los dos principales sitios de acumulación son las regiones femorales y glúteas.

Se cree que la capacidad deletérea de la grasa visceral depende de su capacidad metabólica aumentada en relación a la grasa subcutánea. Además de su incrementada sensibilidad lipolítica y su capacidad para liberar los ácidos grasos hacia la circulación portal, exponiendo al hígado a hiperlipacidemia, provocando un incremento de la producción hepática de glucosa así como disminución de la depuración hepática de insulina.

Modelo de experimentación

Cultivo primario vs línea celular

Tiempo de tratamiento

La elección del modelo apropiado para la experimentación es un paso de vital importancia. Aunque la tecnología de las células madre y las líneas celulares se encuentra en constante expansión es necesario tener en mente ciertos aspectos a la hora de interpretar los resultados, teniendo en cuenta la difusa naturaleza de la diferenciación del tejido adiposo. En primera instancia, las líneas celulares más utilizadas, como la 3T3-L1, se diferencian en tejido adiposo blanco casi de manera exclusiva. Existe un segundo tipo de célula grasa llamada adipocito marrón, que se encuentra junto con el adipocito blanco, aunque en menor proporción y sirve principalmente para disipar la energía en vez de almacenarla. Otra importante limitación se relaciona a la dificultad para verificar las diferencias depósito-específicas en el comportamiento de la célula grasa, puesto que el tejido adiposo se encuentra en diferentes áreas como la perigonadal, omental, retroperitoneal, y subcutánea. Estas presentan algunas particularidades entre sí como la existencia de diferentes potenciales adipogénicos y diferente comportamiento metabólico de la célula madura en función del depósito de origen. Entre las diferencias regionales más conocidas de las células adiposas se encuentra la respuesta lipolítica en presencia de estimulación adrenérgica entre los panículos de grasa visceral y subcutánea, y este comportamiento puede traducirse en consecuencias clínicas específicas e importantes.

CONCLUSIONES

En el presente estudio, biopsias congeladas de tejido adiposo visceral fueron procesadas para el cultivo y posterior análisis de los genes de interés. Aunque ya llevaban algún tiempo en congelación fue posible obtener adipocitos maduros viables para cultivo como lo demostraron los estudios de viabilidad y las tinciones.

En cuanto a los genes relacionados con el proceso de adipogénesis se observó que hubo un aumento significativo en los niveles de expresión en presencia de leucina, lo que sugiere que este aminoácido pudiera afectar el proceso de diferenciación del tejido adiposo.

Un importante hallazgo fue la constatación de la presencia de GCN2 y de su principal blanco eIF2a en el tejido adiposo. Aunque aun queda por comprender la función específica de esta vía de señalización en los depósitos de grasa es posible apreciar su capacidad para detectar la limitación, y en este caso el exceso, de aminoácidos esenciales.

PERSPECTIVAS

La investigación molecular, orientada a desvendar aquello que todavía desconocemos acerca del papel metabólico que desempeñan ciertos componentes de la dieta habitual, ofrece valiosas herramientas que deben ser utilizadas a favor del estudio integral de las enfermedades de mayor trascendencia como es el caso de la obesidad. Partiendo de este razonamiento, es posible hacer análisis más completos tomando en cuenta aspectos que también son cruciales, desde distintos puntos de vista, y que de otra forma no serían considerados a fin de ampliar nuestros conocimientos.

Hasta el momento, el acervo de información científica disponible es insuficiente para explicar concretamente la manera en que la leucina actúa en la regulación metabólica del tejido adiposo. Hay varios estudios que hacen mención de efectos benéficos potenciales en situaciones de obesidad, y esto lleva a pensar en una posible participación en los mecanismos de control del gasto energético y de la adipogénesis.

En este caso se utilizaron células adiposas ya maduras por lo que muy poco puede ser dicho en relación a la adipogénesis. Sería interesante realizar más estudios con un modelo de línea celular para estudiar el efecto de la leucina durante todo el proceso de desarrollo y diferenciación de los adipocitos y ver si existe afectación a este nivel.

