



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

FACULDADE DE CIENCIAS DA SAÚDE

**MÁSTER EN ASISTENCIA E INVESTIGACIÓN SANITARIA
ESPECIALIDAD EN FUNDAMENTOS DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA**

Curso académico 2018-2019

TRABAJO DE FIN DE MÁSTER

El papel de ROR α en la adipogénesis

Marina Ercilia Dasso Calvete

24-06-2019

Dra. Dña. Susana Sangiao Alvarellos, profesora contratada Doctora del Área de Fisiología, Departamento Fisioterapia, Medicina y Ciencias Biomédicas, en la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad de A Coruña, y Dña. Paula Juiz Valiña, profesora contratada predoctoral del Área de Fisiología, Departamento de Fisioterapia, Medicina y Ciencias Biomédicas, en la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad de A Coruña.

Certifican:

Que el presente Trabajo de Fin de Máster que lleva por título: **“El papel de ROR α en la adipogénesis”**, elaborado por Dña. Marina Ercilia Dasso Calvete, ha sido realizado bajo nuestra dirección y estimamos que se encuentra concluido y en condiciones de ser presentado.

Y para que conste, firmamos la presente autorización en A Coruña,

Handwritten signature of Susana Sangiao Alvarellos in blue ink, with the name written in a cursive style.

Fdo.: Dra. Susana Sangiao Alvarellos

Handwritten signature of Paula Juiz Valiña in blue ink, with the name written in a cursive style.

Fdo.: Paula Juiz Valiña

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE TABLAS	III
ÍNDICE DE FIGURAS.....	III
ABREVIATURAS	V
RESUMEN.....	VIII
RESUMO	IX
ABSTRACT	X
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 La Obesidad	1
1.2 Tejido Adiposo.....	3
1.3 Adipogénesis	4
1.4 MicroARNs implicados en la adipogénesis.....	7
1.6 Familia <i>MIR-19</i> : <i>miR-19a</i> y <i>miR-19b</i>	9
1.7 Receptores Huérfanos relacionados con el Ácido Retinoico (RORs) ..	11
1.7.1 ROR α	12
2. OBJETIVOS	17
3. MATERIALES Y MÉTODOS	18
3.1 Línea celular 3T3-L1 y diferenciación.....	18
3.2 Evaluación de distintas concentraciones de un agonista de ROR α	20
3.3 Sobreexpresión de <i>miR-19b</i> y agonista de ROR α	21
3.4 Extracción de ARN de células 3T3-L1	23
3.5 Retrotranscripción (RT) de ARN.....	23

3.6 Reacción en Cadena de la Polimerasa a Tiempo Real (<i>RT-qPCR</i>)	26
3.7 Análisis de Datos	29
4. RESULTADOS	30
4.1 Evaluación de distintas concentraciones de un agonista de ROR α	30
4.1.1 Observación de células 3T3-L1 a días 2, 4 y 6	30
4.1.2 Niveles de expresión génica mediante <i>RT-qPCR</i>	33
4.2 Sobreexpresión de <i>miR-19b</i> y agonista de ROR α	37
5. DISCUSIÓN	39
6. CONCLUSIÓN.....	44
7. AGRADECIMIENTOS	45
8. BIBLIOGRAFÍA	46

ÍNDICE DE TABLAS

<u>Tabla I:</u> IMC y estado nutricional.....	1
<u>Tabla II:</u> <i>miRs</i> involucrados en la adipogénesis.	8
<u>Tabla III:</u> Efectos y características observadas según modelo experimental utilizado para el estudio de ROR α	15
<u>Tabla IV:</u> Medios de cultivo utilizados a lo largo del proceso de diferenciación de la línea 3T3-L1 y su composición.....	19
<u>Tabla V:</u> Preparación de la mezcla de reacción de la RT.....	25
<u>Tabla VI:</u> Programa de la RT.....	25
<u>Tabla VII:</u> Preparación de la mezcla de reacción de la <i>RT-qPCR</i>	27
<u>Tabla VIII:</u> Cebadores sentido y antisentido utilizados en la <i>RT-qPCR</i>	28
<u>Tabla IX:</u> Programa de <i>RT-qPCR</i> (SYBR Green).....	29

ÍNDICE DE FIGURAS

<u>Figura 1:</u> Procesos de expansión del tejido adiposo.	3
<u>Figura 2:</u> Adipogénesis en células 3T3-L1.....	6
<u>Figura 3:</u> Línea temporal del protocolo para diferenciar a adipocitos maduros las células 3T3-L1.....	19
<u>Figura 4:</u> Línea temporal del protocolo utilizado para evaluar el papel de ROR α en la adipogénesis de las células 3T3-L1.	21
<u>Figura 5:</u> Línea temporal del protocolo utilizado para la sobreexpresión de <i>miR-19b</i> junto con el agonista de ROR α en células 3T3-L1.	22
<u>Figura 6:</u> Fotografías a 10X de células 3T3-L1 a día 2 del protocolo de evaluación de distintas concentraciones de un agonista de ROR α	30

<u>Figura 7:</u> Fotografías a 10X de células 3T3-L1 a día 4 del protocolo de evaluación de distintas concentraciones de un agonista de ROR α	31
<u>Figura 8:</u> Fotografías a 10X de células 3T3-L1 a día 6 del protocolo de evaluación de distintas concentraciones de un agonista de ROR α	32
<u>Figura 9:</u> Fotografías a 20X de células 3T3-L1 a día 6 del protocolo de evaluación de distintas concentraciones de un agonista de ROR α	33
<u>Figura 10:</u> Niveles de expresión del ARNm de ROR α	34
<u>Figura 11:</u> Niveles de expresión del ARNm de a) PPAR γ y b) C/EBP α	35
<u>Figura 12:</u> Niveles de expresión del ARNm de a) ADIPOQ y b) FAS.	35
<u>Figura 13:</u> Niveles de expresión del ARNm de a) GLUT4 y b) HK.....	36
<u>Figura 14:</u> Niveles de expresión del ARNm de CPT1B.....	37

ABREVIATURAS

ADIPOQ	Adiponectina
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
Akt	Proteína Quinasa B
ANOVA	Análisis de la varianza
Antisen	Antisentido
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
C/EBP α	Proteínas de Unión al Activador CCAAT alfa
CPT1B	Carnitina Palmitoil Transferasa 1B
<i>DMEM</i>	Medio Eagle Modificado de Dulbecco
DMSO	Dimetilsulfóxido
DM2	Diabetes <i>Mellitus</i> tipo 2
dNTP	Desoxirribonucleótido Trifosfato
FABP4	Proteína de Unión a Ácidos Grasos 4
FAS	Ácido Graso Sintasa
GLUT4	Transportador de Glucosa tipo 4
HK	Hexoquinasa
IBMX	3-isobutil-1-metilxantina
IL 6	Interleuquina 6
IL 8	Interleuquina 8

IMC	Índice de Masa Corporal
KO	<i>Knockout</i>
<i>lncARN</i>	ARN no codificante de cadena larga
LPL	Lipoproteína Lipasa
MCP-1	Proteína Quimiotáctica de Monocitos 1
<i>miR</i>	MicroARN
<i>MIR</i>	Familia de microARNs
mTOR	Diana de la Rapamicina en Mamíferos
NF- κ B	Factor Nuclear <i>kappa</i> B
OMS	Organización Mundial de la Salud
PAI-1	Inhibidor del Activador del Plasminógeno-1
PEPC-K	Fosfoenolpiruvato Carboxiquinasa
PGC-1 β	Coactivador de PPAR γ -1 beta
PI3K	Fosfatidil Inositol 3 Quinasa
PPAR γ	Receptor Activado por el Proliferador de Peroxisomas tipo <i>gamma</i>
P/S	Penicilina/Estreptomicina
ROR α	Receptor Huérfano alfa relacionado con el Ácido Retinoico
RORs	Receptores Huérfanos relacionados con el Ácido Retinoico
<i>RT-qPCR</i>	Reacción en cadena de la Polimerasa a tiempo real
RORE	Elementos de respuesta a ROR
Sen	Sentido
sc.	Solución

SREBP-1c	Factor de Transcripción de Unión al Elemento Regulador de Esteroles 1 c	
T2DM		<i>Type 2 Diabetes Mellitus</i>
UCP-1		Proteína Desacopladora 1
3'-UTR		Región 3' no traducida

RESUMEN

La obesidad es una enfermedad que está asociada a la progresión de diversas patologías crónicas como la Diabetes *Mellitus* tipo 2 (DM2). Los procesos de hipertrofia e hiperplasia de los adipocitos se encuentran implicados en el desarrollo de la misma. Actualmente, no se encuentran completamente esclarecidos los mecanismos por los cuales se lleva a cabo la proliferación y diferenciación adipocitaria, denominada adipogénesis. La epigenética cumple un rol fundamental, y dentro de ella numerosos microARNs (*miRs*) participan en la regulación del metabolismo de la glucosa y lípidos. Entre los procesos que podrían regular la adipogénesis se encuentra el Receptor Huérfano alfa relacionado con el Ácido Retinoico ($ROR\alpha$), que según distintos modelos bioinformáticos podría encontrar regulada su expresión a través de *miR-19b*. Sin embargo, el rol que cumple $ROR\alpha$ en la diferenciación adipocitaria es controvertido. Si bien hay autores que indican que su papel sobre la adipogénesis es negativo, otros afirman lo contrario.

En este trabajo nos propusimos estudiar el rol de $ROR\alpha$ en la adipogénesis y comprobar si dicho receptor nuclear es una diana de *miR-19b*.

Células 3T3-L1 estimuladas con un cóctel proadipogénico fueron tratadas con distintas concentraciones de SR1078 (agonista de $ROR\alpha$) Posteriormente, se evaluó la expresión génica mediante *RT-qPCR* de factores proadipogénicos, marcadores de adipocitos maduros y enzimas de la glucólisis y de la β -oxidación.

En conclusión, demostramos que $ROR\alpha$ posee un efecto positivo sobre la regulación de la adipogénesis ya que se observó un aumento del depósito de lípidos intracelular. Sin embargo, son necesarios más estudios para poder explicar el mecanismo por el cual ejerce este efecto. Finalmente, no pudimos comprobar si $ROR\alpha$ es una diana de *miR-19b* por fallos en la técnica.

RESUMO

A obesidade é unha enfermidade asociada á progresión de diversas patoloxías crónicas como a Diabetes *Mellitus* tipo 2 (DM2). Os procesos de hipertrofia e hiperplasia adipocitaria atópanse implicados no desenvolvemento da mesma. Actualmente, non están completamente esclarecidos os mecanismos polos cales se leva a cabo a proliferación e diferenciación adipocitaria, denominada adipoxénese. A epixenética cumpre un rol fundamental, e dentro dela numerosos microARNs (*miRs*) participan na regulación do metabolismo da glicosa e lípidos. Entre os procesos que poderían regular a adipoxénese atópase o Receptor Orfo alfa relacionado co Ácido Retinoico ($ROR\alpha$), que segundo distintos modelos bioinformáticos podería ter regulada a súa expresión a través de *miR-19b*. Con todo, o rol que cumpre $ROR\alpha$ na diferenciación adipocitaria é controvertido. Aínda que hai autores que indican que o seu papel sobre a adipoxénese é negativo, outros afirman o contrario.

Neste traballo propuxémonos estudar o rol de $ROR\alpha$ na adipoxénese e comprobar se devandito receptor nuclear é unha diana de *miR-19b*.

Células 3T3-L1 estimuladas cun cóctel proadipoxénico tratáronse con distintas concentracións de SR1078 (agonista de $ROR\alpha$). Posteriormente, avaliouuse a expresión xénica mediante *RT-qPCR* de factores proadipoxénicos, marcadores de adipocitos maduros e encimas da glucólise e da β -oxidación.

En conclusión, demostramos que $ROR\alpha$ posúe un efecto positivo sobre a regulación da adipoxénese xa que se observou un aumento do depósito de lípidos intracelulares. Con todo, son necesarios máis estudos para poder explicar o mecanismo polo cal exerce este efecto. Finalmente, non puidemos comprobar se $ROR\alpha$ é unha diana de *miR-19b* por fallos na técnica.

ABSTRACT

Obesity is an illness that is associated with the progression of diverse kind of chronic diseases such as type 2 Diabetes *Mellitus* (T2DM). Adipocyte's hypertrophy and hyperplasia processes are implicated in its growth. Currently, the mechanisms whereby proliferation and adipocyte differentiation, known as adipogenesis, take place are not completely elucidated. Epigenetics plays a fundamental role, and within it, numerous microRNAs (miRs) are involved in the regulation of glucose and lipid metabolism. The Retinoic Acid related Orphan Receptor alpha (ROR α) is among the processes that could regulate adipogenesis, which according to diverse bioinformatics models its expression could be regulated by miR-19b. However, the role of ROR α in adipocyte differentiation is controversial. While there are authors who argue that its role on adipogenesis is negative, others claim the opposite.

The aim of this project was to study the role of ROR α in adipogenesis and verify whether this nuclear receptor is a target of miR-19b.

3T3-L1 cells stimulated with a proadipogenic coctel were treated with different concentrations of SR1078 (ROR α agonist). Later on, the genic expression of proadipogenic factors, adipocyte maturity markers, glycolytic and β -oxidation pathways enzymes were evaluated with *RT-qPCR*.

In conclusion, we proved that ROR α has a positive effect on the regulation of adipogenesis because we observed an increase of the intracellular lipid deposits. Nevertheless, more tests are needed to be able to explain the mechanism by which it exerts this effect. Finally, we could not verify if *ROR α* is a target of miR-19b due to flaws in the technique.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 La Obesidad

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define a la obesidad como la acumulación anormal o excesiva de grasa corporal que genera un riesgo para la salud. Una de las medidas que pueden utilizarse para identificar esta patología es el Índice de Masa Corporal (IMC). Dicho índice se define como la relación entre el peso y la altura en metros elevada al cuadrado, y hace referencia al estado nutricional de los adultos. Para el caso de los niños se utiliza la misma fórmula, solo que luego se la compara con los percentiles establecidos (1, 2).

Como muestra la *Tabla I*, existen distintos rangos dentro de este índice que permiten establecer si una persona se encuentra por encima o por debajo de lo que es considerado un peso saludable (2).

Tabla I: IMC y estado nutricional (2).

IMC (kg/m ²)	Estado Nutricional
Menor a 18,5	Bajo peso
18,5-24,9	Peso Normal
25,0-29,9	Pre-obesidad
30,0-34,9	Obesidad Clase I
35,0-39,9	Obesidad Clase II
Mayor a 40,0	Obesidad Clase III

Si bien, para establecer el exceso de grasa corporal en un individuo se necesita de la aplicación de métodos de bioimpedancia, esto no resulta siempre posible. Es por ello que se utiliza el IMC debido a su facilidad, rapidez y bajo costo. Dicho índice fue desarrollado considerando las alteraciones que produce el exceso de grasa corporal en el organismo y su relación con ciertas patologías, es decir, que es un indicador de riesgo de las mismas (2).

Tanto el sobrepeso como la obesidad son considerados importantes factores de riesgo para distintas patologías crónicas como la hipertensión, Diabetes *Mellitus* tipo 2 (DM2), enfermedad coronaria, osteoartritis, apnea del sueño y algunos tipos de cáncer. Además, la obesidad, se encuentra estrechamente asociada a la mortalidad por enfermedad cardiovascular (1, 3).

Si bien, en su momento, el sobrepeso y la obesidad se consideraban patologías solo atribuidas a países desarrollados, hoy en día se observa que están aumentados en países en vías de desarrollo, especialmente en las zonas urbanas. Es por ello que, actualmente, la obesidad es considerada una epidemia global. En 2016, alrededor del 40 % de las personas adultas mayores de 18 años tenían sobrepeso, y el 13 % eran obesas. En ese mismo año, más de 340 millones de niños y adolescentes (de 5 a 19 años) presentaban una u otra condición (1).

En España, las cifras de sobrepeso y obesidad ascienden a 34 % y 16 % respectivamente. Estos números indican que la mitad de la población española presenta un peso por encima de un valor saludable. Cuando a dichas cifras se las compara por sexo, se observa que del total de personas con sobrepeso el 60 % son hombres y un 40 % mujeres. Para el caso de la obesidad, estos valores se igualan entre ambos sexos (4). La región de Galicia presenta valores de IMC muy similares a los del resto del país (5).

1.2 Tejido Adiposo

El sobrepeso y la obesidad están caracterizados por un aumento tanto del tamaño (hipertrofia) como del número (hiperplasia) de las células que conforman el tejido adiposo denominadas adipocitos. El crecimiento en volumen de dichas células se debe a un aumento de la acumulación de lípidos en su interior, mientras que el incremento en el número se debe a un proceso de diferenciación celular (6, 7) (ver *Figura 1*).

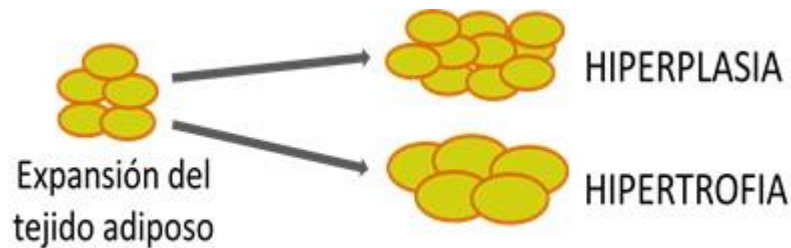


Figura 1: Procesos de expansión del tejido adiposo. Los procesos por los cuales las células del tejido adiposo se expanden son el aumento en el número (hiperplasia) y en el volumen (hipertrofia) de los adipocitos.

El tejido adiposo es un órgano morfológicamente único que acumula lípidos en respuesta al estado energético del organismo. Durante períodos de exceso calórico, este tejido secuestra los lípidos circulantes que almacena en su mayoría como triglicéridos en gotas lipídicas citoplasmáticas dentro de los adipocitos. Del modo contrario, en períodos de necesidad calórica, este tejido moviliza los lípidos almacenados hacia la circulación para que actúen como fuente de energía de tejidos periféricos (6, 8).

Este tejido no solo cumple la función de depósito de exceso energético, sino que también presenta una actividad endocrina, ya que es capaz de sintetizar una gran cantidad de compuestos que actúan como hormonas y citoquinas regulando la homeostasis del organismo (8, 9).

Los cambios que se producen a nivel de la masa de este tejido se encuentran asociados con alteraciones en las funciones endocrinas y

metabólicas del mismo. Entre las hormonas adiposas alteradas en la obesidad se encuentra la leptina, una hormona que inhibe la ingesta y estimula el gasto energético, y la adiponectina (ADIPOQ), la cual disminuye sus niveles con la obesidad y está asociada positivamente con la sensibilidad a la insulina (10).

El tejido adiposo se puede diferenciar en dos tipos diferentes: blanco y marrón. El blanco es el descrito hasta el momento cuya principal función es el depósito energético. Mientras que el tejido adiposo marrón se caracteriza por disipar energía con la formación de calor, es decir, la termogénesis. La generación de calor se produce por el desacoplamiento de la cadena respiratoria mitocondrial a la Adenosin Trifosfato Sintasa, a través de la actividad de la Proteína Desacopladora 1 (UCP-1) (8).

El tejido adiposo blanco se encuentra distribuido por todo el cuerpo humano, y se divide en dos grandes tipos: subcutáneo (situado entre el músculo y la piel) y visceral (asociado a los órganos viscerales internos). La distribución regional de este tejido en el humano se encuentra fuertemente asociada a la resistencia a la insulina, siendo la distribución visceral un fuerte predictor de la misma. A su vez, numerosos estudios han encontrado una relación entre la acumulación de lípidos en el tejido adiposo subcutáneo abdominal con la resistencia a la insulina y enfermedades metabólicas, sugiriendo que la adiposidad central es un factor importante en este tipo de patologías (6).

1.3 Adipogénesis

Como ya se mencionó anteriormente, la obesidad se caracteriza por los fenómenos de hipertrofia e hiperplasia de los adipocitos, los cuales se producen por los procesos de lipogénesis y diferenciación de los mismos (11). El primero de ellos hace referencia a la síntesis de ácidos grasos que serán esterificados con el glicerol para la formación de triglicéridos. Este

proceso ocurre preferentemente en el tejido adiposo, aunque también se produce en el hígado (9).

La adipogénesis es el proceso por el cual pre-adipocitos se diferencian a células adiposas maduras. Las células precursoras son de origen mesenquimal y pueden presentar una forma estrellada o fusiforme. Los cambios morfológicos y funcionales en el transcurso de la adipogénesis se deben a un cambio en la expresión y actividad de factores de transcripción que permiten la progresión desde un estado primitivo y multipotente a un fenotipo final caracterizado por un cambio en su forma celular y en la acumulación lipídica (9).

A su vez, hay otros factores que presentan un rol regulador sobre la diferenciación del tejido adiposo como son la insulina, la hormona de crecimiento y los glucocorticoides. Sin embargo, son los factores de transcripción los que cumplen un papel crítico en este proceso (11).

Diferentes estudios han demostrado que la lipogénesis y diferenciación son reguladas de manera coordinada por distintos factores de transcripción, siendo los más importantes el Receptor Activado por el Proliferador de Peroxisomas tipo *gamma* (PPAR γ), Proteínas de Unión al Activador CCAAT (C/EBPs) y el Factor de Transcripción de Unión al Elemento Regulador de Esteroles 1 c (SREBP-1c). Cuando estos factores son activados por un estímulo que induce la diferenciación, promueven la expresión de distintos genes adipogénicos, como el de las enzimas Ácido Graso Sintasa (*FAS*), Lipoproteína Lipasa (*LPL*) y *ADIPOQ*, del Transportador de Glucosa tipo 4 (*GLUT4*) y de la Proteína de Unión a Ácidos Grasos 4 (*FABP4*) (ver *Figura 2*) (11, 12).

PPAR γ es un factor crítico en la regulación de la diferenciación, siendo la expresión de su gen una condición necesaria y suficiente para que este proceso se lleve a cabo en el tejido adiposo (11, 12) (ver *Figura 2*).

Los miembros de la familia C/EBPs, alfa, beta y delta ($C/EBP\alpha$, $C/EBP\beta$ y $C/EBP\delta$) cumplen un rol importante en la adipogénesis, ya que tanto $C/EBP\beta$ y $C/EBP\delta$ pueden inducir la expresión de los genes $PPAR\gamma$ y $C/EBP\alpha$. A su vez, $PPAR\gamma$ activado aumenta la expresión del gen $C/EBP\alpha$. En ausencia de este último, las células solo pueden producir $PPAR\gamma$ a bajos niveles y no logran completar el proceso de diferenciación (11, 12) (ver *Figura 2*).

Para el caso de SREBP-1c, su función radica en el hecho de que promueve la síntesis de triglicéridos mediante una regulación positiva sobre la expresión de determinados genes como *FAS* y *LPL*. Además, SREBP-1c activa la expresión de $PPAR\gamma$, o bien, induce la expresión de un ligando endógeno de éste para aumentar su actividad lipogénica y promover la diferenciación (11, 12) (ver *Figura 2*).

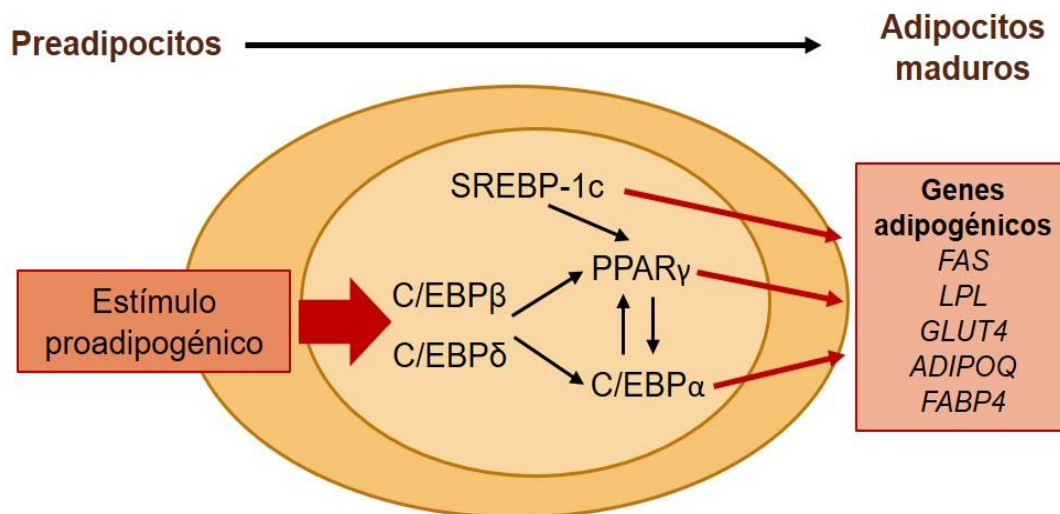


Figura 2: Adipogénesis en células 3T3-L1. FAS: Ácido Graso Sintasa; LPL: Lipoproteína Lipasa; GLUT4: Transportador de Glucosa tipo 4; ADIPOQ: Adiponectina; FABP4: Proteína de Unión a Ácidos Grasos 4. Ver texto para detalles. Modificada de (13).

A pesar de los elementos y funciones previamente descritos, a día de hoy, no se conocen todos los mecanismos que regulan la formación de las células

adiposas maduras. Es aquí, donde la epigenética puede llegar a cumplir la función de esclarecer los caminos faltantes en este proceso (11).