BIBLIOGRAFÍA

1. Marti A., Moreno-Aliaga M.^a J., Zulet M.^a A., Martínez J.A. **Avances en nutrición molecular: nutrigenómica y/o nutrigenética.** Nutr. Hosp. 2005; 20 (3): 157-164.
2. Cagigas A.R., Ferreira R.C., Tam M.A.H. **Biología molecular y nutrición.** Rev. Cubana Aliment. Nutr. 2002; 16 (1): 69-76.
3. Match D.M., Climent K. **Unraveling the genetics of human obesity.** Plos Genetics. 2006; 2 (12): 1956-1863.
4. Martínez J.A.H. **Determinantes genéticos de la obesidad.** Ibérica: Actualidad Tecnológica. 2004; (472): 69-86.
5. Villa A.R., Escobedo M.H., Méndez-Sánchez N. **Estimación y proyección de la prevalencia de obesidad en México a través de la mortalidad por enfermedades asociadas.** Gac. Méd. Méx. 2004; 140 (2): 21-26.
6. Gutiérrez J.G.R., Meléndez G.M., Zúñiga A.R., Serralde A.Z. **Genómica nutricional y obesidad.** Rev. Endocrinol. Nutr. 2006; 14 (4): 247-256.
7. **Consenso Latinoamericano de Obesidad.** 1998: 1-117.
8. Canizales-Quinteros S. **Aspectos genéticos de la obesidad humana.** Rev. Endocrinol. Nutr. 2008; 16 (1): 9-15
9. Pérez E.N., Morales M.L.E., Grajales I.A. **Panorama epidemiológico de la obesidad en México.** Rev. Mex. Enfermería Cardiológica. 2006; 14 (2): 62-64.
10. Marques-Lopes I., Marti A., Moreno-Aliaga M.^a A., Martinez A. **Aspectos genéticos da obesidade.** Rev. Nutr. 2004; 17 (3): 327-338.
11. Rankinen T., Zuberi A., Chagnon Y.C., et al. **The human obesity gene map: The 2005 update.** Obesity. 2006; 14 (4): 529-644.

12. Fonseca-Alaniz M.H., Takada J., Alonso-Vale M.I.C., Lima F.B. **O tecido adiposo como centro regulador do metabolismo.** Arq. Bras. Endocrinol. Metab. 2006; 50 (2): 216-228.
13. Morrison R.F., Farmer S.R. **Hormonal signaling and transcriptional control of adipocyte differentiation.** J. Nutr.. 2000; 130: 3116S-3121S.
14. Viveros A.C., Laviada H.M., Bastarrachea R.S. **Influencia endocrina y paracrina sobre la adipogénesis.** Rev. Endocrinol. Nutr. 2006; 10 (3): 151-164.
15. Alemán G., Torres N., Tovar A.R. **Los receptores activados por proliferadotes de peroxisomas (PPARs) en el desarrollo de obesidad y resistencia a insulina.** Rev. Invest. Clin. 2004; 56: 351-367.
16. Rosen E.D., Walkey C.J., Puigserver P., Spiegelman B.M. **Transcriptional regulation of adipogenesis.** Genes Dev. 2000; 14: 1293-1307.
17. Kang X., Xie Y., Powell H.M., et al. **Adipogenesis of murine embryonic stem cells in a three-dimensional culture system using electrospun polymer scaffolds.** Biomaterials. 2007; 28: 450-458.
18. Kershaw E.E., Schupp M., Guan H.P., Gardner N.P., Lazar M.A., Flier J.S. **PPAR γ regulates adipose triglyceride lipase in adipocytes in vitro and in vivo.** Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 2007; 293: E1736-E1745.
19. Uauy R.D., Martínez J.I.A., Rojas C.V.B. **Nutrición molecular, papel del sistema PPAR en el metabolismo lipídico y su importancia en obesidad y diabetes mellitus.** Rev. Méd. Chile. 2000; 128 (4): 437-446.
20. Eberlé D., Hegarty B., Bossard P., Ferré P., Fouchelle F. **SREBP transcription factors: master regulators of lipid homeostasis.** Biochimie. 2004; 86: 839-848.
21. Sun X., Zemel M.B. **Leucine and Calcium Regulate Fat Metabolism and Energy Partitioning in Murine Adipocytes and Muscle Cells.** Lipids. 2007; 42: 297-305.