La epigenética hace referencia a los cambios reversibles y heredables del genoma que regulan la estructura de la cromatina y la expresión génica, pero que no alteran la secuencia del ADN. Dentro de estos cambios, se pueden mencionar a la metilación del ADN, la modificación de histonas, el remodelado de la cromatina y los ARN no codificantes (11).

1.4 MicroARNs implicados en la adipogénesis

De acuerdo con la bibliografía, se sabe que solo menos del 2 % de los transcritos en el genoma de los mamíferos posee una función de codificación proteica. Por lo tanto, el 98 % restante es ARN no codificante. Este tipo de ARN se puede clasificar en dos subtipos: microARN (*miR*), cuya longitud varía de 20 a 24 nucleótidos, y ARN no codificante de cadena larga (*lncARN*) constituido por más de 200 nucleótidos (11,14).

Diversos estudios han comprobado que tanto los *miR* como los *lncARN* se encuentran involucrados en numerosos procesos y mecanismos celulares a través de su interacción con los factores de transcripción. De esta manera, cualquier alteración de estos procesos transcripcionales puede llevar a enfermedad (11).

Durante la regulación de la expresión génica, diversos factores de transcripción pueden unirse a la región promotora del gen de *miRs* y provocar un cambio en su expresión. A su vez, la función principal de los *miRs* radica en la represión post-transcripcional de sus genes diana, usualmente uniéndose a la región 3' no traducida (3'UTR) del ARN mensajero (ARNm), es decir, que afectan la traducción de factores de transcripción (11).

El reconocimiento de los ARNm diana se produce por complementaria imperfecta, lo que sumado a su pequeño tamaño, permite a los *miRs* ser

capaces de regular simultáneamente gran cantidad de transcritos. Además, un único ARNm puede presentar múltiples sitios de unión para distintos *miRs*, lo que genera una compleja red de regulación de la expresión génica (14,15).

Numerosos estudios hacen referencia al papel que cumplen los *miRs* en la regulación del metabolismo de la glucosa y los lípidos, especialmente en la diferenciación de los adipocitos, en el control sobre la masa de células β pancreáticas, y en la vía de señalización de la insulina, tanto en condiciones fisiológicas como en enfermedad (14, 16).

Diversos artículos científicos reportan una gran cantidad de *miRs* que participan tanto en promover como en restringir la adipogénesis a partir de diferentes mecanismos, algunos de ellos se encuentran listados en la *Tabla II* (14).

Tabla II: *miRs* involucrados en la adipogénesis (14).

<i>miRs</i> que estimulan la adipogénesis	<i>miRs</i> que inhiben la adipogénesis
<i>miR-17</i>	<i>Let-7</i>
<i>miR-21</i>	<i>miR-27a/b</i>
<i>miR-143</i>	<i>miR-130</i>
<i>miR-146b</i>	<i>miR-222</i>
<i>miR-210</i>	<i>miR-363</i>
<i>miR-375</i>	<i>miR-369</i>

El *miR-17-92* es un clúster policistrónico, lo que indica que a partir de él se codifican varios *miRs*: *miR-17*, *miR-18a*, *miR-19a*, *miR-19b-1*, *miR-20a* y *miR-92a*. Dicho clúster se encuentra regulado positivamente en la expansión clonal adipocitaria, acelerando la diferenciación al reprimir de manera directa al supresor tumoral *Rb2/p130*. Este supresor tumoral cumple un rol crítico en la regulación de la expansión clonal, ya que pertenece a los genes de la familia de retinoblastoma, los cuales impiden la continuidad del ciclo celular llevando a una detención de la proliferación (14, 17).

Se ha identificado que los *miR-17*, *miR-18* y *miR-20*, presentan como diana de su función a la región 3'UTR de *Rb2/p130*. Este mecanismo se puso en evidencia gracias a la realización de una transfección estable de la línea celular 3T3-L1 mediante un vector viral conteniendo el clúster en su estructura. Posteriormente, con la técnica de *RT-qPCR* se observa el aumento de estos *miRs* y el descenso del ARNm de *Rb2/p130* en comparación con las células control no transfectadas (17).

La implicación de los *miRs* así como los mecanismos moleculares que participan en la adipogénesis han sido abundantemente estudiados en sistemas *in vitro* como modelos de cultivo celular. La línea celular más utilizada para este tipo de investigación es la línea de ratón 3T3-L1, la cual presenta una morfología de fibroblastos (preadipocitos) y un gran potencial para diferenciarse a adipocitos (18).

1.6 Familia *MIR-19*: *miR-19a* y *miR-19b*

Como ya se mencionó previamente, dentro del clúster *miR-17-92* se encuentra la familia *MIR-19*, compuesta por *miR-19a* y *miR-19b*. Estos *miRs* se diferencian en tan solo un nucleótido en la posición 11, una región poco importante para el reconocimiento, por lo que es muy probable que actúen sobre los mismos ARNm diana (15).

Actualmente, hay numerosos trabajos que relacionan la función de *MIR-19* con los procesos oncogénicos. Uno de estos estudios comprueba que el clúster *miR-17-92* está sobreexpresado en linfomas humanos de células B y que su actividad oncogénica está mediada por *MIR-19*. Dicha función se produce, en parte, a través de la vía PI3K (Fosfatidil Inositol 3 Quinasa)-Akt (Proteína Quinasa B)-mTOR (Diana de la Rapamicina en Mamíferos) que promueve la supervivencia celular (15). Continuando en esta línea de investigación, también se observa que *MIR-19* participa en los procesos de invasión y metástasis del cáncer al activar el proceso de transición epitelio-mesénquima, como se evidencia en células de cáncer de pulmón (19).

Otros autores hacen referencia al papel que cumple *miR-19b* en el proceso inflamatorio implicado en la patogénesis de ciertas enfermedades como la artritis reumatoide. En este caso, *miR-19b* ejerce una regulación positiva sobre la vía de señalización del Factor Nuclear *kappa* B (NF- κ B), la cual es crítica para la producción de citoquinas pro-inflamatorias como las Interleuquinas 6 y 8 (IL 6 e IL 8), al presentar como dianas a reguladores negativos de la misma (20).

Al día de hoy, son relativamente pocos los trabajos que relacionan el rol de *miR-19a/b* con la obesidad y/o desórdenes metabólicos. En ratones sometidos a obesidad inducida por dieta, se observa que los niveles circulantes de *miR-19b* se encuentran disminuidos con respecto a los ratones control. Sin embargo, cuando a esos mismos animales se les proporciona una dieta baja en grasas, los autores observan que este *miR* incrementa sus niveles significativamente, evidenciando de esta manera un cambio en el perfil de expresión de los *miRs* cuando disminuye la adiposidad (16, 21). En otro estudio, se pone de manifiesto que *miR-19b* es uno de los *miRs* con mayor expresión que se encuentra desregulado en tejido testicular y esperma de ratones con obesidad inducida por dieta. Los autores han comprobado que al microinyectar en embriones una cantidad de moléculas

de *miR-19b* muy superior a los niveles de *miRs* presentes en los espermatozoides de los ratones alimentados con dieta alta en grasa, los animales nacidos de esta micro inyección (R1-*miR-19b*) tienen pesos mayores a los ratones control, sin embargo, solo la mitad de ellos presentan alteraciones en la glucemia en ayunas y en la sensibilidad a la insulina. Cuando aparean ratones macho de peso normal, R1-*miR-19b*, con hembras control, observan que las crías de estos (R2-*miR-19b*) presentan aumento de peso corporal, glucemia alterada y resistencia a la insulina. Este último resultado indica que los cambios epigenéticos producidos por la inyección de *miR-19b* pueden permanecer fenotípicamente silenciados en la primera generación (R1-*miR-19b*) pero luego ser transmitidos a la descendencia (R2-*miR-19b*) (22).

1.7 Receptores Huérfanos relacionados con el Ácido Retinoico (RORs)

Este tipo de receptores pertenece a una amplia familia de receptores nucleares caracterizados por ser factores de transcripción regulados por ligando. Dentro de esta familia se encuentran receptores para distintas hormonas y metabolitos, como por ejemplo las hormonas tiroideas y esteroideas. Debido a ello, están implicados en una gran variedad de procesos celulares como proliferación, diferenciación, desarrollo y homeostasis. Por lo tanto, cualquier tipo de alteración en la vía de señalización de estos receptores puede llevar el desarrollo de patologías como cáncer, diabetes, enfermedades autoinmunes y obesidad (23).

Los RORs están definidos como receptores huérfanos ya que aún no están totalmente caracterizados sus ligandos. Sin embargo, como se los ha asociado a varios procesos tanto fisio como patológicos, resultan de gran interés para el desarrollo de fármacos para el tratamiento de distintas enfermedades (23).

Una de las características más peculiares de estos receptores es que el reconocimiento y unión a secuencias específicas del ADN la realizan como monómeros, en contraposición a la mayoría de receptores nucleares que lo hacen como dímeros. Cuando se unen a estas secuencias, denominadas elementos de respuesta a ROR (RORE), en el promotor de sus genes diana, reclutan a coactivadores que llevan a la activación de la transcripción de dicho gen (23).

1.7.1 ROR α

Receptor Huérfano alfa relacionado con el Ácido Retinoico (ROR α) fue el primero de la familia de RORs en ser identificado. Dicho receptor, se expresa ampliamente en diversos tejidos como el hígado, musculo esquelético, piel, pulmones, riñones, cerebro, timo y tejido adiposo (23).

Se ha relacionado a este receptor con el proceso de adipogénesis si bien los resultados continúan siendo controvertidos, puesto que hay autores que defienden un efecto positivo, otros, negativo e incluso hay estudios que no encuentran ningún tipo de relación entre ROR α y el proceso de diferenciación adipocitaria (24-31).

Diversos autores indican que en la línea celular 3T3-L1 los niveles de este receptor están aumentados en la adipogénesis, mientras que su sobreexpresión inhibe este proceso. Mediante la técnica de *Oil Red O*, evidencian que en aquellas células que sobreexpresan de manera constitutiva ROR α , la acumulación lipídica está marcadamente disminuida, así como el consumo de ácidos grasos libres y de glucosa. Además, estos resultados se asocian con una reducción en los niveles de expresión de varios genes involucrados en la diferenciación como *PPAR γ* , *CEBP α* y *SREBP-1c* (24).

Siguiendo en esta línea de investigación, otros autores ponen de manifiesto que la sobreexpresión de ROR α en células 3T3-L1 también reprime la

expresión de los genes diana de PPAR γ y CEBP α , como *FABP4*, y del gen de la perilipina, una proteína que forma parte de las gotas lipídicas. A su vez, observan que los niveles de expresión de *FAS* y *ADIPOQ* están disminuidos, mientras que la expresión de adipocitoquinas proinflamatorias como la Proteína Quimiotáctica de Monocitos 1 (*MCP-1*) y el Inhibidor del Activador del Plasminógeno-1 (*PAI-1*) se encuentran aumentadas (25).

Si bien estos hallazgos sugieren un papel negativo para ROR α en la diferenciación adipocitaria, también existen diversos artículos que proponen un papel distinto para este receptor (26-29).

En ratones *staggerer* homocigotos (*sg/sg*), los cuales presentan el gen de *ROR α* espontáneamente mutado y no funcional (*ROR $\alpha^{sg/sg}$*), se observa una reducción de la adiposidad, una resistencia a la obesidad inducida por dieta y un aumento en el consumo de oxígeno. Estos resultados concuerdan con la disminución de *SREBP-1c* y *FAS* en hígado y músculo esquelético. En tejido adiposo marrón se observa un aumento de la expresión del Coactivador de PPAR γ -1 β (*PGC-1 β*) y *Lipina-1* los cuales son genes que codifican para proteínas activadoras de la oxidación de ácidos grasos, mientras que en tejido adiposo blanco epididimal (visceral), solo se evidencia el aumento de *Lipina-1*. Esto demuestra que ROR α es un factor de suma importancia en la regulación de los genes asociados a la homeostasis lipídica (26, 27).

Otros autores también demuestran que la deficiencia de *ROR α* en ratones *staggerer* está asociada a una disminución de la adiposidad y a la inducción de la expresión de genes termogénicos en tejido adiposo blanco inguinal (subcutáneo) y tejido adiposo marrón (interescapular) (28).

Los resultados obtenidos *in vitro* a partir de fibroblastos embrionarios de ratones *staggerer* evidencian que la deficiencia de *ROR α* produce una mayor acumulación lipídica la cual es indicativa de una diferenciación más eficiente. Estos hallazgos no son consistentes con los encontrados en el modelo

animal previamente descrito, ya que en ellos se observa una menor adiposidad (24, 27).

Por su parte, también se ha asociado a $ROR\alpha$ al proceso de inflamación, el cual está implicado en la patogenia de la obesidad y la DM2 (27). En estas patologías, el tejido adiposo está caracterizado por una inflamación crónica que involucra infiltración celular y la activación de citoquinas proinflamatorias. En ratones genéticamente obesos (*ob/ob*) se comprueba que $ROR\alpha$ regula de manera positiva este proceso en el tejido adiposo epididimal (visceral) ya que su efecto se relaciona con la respuesta al estrés del retículo endoplasmático (29).

En otros modelos animales donde se estudió el papel de $ROR\alpha$ en el metabolismo de hidratos de carbono y lípidos los resultados obtenidos por los diversos autores también presentan discrepancias (30, 31).

Con objeto de estudiar la deficiencia de $ROR\alpha$ evitando la presencia de ataxia característica de los ratones *staggerer* ($ROR\alpha^{sg/sg}$), se creó el modelo de ratón *Knockout* (KO) *EllaROR\alpha* generado a partir del cruzamiento de ratones con el exón 3 del gen $ROR\alpha$ flanqueado por sitios *LoxP* con ratones que expresan la recombinasa *Cre* bajo el control del promotor *Ella*. La recombinación entre sitios *LoxP* es catalizada por la enzima *Cre*, la cual, al estar regulada por el promotor *Ella*, provoca una delección parcial del locus de $ROR\alpha$. En estos animales, se observa resistencia a la obesidad inducida por dieta, presentando una disminución del peso y de la masa grasa. Además, se evidencia una mejora en el metabolismo de la glucosa y en la resistencia a la insulina, así como un aumento en la oxidación de lípidos y una disminución de citoquinas proinflamatorias en tejido adiposo blanco (30).

Otro modelo de ratón que se utilizó para evaluar la función de $ROR\alpha$ es un transgénico específicamente en el tejido adiposo. En dicho estudio, se observa una disminución de la adiposidad y del peso corporal de estos

animales cuando son sometidos a una dieta alta en grasa. Los autores adjudican estos cambios a la disminución del depósito graso subcutáneo y a la redistribución ectópica de la grasa hacia tejidos como el hígado. También se observa una tolerancia alterada a la glucosa en ayunas, a pesar de no evidenciar ninguna alteración en la sensibilidad a la insulina (31).

En la *Tabla III* se resumen los distintos efectos observados de acuerdo al modelo experimental utilizado para evaluar el papel de ROR α en el metabolismo de la glucosa y los lípidos (24-31).

Tabla III: Efectos y características observadas según modelo experimental utilizado para el estudio de ROR α (24-31).

Modelo Experimental	Efectos y características observadas	Referencias
Sobreexpresión de RORα en 3T3-L1	Inhibición de la adipogénesis: disminución de depósitos lipídicos	24, 25
Ratones <i>staggerer</i> homocigotos (ROR$\alpha^{sg/sg}$)	Disminución de la adiposidad y resistencia a la obesidad inducida por dieta	26-28
Fibroblastos embrionarios de ROR$\alpha^{sg/sg}$	Adipogénesis más eficiente: mayor acumulación lipídica	24, 27
Ratones obesos (<i>ob/ob</i>)	Inducción de la inflamación: infiltración celular + citoquinas proinflamatorias	29
Ratones KO (<i>EllaRORαKO</i>)	Aumento de la oxidación lipídica y disminución de citoquinas proinflamatorias	30

<p>Ratones Transgénicos exclusivamente en tejido adiposo</p>	<p>Disminución de la adiposidad con redistribución ectópica de la grasa. Tolerancia alterada a la glucosa en ayunas</p>	<p>31</p>
---	---	-----------

Mediante la utilización de diversos algoritmos bioinformáticos como por ejemplo los programas *TargetScan*, *miRanda*, *PicTar* o *Diana Lab*, se pueden estudiar los posibles genes diana sobre los que podría estar actuando cualquier *miR*. Los resultados de diversos algoritmos sugieren con una alta probabilidad que *RORα* es una diana potencial de la familia *MIR-19*.

2. OBJETIVOS

En base a los antecedentes y contexto explicado en el apartado de Introducción, nos planteamos 2 objetivos principales:

1. Evaluar el efecto que ejerce $ROR\alpha$ sobre el proceso de adipogénesis.
2. Comprobar si $ROR\alpha$ es una diana de *miR-19b*.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Línea celular 3T3-L1 y diferenciación

La línea celular que se utilizó para el desarrollo de los experimentos de este trabajo fue la 3T3-L1. Dicha línea fue generada a partir de fibroblastos de ratón (preadipocitos) y es ampliamente utilizada para los estudios *in vitro* de tejido adiposo.

Previo al inicio de cualquier experimento con la línea celular, se realizó la prueba de detección de Micoplasma para descartar contaminación por alguna de sus especies. Para llevar a cabo esta detección, en primer lugar, se realizó una *PCR* de punto final en muestras obtenidas del medio de cultivo de las células a utilizar, con el fin de amplificar el material genético de Micoplasmas presentes. Posteriormente, se evaluaron las muestras obtenidas de la *PCR* en un gel de agarosa junto con un control positivo y uno negativo, para descartar, o no, la presencia de este contaminante.

En el protocolo de diferenciación, inicialmente, las células se cultivaron en placas de 100 mm de diámetro. Para su expansión se usó medio Eagle Modificado de Dulbecco (*DMEM*) (*Gibco*), suplementado con un 10 % de suero de cría de ternera (*Calf Serum, HyClone*) y un 1 % de penicilina/estreptomicina (*P/S*) (*Gibco*) bajo condiciones controladas de temperatura (37 °C), CO₂ (5 %) y humedad, hasta obtener una confluencia del 80 %. En un segundo paso, se sembraron placas de 12 pocillos en las cuales se realizaron los experimentos descritos a continuación.

Cuando las células alcanzaron la confluencia del 100 %, se esperó 48 horas para iniciar el proceso de diferenciación, que consistió en el cultivo de las mismas durante 48 horas con un cóctel proadipogénico conformado por insulina de acción rápida (*Actrapid, Novo Nordisk*), dexametasona (*Sigma-Aldrich*) y 3-isobutil-1-metilxantina (*IBMX*) (*Sigma-Aldrich*). Pasado este tiempo, se las cultivó con medios de mantenimiento hasta el día 6 que se

corresponde con el último día del protocolo (ver *Figura 3*). En la *Tabla IV* se muestran los medios que se utilizaron en este procedimiento y su composición.

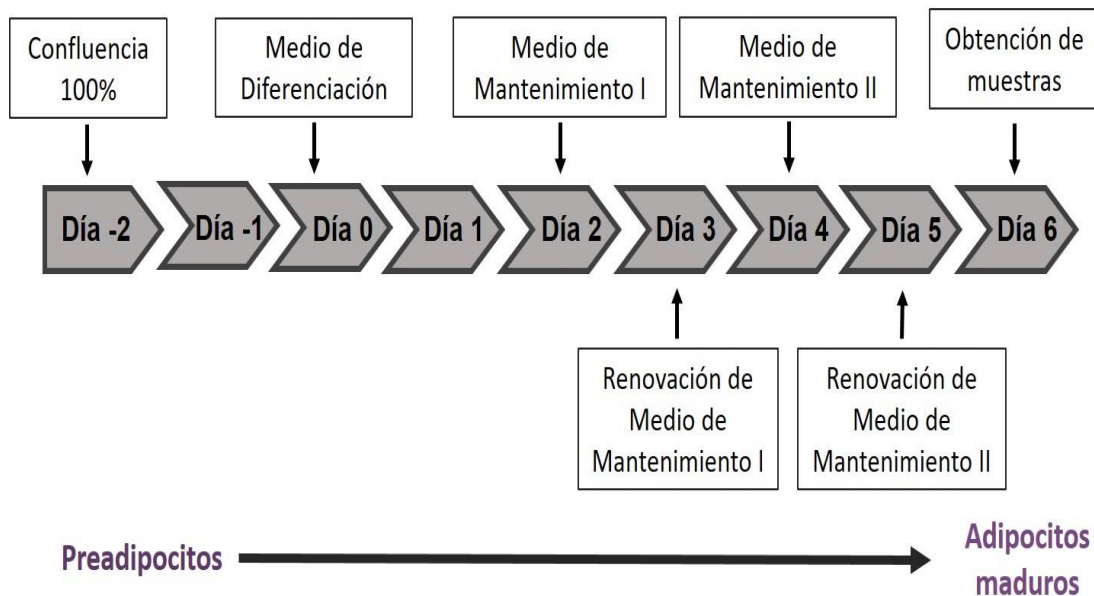


Figura 3: Línea temporal del protocolo para diferenciar a adipocitos maduros las células 3T3-L1. Se muestran los cambios en los medios de diferenciación y mantenimiento I y II.

Tabla IV: Medios de cultivo utilizados a lo largo del proceso de diferenciación de la línea 3T3-L1 y su composición.

Tipo de Medio	Composición del medio
Medio Base	DMEM/F12 (Gibco) + 10 % Suero Bovino Fetal (FBS) (Gibco) + 1 % P/S
Medio de Diferenciación	Medio Base + Insulina (4,17 mg/ml) + Dexametasona (1 mg/ml) + IBMX (10 mg/ml)
Medio de Mantenimiento I	Medio Base + Insulina (4,17 mg/ml)
Medio de Mantenimiento II	Medio Base

3.2 Evaluación de distintas concentraciones de un agonista de ROR α

Para poder evaluar el rol de ROR α sobre la adipogénesis, se desarrolló un protocolo que consistía en la utilización de diversas concentraciones de un agonista comercial de este receptor denominado SR1078 (*Sigma-Aldrich*).

Las células control se obtuvieron incubando a células con los distintos medios del protocolo adicionados con dimetilsulfóxido (DMSO) (*Sigma-Aldrich*) 0,1 % (v/v).

La solución (sc.) madre del agonista SR1078 se obtuvo disolviendo en DMSO la cantidad original siguiendo las recomendaciones de *Sigma-Aldrich*. Las distintas concentraciones utilizadas durante el experimento (10 μ M, 25 μ M y 50 μ M) se obtuvieron a partir de esta solución.

En la *Figura 4* se muestra la línea de tiempo para el desarrollo de este experimento, el cual se basó en la adición de distintos volúmenes de la sc. madre del agonista a los diferentes medios utilizados hasta obtener las concentraciones mencionadas. Previo a cultivar las células con los medios realizados, éstos fueron filtrados utilizando un filtro de 0,22 μ m. El volumen final por pocillo fue de 1,5 ml.

La obtención de las muestras para su posterior análisis se realizó a día 6.

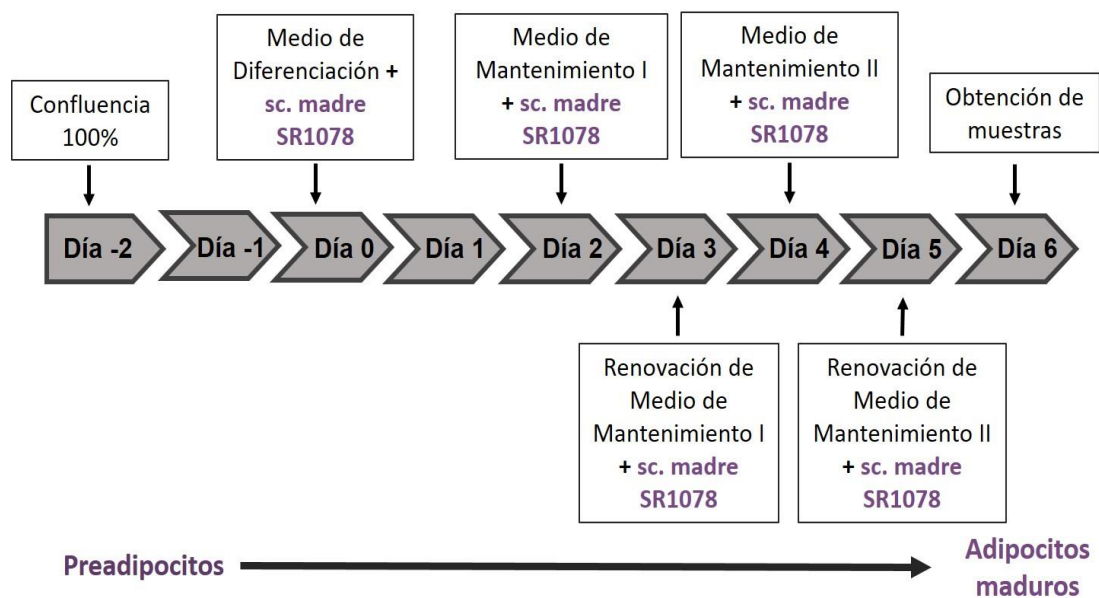


Figura 4: Línea temporal del protocolo utilizado para evaluar el papel de ROR α en la adipogénesis de las células 3T3-L1. Se muestran los cambios en los medios de diferenciación y mantenimiento I y II con la adición del agonista SR1078 para obtener las concentraciones de 10 μ M, 25 μ M y 50 μ M.