22. Bastarrachea R.A., Fuenmayor R., Brajkovich I., Comuzzie A.G. **Entendiendo las causas de la obesidad a través de la biología celular del adipocito.** Rev. Venez. Endocrinol. Metab. 2005; 3 (3): 20-29.
23. Miner J.L. **The adipocyte as an endocrine cell.** J. Anim. Sci. 2004; 82: 935 -941.
24. Wolfe R.R. **The underappreciated role of muscle in health and disease.** Am. J. Clin. Nutr. 2006; 84: 475-482.
25. Garlick P.J. **The role of leucine in the regulation of protein metabolism.** J. Nutr. 2005; 135: 1553S-1556S.
26. Kimball S.R., Jefferson L.S. **Signaling pathways and molecular mechanisms through which branched-chain amino acids mediate translational control of protein synthesis.** J. Nutr. 2006; 136: 127S-131S.
27. Lynch C.J., Patson B.J., Anthony J. et al. **Leucine is a direct-acting signal that regulates protein synthesis in adipose tissue.** Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 2002; 283: E503-E513.
28. Brosnan J.T., Brosnan M.E. **Branched-chain amino acids: enzyme and substrate regulation.** J. Nutr. 2006; 136: 207S-211S.
29. Suryawan A., Hawes J.W., Harris R.A., et al. **A molecular model of human branched-chain amino acid metabolism.** Am. J. Clin. Nutr. 1998; 68: 72-81.
30. Harris R.A., Joshi M., Jeoung N.H., Obayashi M. **Overview of the molecular and biochemical basis of the branched-chain amino acid catabolism.** J. Nutr. 2005; 135: 1527S-1530S.
31. Layman D.K. **The role of leucine in weight loss diets and glucose homeostasis.** J. Nutr. 2003; 133: 261S-267S.
32. Norton L.E., Layman D.K.. **Leucine regulates translation initiation of protein synthesis in skeletal muscle after exercise.** J. Nutr. 2006; 136: S533-S537.

33. Koopman R., Verdijk L., Manders R.J.F., et al. **Co-ingestion of protein and leucine stimulates muscle protein synthesis rates to the same extent in young and elderly lean men.** *Am. J. Clin. Nutr.* 2006; 84: 623-632.
34. Layman D.K., Walker D.A. **Potential importance of leucine in treatment of obesity and the metabolic syndrome.** *J. Nutr.* 2006; 136: 319S-323S.
35. Zhang Y., Gou K., Le Blanc R.E. et al. **Increasing dietary leucine intake reduces diet-induced obesity and improves glucose and cholesterol metabolism in mice via multimechanism.** *Diabetes.* 2007; 56: 1647-1654.
36. Lynch C.J. **Role of leucine in the regulation of mTOR by amino acids: revelations from structure–activity studies.** *J. Nutr.* 2001; 131: 861S-865S.
37. Dever T.E., Hinnebusch A.G. **GCN2 whets the appetite for amino acids.** *Mol. Cell.* 2005; 18: 141-148.
38. Hao S., Gietzen D.W. **Uncharged tRNA and sensing of amino acid deficiency in mammalian piriform cortex.** *Science.* 2005; 307: 1776-1778.
39. Towle H.C. **The metabolic sensor GCN2 branches out.** *Cell Metab.* 2007; 5: 85-87.
40. Guo F., Cavener D.R. **The GCN2 eIF2 α kinase regulates fatty-acid homeostasis in the liver during deprivation of an essential amino acid.** *Cell Metab.* 2007; 5: 103-114.
41. Suga H et al. **Numerical measurement of viable and nonviable adipocytes and other cellular components in aspirated fat tissue.** *Plastic and Reconstructive Surgery.* 2008; 122: 103-113.
42. Hausman D.H., Park H.J., Hausman G.J. **Isolation and culture of preadipocytes from rodent white adipose tissue.** *Methods in Molecular Biology, Adipose Tissue Protocols.* 2^oed; 456: 201-217.
43. Godínez Gutiérrez S.A *et al.* **La grasa visceral y su importancia en obesidad.** *Rev de Endocrinol y Nutr.* 2002; 10: 121-127.

44. Kim J.E., Chen J. **Regulation of peroxisome proliferator-activated receptor- γ activity by mammalian target of rapamycin and amino acids in adipogenesis.**

Diabetes. 2004; 53: 2748-2755.

45. Kimball S.R., Jefferson L.S. **Amino acids as regulators of gene expression.** Nutr and Metab. 2004; 3: 1-10.