3.3 Sobreexpresión de *miR-19b* y agonista de ROR α

El procedimiento que se realizó para sobreexpresar el *miR* en estudio se basó en el protocolo de diferenciación con la solución de SR1078 a una concentración final de 25 μ M (sc. SR1078 25 μ M) pero con un paso previo que involucró una transfección transitoria con un imitador comercial de *miR-19b* (*miRNA mimic mmu-mir-19b-3p*) (*mirVana*TM) o con un control negativo (*mirVana*TM).

El medio de transfección utilizado se realizó considerando un volumen final por pocillo de 500 μ l, de los cuales 450 μ l fueron medio *Opti-MEM* (*Gibco*) y los 50 μ l restantes el medio en el cual se encuentra el sobreexpresante comercial de *miR-19b*, o bien, el control negativo. Para realizar este último, se añadieron en un microtubo 1,5 μ l de endofectina (*Genecopoeia*) y 25 μ L de medio *Opti-MEM*, se mezclaron y se incubó la mezcla a temperatura

ambiente durante 5 minutos; en un segundo microtubo, se añadió el imitador sintético comercial a una concentración de 17 nM y se diluyó en 26,5 µl de *Opti-MEM*, el cual también se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente, posteriormente se juntaron ambas mezclas, se mezclaron y se incubaron otros 5 minutos a temperatura ambiente. Esta última solución se incorporó a los 450 µl de medio *Opti-MEM* para obtener un volumen final de 500 µl para cada pocillo. Las células se mantuvieron con el medio de transfección durante 24 horas a partir de que presentaron una confluencia del 100 %.

Una vez transcurridas 24 horas, se retiró el medio de transfección y se sustituyó por medio de recuperación (*DMEM* + 10 % *Calf Serum* + 1 % P/S) durante 24 horas más. Posteriormente, se continuó con el protocolo de diferenciación junto con la solución de SR1078 a 25 µM. Se obtuvieron muestras para posterior análisis los días 2, 4 y 6 tras la inducción de la diferenciación (ver *Figura 5*).

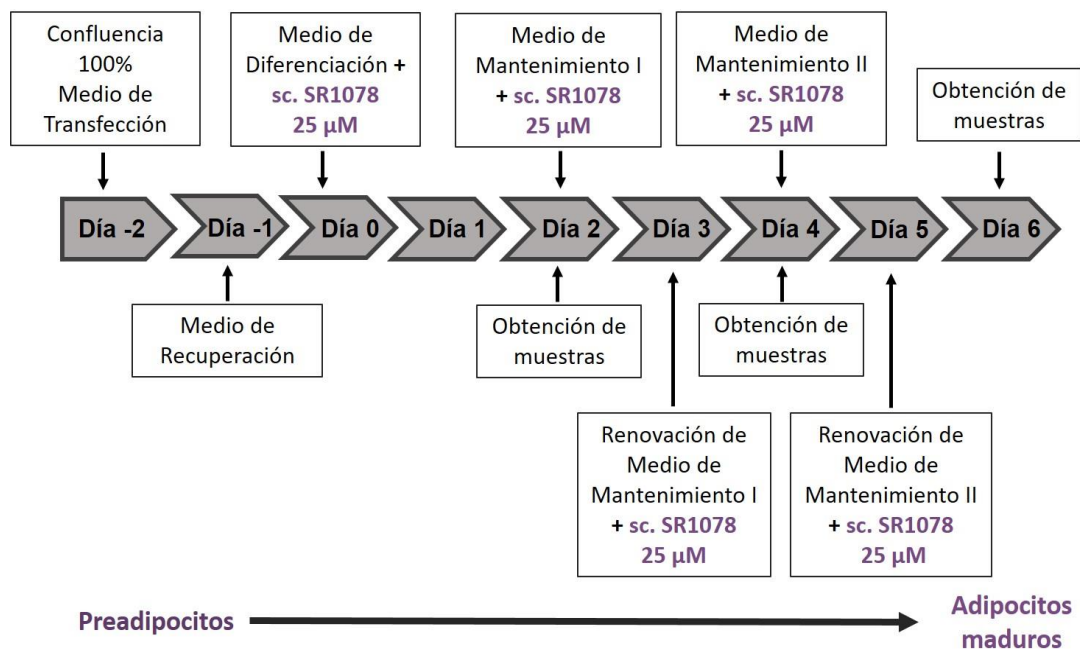


Figura 5: Línea temporal del protocolo utilizado para la sobreexpresión de *miR-19b* junto con el agonista de RORα en células 3T3-L1. Se muestran los

cambios en los medios de transfección, recuperación, diferenciación y mantenimiento I y II con la adición del agonista SR1078 (25 μ M).

3.4 Extracción de ARN de células 3T3-L1

Las células fueron recogidas con 800 μ l de TRIzol® (*Invitrogen*) y luego almacenadas a -80 °C.

Para la extracción de ARN de las células en estudio, se les añadió a las muestras descongeladas sobre hielo, bolitas de circonio para luego ser llevadas a un homogeneizador (*Qiagen Tissue Lyser*) y procesadas a una frecuencia de agitación de 25 (1/seg) durante 3 minutos. Una vez finalizado éste paso, se las centrifugó durante 10 minutos a 12000 x g, a 4 °C. Posteriormente, se pipeteó la solución inferior con mucha precaución de no absorber la grasa superior. A ésta última se le adicionó 230 μ l de cloroformo y se homogenizó en *vórtex* durante 1 minuto. Luego, se las centrifugó a 4 °C durante 15 minutos a 12000 x g. El paso siguiente consistió en aspirar la fase superior acuosa con mucha precaución de no tomar la fase intermedia y añadir 500 μ l de isopropanol (*Sigma-Aldrich*) a cada muestra. A estas se las dejó reposar durante 30 minutos a -20 °C. Pasado este tiempo, se las centrifugó a 4 °C durante 10 minutos a 12000 x g y se observó la presencia de un *pellet* que fue resuspendido en etanol (*Millipore*) frío al 75 % y homogenizado con *vórtex* durante 1 minuto. Posteriormente, las muestras se centrifugaron a 4 °C durante 5 minutos a 8000 x g eliminándose todo el etanol. Como paso final, se resuspendió al *pellet* obtenido y seco en agua estéril (*Becton Dickinson and Company Sparks*) y se lo calentó a 50 °C para mejorar su resuspensión. A estas muestras finales se las almacenó a -80 °C hasta el momento de realizar la retrotranscripción.

3.5 Retrotranscripción (RT) de ARN

Previamente a la realización de este procedimiento, se evaluó la integridad del ARN mediante geles de agarosa (*Sigma-Aldrich*) y la

concentración/calidad del mismo en cada muestra mediante un espectrofotómetro *NanoDrop-200* (*Thermo Scientific*) analizando su absorbancia a 260 y 280 nm.

Para la RT se usaron 1000 ng de ARN, por lo tanto, si la muestra obtenida de la extracción tenía una concentración superior, se diluía con agua estéril. Además de las muestras en estudio, se retrotranscribió una mezcla de ARN de todas ellas (F1) para posteriormente hacer una curva patrón, un control de retrotranscripción negativo (RT-) compuesto por agua estéril en vez de ARN y otro control denominado genómico negativo (Gen-) que también contenía la mezcla de ARNs.

En microtubos de 200 μ l rotulados adecuadamente se colocaron 10 μ l de ARN diluido de cada muestra (100 ng ARN/ μ l), así como, 10 μ l de la mezcla de todos los ARNs (para Gen- y F1) o agua (RT-). Luego, a cada muestra, F1 y control RT- se les añadió 20 μ l de la mezcla de RT (ver *Tabla V*). Para el control Gen- se añadió 20 μ l de la mezcla pero sin la enzima Retrotranscriptasa. En todos los casos el volumen final fue de 30 μ l.

Tabla V: Preparación de la mezcla de reacción de la RT.

Mezcla de la RT	Volumen por muestra (μ l)
Tampón de la transcriptasa reversa <i>M-MLV</i> (<i>M-MLV RT buffer</i> , <i>Invitrogen</i>)	6
Desoxirribonucleótidos Trifosfato (<i>dNTPs</i>) (10 mM <i>dNTP Mix</i> , <i>Invitrogen</i>)	6
$MgCl_2$ (50 mM) (<i>Invitrogen</i>)	1,5
<i>Random Primers</i> (<i>Invitrogen</i>)	0,17
Enzima inhibidora de ARNasas (<i>Rnase outTM</i> , <i>Invitrogen</i>)	0,25
Enzima Transcriptasa Reversa <i>M-MLV</i> (<i>Invitrogen</i>)	1,5
Agua estéril	4,58

Una vez mezclados todos los componentes, las muestras se introdujeron en un termociclador (*GeneAmp 9700*) con el programa indicado en la *Tabla VI*.

Tabla VI: Programa de la RT.

Etapa	Temperatura ($^{\circ}$ C)	Tiempo (min)
Retrotranscripción	37	95
	42	15
Desnaturalización de enzimas	95	5
Enfriamiento	4	∞

A partir de este programa de RT, se obtuvo la copia del ADN complementario al ARN inicial (ADNc). Tanto a las muestras como a los controles se los diluyó en 70 μ l de agua estéril. A F1 se lo diluyó en 50 μ l, y a partir de éste se realizaron los puntos restantes de la recta patrón: F2, F3 y F4, cada uno de ellos conteniendo un cuarto de la concentración del punto anterior.

El ADNc fue almacenado a -80 °C hasta el momento de hacer la Reacción en Cadena de la Polimerasa a Tiempo Real cuantitativa (*RT-qPCR*).

3.6 Reacción en Cadena de la Polimerasa a Tiempo Real (*RT-qPCR*)

Los genes analizados fueron los siguientes: *ROR α* , para poder estudiar sus niveles de expresión génica durante la adipogénesis, factores proadipogénicos como *PPAR γ* y *C/EBP α* y marcadores de adipocitos maduros como *FAS* y *ADIPOQ*. Para saber si se encontraba alterada la entrada de glucosa en las células se estudió el gen de un transportador que permite su ingreso como *GLUT4*. También, se analizó el gen de una enzima que participa de la vía glucolítica fosforilando la glucosa entrante como la Hexoquinasa (*HK*). Por último, se estudió al gen de la Carnitina Palmitoil Transferasa 1B (*CPT1B*) la cual es una enzima de la membrana externa mitocondrial que permite el pasaje de los ácidos grasos de cadena larga hacia el interior de la mitocondria donde se produce la β -oxidación de los mismos. Además, se evaluó el gen *S11* como gen control.

La cuantificación de la expresión génica de los genes previamente mencionados se realizó en un termociclador (*Light Cycler 480 Roche*). El kit utilizado para llevar a cabo la *RT-qPCR* fue el *PowerUp SYBR Green Master Mix (Life Technologies)*.

Como primer paso, en una placa para *PCR* de 96 pocillos, se colocaron 2 μ l para cada muestra y gen en estudio de: los puntos de la recta patrón (F1, F2, F3 y F4), control RT-, control Gen-, control *PCR*- (compuesto solo por agua estéril) y las muestras (ADNc) obtenidas de los experimentos descritos

previamente. Luego, a cada pocillo se le adicionó 15 μ l de la mezcla de *PCR*, detallado en la *Tabla VII*. Los cebadores sentido (Sen) y antisentido (Antisen) utilizados para cada gen se encuentran descritos en la *Tabla VIII*.

Tabla VII: Preparación de la mezcla de reacción de la *RT-qPCR*.

Mezcla de <i>RT-qPCR</i>	Volumen por muestra (μ l)
<i>PowerUp SYBR Green Master Mix</i>	8,5
Cebador Sen (100 nM)	0,068
Cebador Antisen (100 nM)	0,068
Agua estéril	6,4

Tabla VIII: Cebadores sentido y antisentido para ratón utilizados en la RT-qPCR.

Gen	Secuencia Cebador (5' - 3')	N° Acceso
RORα	Sen- AGCGAACATATTCCCCACAG Antisen- GTCTCCCTCCCTCTTCATCC	NM_013646.2
PPARγ	Sen- GGTGTGATCTTAACTGCCGGA Antisen- ACCTGATGGCATTGTGAGACA	NM_001127330.2
C/EBPα	Sen- ACTCGCTCCTTTTCCTACCG Antisen- CCCCAACACCTAAGTCCCTC	NM_001287514.1
FAS	Sen- GCCACCTCAGTCCTGCTATC Antisen- GGTATAGACGACGGGCACAG	NM_007988.3
ADIPOQ	Sen- TCCCAATGTACCCATTCGCT Antisen- AACGGCCTTGTCCTTCTTGA	NM_009605.4
GLUT4	Sen- TCCTTCTATTTGCCGTCCTC Antisen- TGTTTTGCCCTCAGTCATT	NM_009204.2
HK	Sen- TCCTGGAGTCTTCGATCCCA Antisen- CTCCGTGAATAAGCAGGCGA	NM_013820.3
CPT1B	Sen- TGTGAGTGACTGGTGGGAAG Antisen- CCATGACCGGCTTGATCTCT	NM_009948.2
S11	Sen- CATTGAGACGGAGCGTGCTTAC Antisen- TGCATCTTCATCTTCGTCAC	U93864.1

El programa que se utilizó está descrito a continuación en la *Tabla IX*.

Tabla IX: Programa de RT-qPCR (SYBR Green).

Etapa	Temperatura (°C)	Tiempo
Incubación	95	10 minutos
Amplificación 40 ciclos	95	10 segundos
	60	45 segundos
	72	4 segundos
<i>Melting</i>	95	5 segundos
	65	1 minuto
Enfriamiento	40	10 segundos

3.7 Análisis de Datos

Para el análisis de los datos obtenidos se utilizó el programa estadístico *IBM SPSS Statistics 24*. A aquellas variables que superaron el test de normalidad se les realizó la prueba de análisis de la varianza (ANOVA) de 1 vía para evaluar si había diferencias significativas entre las medias de los grupos. En el caso de las variables que no presentaban una distribución normal se les realizó el test no paramétrico U de Mann-Whitney para evidenciar las diferencias entre los grupos de estudio.

4. RESULTADOS

4.1 Evaluación de distintas concentraciones de un agonista de ROR α

4.1.1 Observación de células 3T3-L1 a días 2, 4 y 6

A día 2 de este protocolo (T = 2d), las células no presentan diferencias en el proceso de diferenciación entre las células control y las tratadas con distintas concentraciones de SR1078 (ver *Figura 6*).

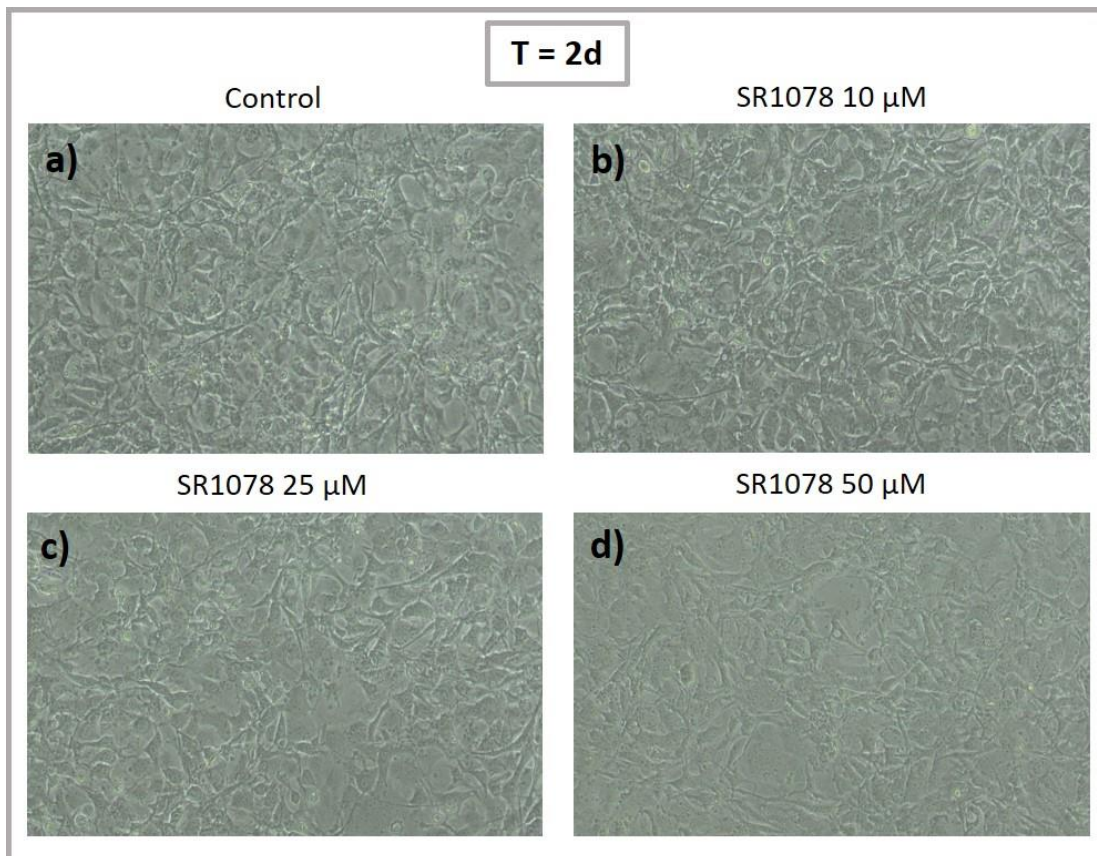


Figura 6: Fotografías a 10X de células 3T3-L1 a día 2 (T = 2d) del protocolo de evaluación de distintas concentraciones de un agonista de ROR α . Las fotografías fueron tomadas con el microscopio *Nikon Eclipse TS 100* con la cámara para microscopía digital *XM Full HD Camera (XM Family, Samsung BWC-1602)*. a) Células control; b) células con SR1078 a 10 μ M; c) células con SR1078 a 25 μ M; d) células con SR1078 a 50 μ M.

Es recién a partir del día 4 ($T = 4d$) donde comienzan a manifestarse cambios en las células. Se puede observar, en las células control y las tratadas con concentraciones de $10 \mu M$ y $25 \mu M$ de SR1078, la presencia de pequeñas gotas lipídicas en su interior, así como algunas células con forma más redondeada (ver *Figura 7a-7c*). Las tratadas con la concentración de $50 \mu M$ del agonista no presentan diferencia alguna con respecto al día 2 del protocolo (ver *Figura 7d*).

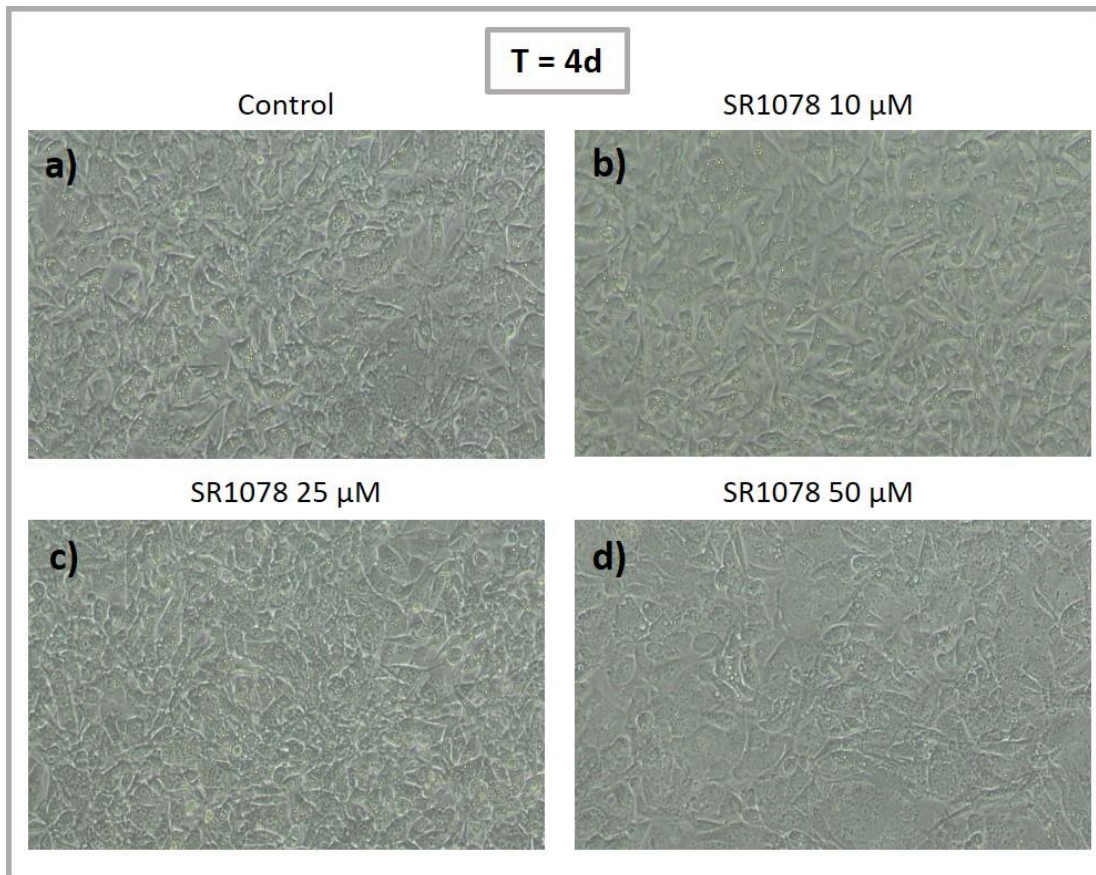


Figura 7: Fotografías a 10X de células 3T3-L1 a día 4 ($T = 4d$) del protocolo de evaluación de distintas concentraciones de un agonista de $ROR\alpha$. Las fotografías fueron tomadas con el microscopio *Nikon Eclipse TS 100* con la cámara para microscopía digital *XM Full HD Camera (XM Family, Samsung BWC-1602)*. a) Células control; b) células con SR1078 a $10 \mu M$; c) células con SR1078 a $25 \mu M$; d) células con SR1078 a $50 \mu M$.

Por último, a día 6 (T = 6d), se observa que las células tratadas con 10 μM y 25 μM de SR1078 presentan una acumulación de lípidos mayor respecto a las células control, siendo 25 μM la concentración de agonista a la cual se observa el mayor depósito lipídico (ver *Figura 8a-8c* y *Figura 9a-9c*). Sin embargo, en las células tratadas con 50 μM del agonista no se observan cambios con respecto al inicio del protocolo, lo que indica que no se produjo la diferenciación (ver *Figura 8d* y *9d*).

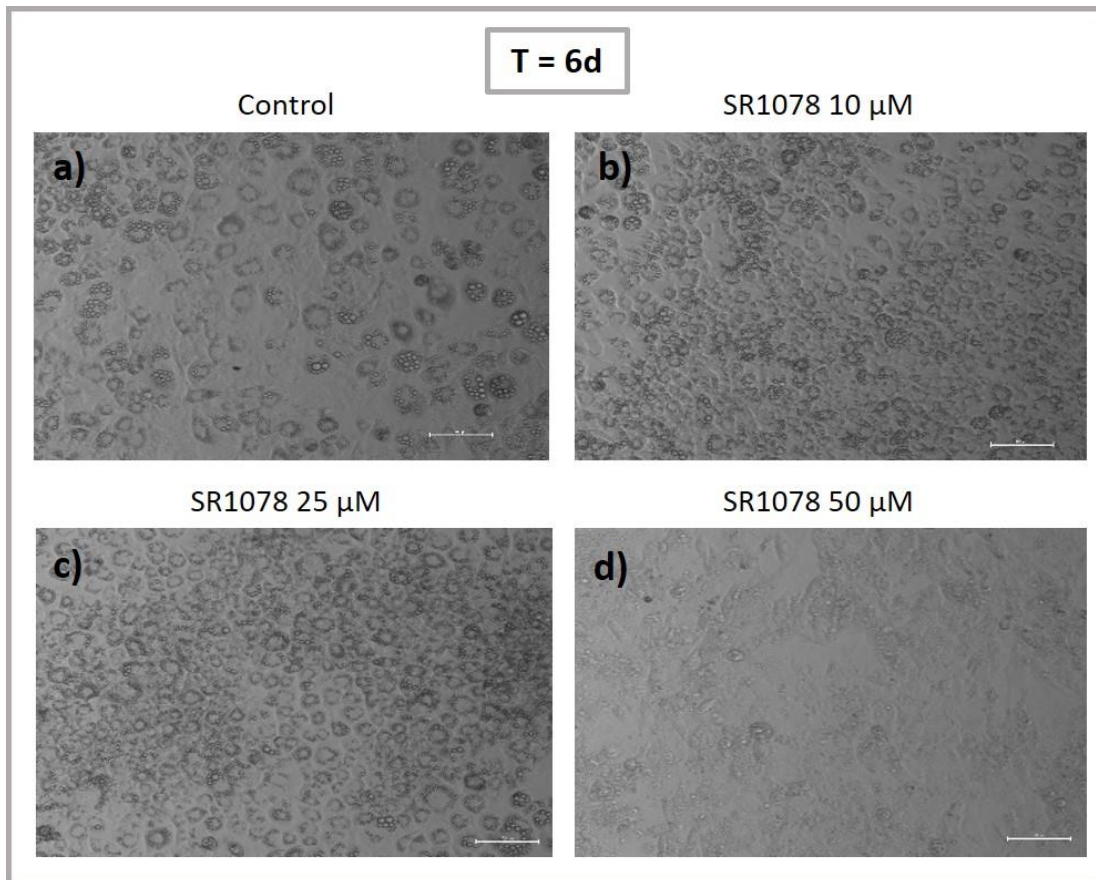


Figura 8: Fotografías a 10X de células 3T3-L1 a día 6 (T = 6d) del protocolo de evaluación de distintas concentraciones de un agonista de ROR α . Las fotografías fueron tomadas con el microscopio *Inverted Research Microscope Eclipse Ti, Nikon* para obtener una mayor resolución. La barra de magnificación indica 100 μm . a) Células control; b) células con SR1078 a 10 μM ; c) células con SR1078 a 25 μM ; d) células con SR1078 a 50 μM .

Para poder observar aún mejor las diferencias descritas entre las células en el día 6 del protocolo, se tomaron fotografías a un mayor aumento como muestra la *Figura 9*.

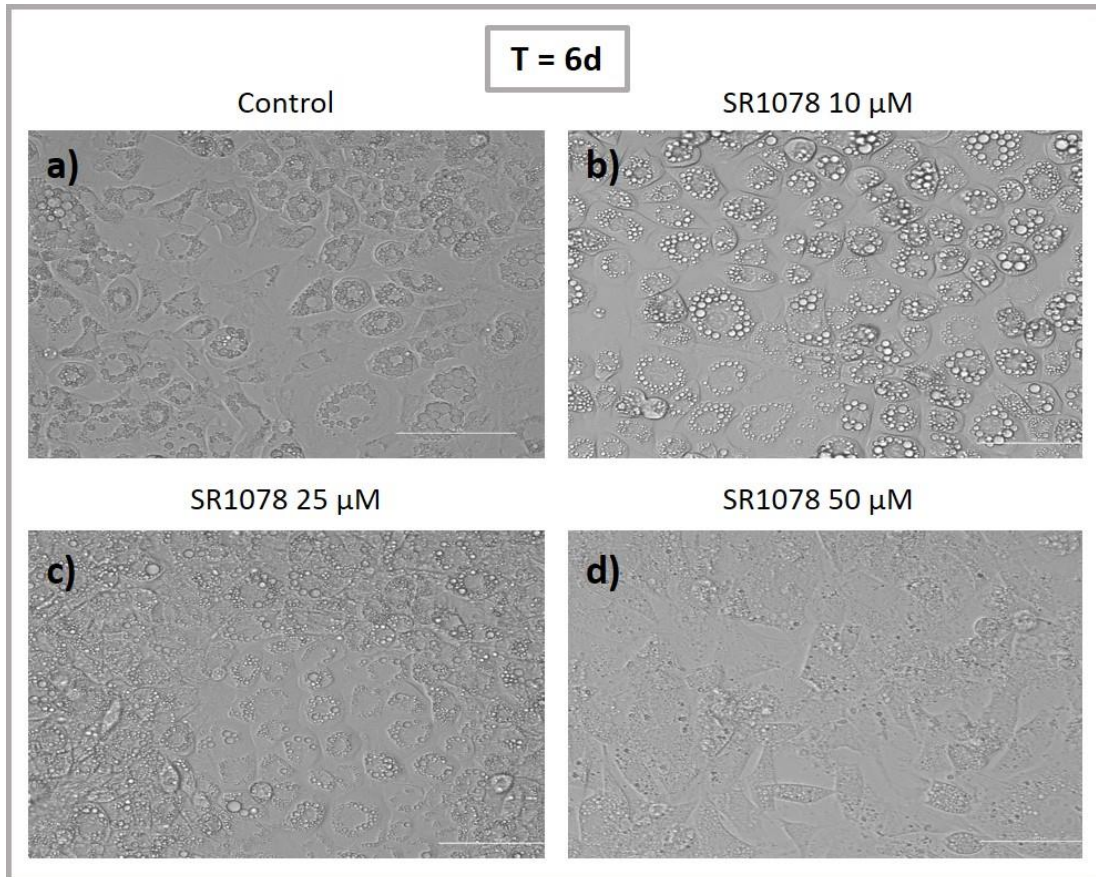


Figura 9: Fotografías a 20X de células 3T3-L1 a día 6 (T = 6d) del protocolo de evaluación de distintas concentraciones de un agonista de ROR α . Estas fotografías fueron tomadas con el microscopio *Inverted Research Microscope Eclipse Ti, Nikon*. La barra de magnificación indica 100 μ m. a) Células control; b) células con SR1078 a 10 μ M; c) células con SR1078 a 25 μ M; d) células con SR1078 a 50 μ M.

4.1.2 Niveles de expresión génica mediante RT-qPCR

Una vez que comprobamos que a dosis bajas del agonista de ROR α se produce un aumento en la acumulación de lípidos y se observan células más diferenciadas, quisimos estudiar cuál es el mecanismo de acción a través del

cuál se da este proceso. Para ello estudiamos la expresión génica de diversos genes: *RORα*, *PPARγ*, *C/EBPα*, *FAS*, *ADIPOQ*, *GLUT4*, *HK* y *CPT1B*.

En primer lugar, cuando analizamos los niveles de expresión de *RORα*, observamos que se encuentran aumentados a las concentraciones de 10 μ M y 25 μ M del agonista con respecto a las células control. Mientras que a 50 μ M de SR1078 se evidencia una clara disminución (ver *Figura 10*).

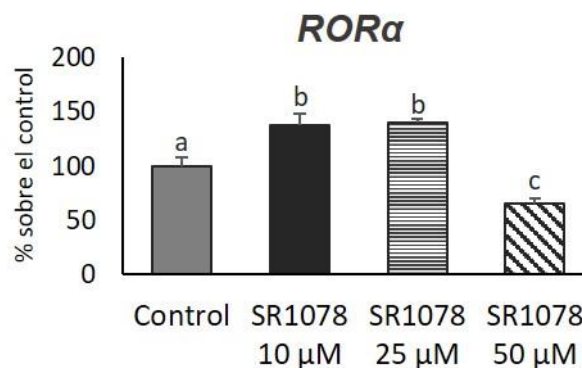


Figura 10: Niveles de expresión del ARNm de *RORα*. Los valores se expresan como la media en unidades arbitrarias \pm el error, donde el valor 100 % se le asignó al grupo control. $P < 0,05$ se considera estadísticamente significativo. Letras distintas sobre las barras indican diferencias estadísticamente significativas. Test U de Mann-Whitney. $N = 6$ para todos los grupos. Datos normalizados respecto a *S11*.

Una posible vía para explicar un aumento de la adipogénesis sería un aumento en los factores de transcripción implicados en el proceso de diferenciación (*PPARγ* y *C/EBPα*), sin embargo, no se observan diferencias significativas en sus niveles de expresión entre las células tratadas con 10 μ M y 25 μ M del agonista y las células control. A 50 μ M del agonista se observa una notable disminución de los mismos (ver *Figura 11*).

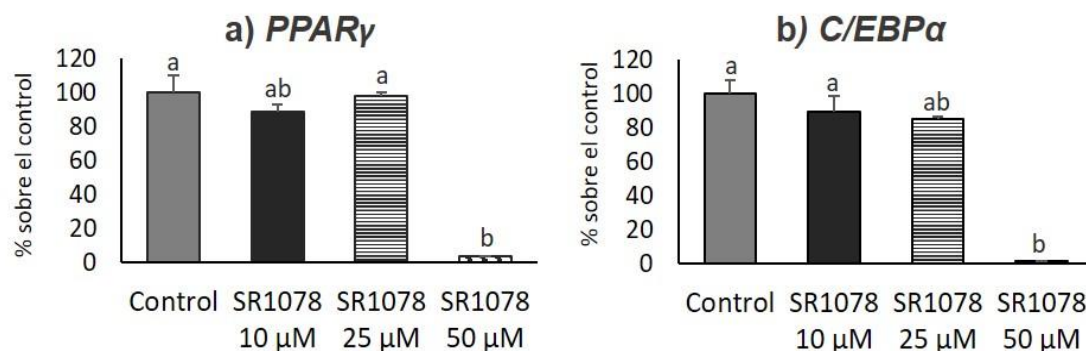


Figura 11: Niveles de expresión del ARNm de a) *PPARγ* y b) *C/EBPα*. Los valores se expresan como la media en unidades arbitrarias \pm el error, donde el valor 100 % se le asignó al grupo control. $P < 0,05$ se considera estadísticamente significativo. Letras distintas sobre las barras indican diferencias estadísticamente significativas. Test U de Mann-Whitney. $N = 6$ para todos los grupos. Datos normalizados respecto a *S11*.

A continuación, estudiamos los niveles de expresión de los marcadores de adipocitos maduros, *ADIPOQ* y *FAS*. En este caso, observamos que a 10 μM de SR1078 no presentan diferencias con respecto a las células control. Para las células tratadas a 25 μM del agonista se observa que *FAS* está disminuido, pero no se observan diferencias para *ADIPOQ* con respecto a las células control. A la concentración de agonista de 50 μM ambos marcadores se encuentran disminuidos con respecto a las células control (ver *Figura 12*).

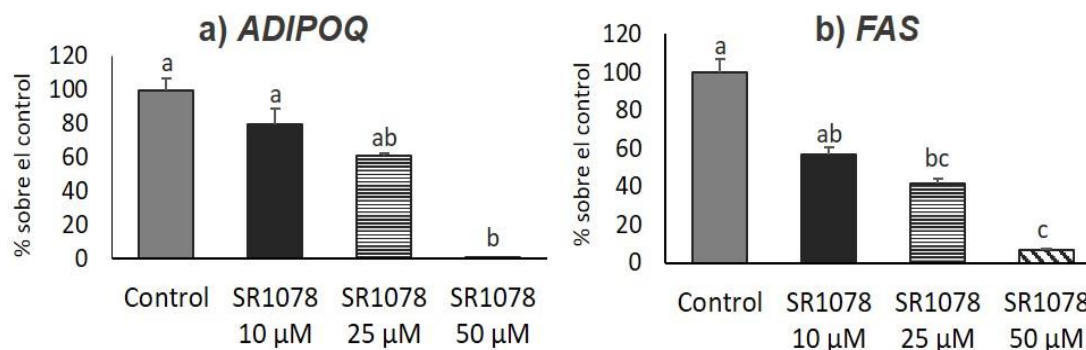


Figura 12: Niveles de expresión del ARNm de a) *ADIPOQ* y b) *FAS*. Los valores se expresan como la media en unidades arbitrarias \pm el error, donde el valor 100 %

se le asignó al grupo control $P < 0,05$ se considera estadísticamente significativo. Letras distintas sobre las barras indican diferencias estadísticamente significativas. Test U de Mann-Whitney. $N = 6$ para todos los grupos. Datos normalizados respecto a *S11*.

A partir de los resultados obtenidos para *FAS*, decidimos estudiar los niveles de expresión de *GLUT4* y *HK* relacionados con la entrada de glucosa a la célula y su metabolismo, respectivamente. No observamos diferencias estadísticamente significativas entre las células tratadas a $10 \mu\text{M}$ y $25 \mu\text{M}$ del agonista con las células control en ninguno de los dos genes estudiados. En cambio, a la concentración de $50 \mu\text{M}$ se observa una clara disminución de ambas (ver *Figura 13*).

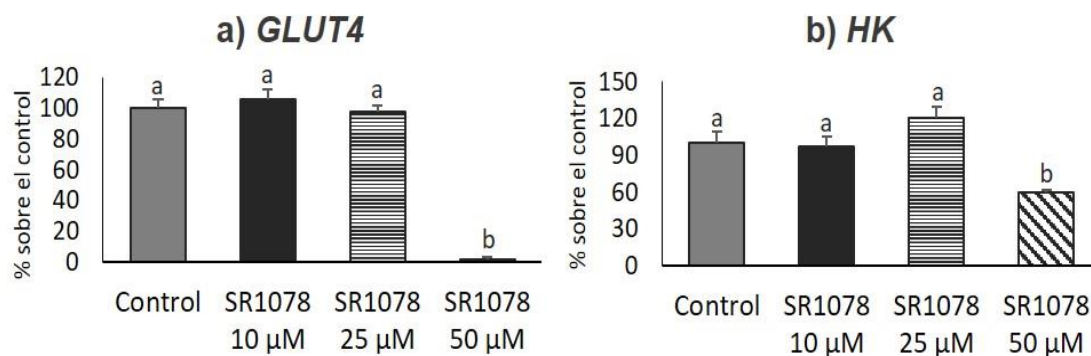


Figura 13: Niveles de expresión del ARNm de a) *GLUT4* y b) *HK*. Los valores se expresan como la media en unidades arbitrarias \pm el error, donde el valor 100 % se le asignó al grupo control. $P < 0,05$ se considera estadísticamente significativo. Letras distintas sobre las barras indican diferencias estadísticamente significativas. Test U de Mann-Whitney. $N = 6$ para todos los grupos. Datos normalizados respecto a *S11*.

Finalmente, al observar que la entrada de glucosa y su metabolismo no se encontraban alterados a bajas dosis de SR1078 ($10 \mu\text{M}$ y $25 \mu\text{M}$ del agonista), decidimos estudiar los niveles de expresión de *CPT1B*, gen que codifica para una enzima indicativa del proceso de β -oxidación. En este caso, observamos que a $10 \mu\text{M}$ y $50 \mu\text{M}$ de SR1078 no hay diferencias con

respecto a las células control. Mientras que para la concentración de 25 μM del agonista se evidencia un incremento significativo cuando se la compara con las células control (ver *Figura 14*).

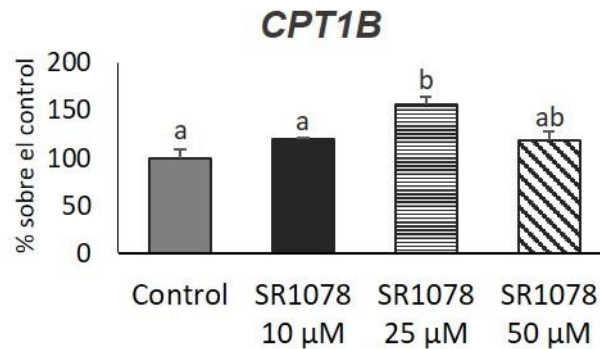


Figura 14: Niveles de expresión del ARNm de *CPT1B*. Los valores se expresan como la media en unidades arbitrarias \pm el error, donde el valor 100 % se le asignó al grupo control. $P < 0,05$ se considera estadísticamente significativo. Letras distintas sobre las barras indican diferencias estadísticamente significativas. Test U de Mann-Whitney. $N = 6$ para todos los grupos. Datos normalizados respecto a *S11*.

4.2 Sobreexpresión de *miR-19b* y agonista de $\text{ROR}\alpha$

Teniendo en cuenta que, resultados obtenidos mediante la utilización de algoritmos bioinformáticos predicen que $\text{ROR}\alpha$ podría estar regulado por *miR-19b*, y que, sumado a esto, estudios previos realizados por nuestro grupo de investigación demuestran que *miR-19b* se encuentra alterado en el tejido adiposo de pacientes con obesidad mórbida, pretendíamos sobreexpresar dicho *miR* en la línea celular 3T3-L1 junto con el agonista comercial de $\text{ROR}\alpha$ para comprobar si este receptor nuclear es una diana del *miR* en estudio.

Lamentablemente, el protocolo de sobreexpresión de *miR-19b* y agonista de $\text{ROR}\alpha$ no se pudo llevar a cabo en su totalidad debido a diversos problemas durante la realización de la técnica.

La primera vez que se realizó este protocolo, tuvo que ser descartado a día -1 ya que al cambiarle a las células el medio de transfección por el de expansión se perdió la adherencia de las células a la placa.

En un segundo intento, el experimento tuvo que ser cancelado a día 5. Inicialmente, a día 2 se observaron diferencias entre las células con y sin el agonista ya que había pequeñas gotas lipídicas en aquellas tratadas con SR1078. Sin embargo, a día 3 se observó la detención del proceso de diferenciación ya que no se observaron los lípidos intracelulares en las células tratadas con el agonista que estaban presentes el día anterior. Debido a que la “involución” de las células continuó en los días siguientes, se decidió cancelar el protocolo a día 5.

A partir de los reiterados fallos de este protocolo, se realizaron distintas pruebas para intentar averiguar cuál era el problema y solucionarlo, y así, continuar con el estudio. Sin embargo, debido al limitado tiempo del Trabajo de Fin de Máster, y considerando que estos experimentos son muy largos, no hubo tiempo suficiente para repetirlos.

5. DISCUSIÓN

El experimento de evaluación de las concentraciones de un agonista de ROR α fue realizado con el fin de poner de manifiesto el papel que cumple este receptor nuclear en la adipogénesis.

Como ya se ha mencionado, la función de ROR α en el proceso de diferenciación adipocitaria es controvertida. Si bien hay diversos estudios que relacionan a ROR α con la adipogénesis, existen discrepancias sobre cómo ejerce su efecto. Algunos autores señalan que la sobreexpresión de este receptor nuclear en células 3T3-L1 produce inhibición de la adipogénesis, debido a que provoca una disminución de los depósitos de lípidos intracelulares y una reducción de los niveles de expresión de factores de transcripción y marcadores de la adipogénesis (24, 25). En otro trabajo, los fibroblastos embrionarios de ratones *staggerer* se diferencian a adipocitos de una forma más eficiente, lo que no es consistente con su reducida adiposidad (24, 27). Sin embargo, en un modelo transgénico específico para tejido adiposo en ratón, también se ha demostrado una disminución de la adiposidad (31). En ratones *ob/ob* se observa que ROR α estimula la respuesta inflamatoria en el tejido adiposo causando estrés del retículo (29). Mientras que en ratones *KO* para ROR α , se evidencia un aumento de la oxidación lipídica y disminución de citoquinas proinflamatorias (30).

Los resultados obtenidos del protocolo de evaluación de distintas concentraciones de un agonista de ROR α indican que este receptor nuclear ejerce un efecto positivo sobre la adipogénesis, ya que se observa una mayor acumulación lipídica con respecto a las células control cuando las células son tratadas con concentraciones de agonista de 10 μ M y 25 μ M, siendo aún mayor el depósito a 25 μ M de SR1078.

A la concentración de 50 μ M del agonista se observa un efecto distinto sobre las células, ya que no solo se produce un bloqueo total del proceso de

diferenciación, sino que, además, las células presentan un aspecto muy alejado del normal. Por lo que, a concentraciones superiores de agonista, el efecto que produce sobre las células sería el opuesto al observado a dosis más bajas. Esto podría deberse a que SR1078 presenta un efecto dosis dependiente, es decir, que según la concentración a la que se lo utilice el efecto generado es distinto, o bien, porque la dosis utilizada (50 μ M de SR1078) es tóxica para las células, generando una alteración de su funcionamiento normal. *Wang* y colaboradores reportan que SR1078 es un agonista de ROR α dosis-dependiente, ya que al incrementar su concentración desde 0 μ M a 10 μ M de SR1078 en células de la línea celular HEK293, observan que la expresión de genes diana de ROR α aumenta significativamente. Sin embargo, no prueban este agonista a concentraciones mayores como para evaluar si ROR α presenta un efecto contrario al mencionado previamente (32).

Después de comprobar que el agonista de ROR α es un regulador positivo de la adipogénesis en células 3T3-L1 a dosis bajas, decidimos estudiar cuál podría ser el mecanismo a través del cual ejerce este efecto. Para ello, empezamos por estudiar los niveles de expresión de los principales factores de transcripción implicados en la adipogénesis, como son *PPAR γ* y *C/EBP α* . El hecho de que no se observaron diferencias en sus niveles con respecto a las células no tratadas con el agonista, indica que el mecanismo por el cual ROR α estimula la adipogénesis no sería a través de estos factores (11, 12).

Cuando decidimos estudiar los marcadores que indican que los adipocitos están maduros, como *ADIPOQ* y *FAS*, obtuvimos resultados inesperados. Observamos que a la concentración de 25 μ M del agonista, los niveles de *ADIPOQ* no presentan diferencias con respecto a las células control y los de *FAS* están disminuidos. Estos datos no se corresponden con lo observado en estas células ya que los depósitos de lípidos intracelulares están aumentados en comparación con las células control. Por lo tanto, esta

acumulación lipídica no se debe a la lipogénesis *de novo* llevada a cabo por la enzima FAS. Esta enzima es un marcador de dicho proceso metabólico ya que cataliza la reacción de biosíntesis de los ácidos grasos en hígado y tejido adiposo (33).

A continuación, y debido a los resultados obtenidos para FAS, quisimos descartar que la entrada de la glucosa a la célula no estuviera alterada. Es por ello, que decidimos evaluar los niveles de expresión de GLUT4. A la concentración de 25 μ M del agonista, los niveles GLUT4 no presentan diferencias con respecto a las células control. Esto podría indicar que no hay un aumento del ingreso de este hidrato de carbono hacia el interior celular; sin embargo, el hecho de que los niveles de expresión no presenten diferencias no es suficiente para concluir que el ingreso de glucosa a la célula no está alterado, ya que podría, por ejemplo, estar aumentada la translocación de este transportador hacia la membrana celular. La translocación de GLUT4 se produce debido a que la insulina promueve el movimiento de este transportador ubicado en endosomas en el citoplasma hacia la membrana celular para permitir el ingreso de la glucosa (34).

Siguiendo en la línea de estudio del metabolismo de la glucosa, y tras el descenso observado en los niveles de expresión génica de FAS, decidimos evaluar los niveles de expresión de la primera enzima involucrada en el proceso de la glucólisis: HK. En este caso, no se observan diferencias en los niveles de expresión de HK entre las células tratadas con 25 μ M de SR1078 y las células control, por lo que, a esta concentración, el mecanismo de consumo de glucosa no se encuentra alterado. Este hecho, sumado a los niveles de expresión génica de GLUT4, nos lleva a concluir que el descenso en la lipogénesis *de novo* no es debido a una alteración en la entrada de glucosa en la célula (33).

De acuerdo con la evaluación de todos los resultados obtenidos hasta el momento, decidimos estudiar si el proceso catabólico de los ácidos grasos,

es decir, la β -oxidación, se encontraba alterado. Para ello, evaluamos los niveles de expresión de *CPT1B*, gen que codifica para una enzima de la membrana externa mitocondrial que permite el pasaje de los ácidos grasos de cadena larga hacia el interior de la mitocondria. Observamos que a la concentración de 25 μ M de SR1078, los niveles de *CPT1B* se encuentran aumentados con respecto a las células control, esto indica un aumento en el pasaje de los ácidos grasos de cadena larga hacia el interior de la mitocondria donde se lleva a cabo el proceso de β -oxidación. Este resultado indica que este proceso catabólico se encuentra aumentado, debido a que hay una mayor cantidad de los mismos en el interior celular. Sin embargo, seguimos sin poder esclarecer el mecanismo por el cual se está produciendo esta acumulación lipídica intracelular (35).

Por lo tanto, el estudio de procesos que puedan justificar este aumento es necesario para arribar a conclusiones más contundentes. Un mecanismo propuesto podría ser el proceso de gliceroneogénesis. *Kadiri* y colaboradores evidencian que en tejido adiposo inguinal (subcutáneo) de ratones *staggerer* (*ROR α ^{sg/sg}*) la reesterificación de ácidos grasos por la vía de la gliceroneogénesis se encuentra alterada, lo que explicaría la disminución del tamaño de los adipocitos, y, por lo tanto, la disminución de la adiposidad en estos animales. Concluyen esto ya que observan una disminución en la incorporación del piruvato en los triglicéridos y una relación ácidos grasos libres/glicerol aumentada. También, indican que los niveles de expresión génica, proteicos y de actividad específica de la enzima Fosfoenolpiruvato Carboxiquinasa (PEPC-K), clave en el proceso de gliceroneogénesis, se encuentran disminuidos (36).

En este trabajo demostramos que pequeños aumentos en la expresión de *ROR α* actúan como un modulador positivo de la adipogénesis. Sin embargo, con nuestros resultados no podemos descartar que cambios más pronunciados sobre *ROR α* tengan un efecto contrario, debido a que

previamente hay que destacar un posible efecto tóxico de este agonista a dosis altas. Efectos contrarios dependiendo del grado de inhibición o sobreexpresión de este receptor podrían explicar los resultados discrepantes entre los distintos trabajos publicados y ya mencionados en la introducción, así como entre nuestro trabajo y otros publicados. También hay que tener en cuenta, que este estudio fue desarrollado en una línea celular, es decir, un sistema *in vitro*, en el cual, las células fueron incubadas con un medio adicionado con un agonista comercial de ROR α , lo que puede explicar, al menos parcialmente, algunas de las diferencias observadas con los modelos *in vivo*. En otros trabajos, también realizados con modelos *in vitro*, no obtienen el mismo resultado, una explicación podría ser un distinto diseño experimental. Por ejemplo, *Duez* y colaboradores indican que ROR α inhibe la adipogénesis; sin embargo, su estudio está realizado sobre una línea celular 3T3-L1 modificada de tal manera que sobreexpresa constitutivamente a ROR α . Este mismo grupo, utiliza otro modelo *in vitro* con fibroblastos de ratones *staggerer* para demostrar el papel negativo de ROR α sobre la adipogénesis. En este último caso, sus resultados no serían comparables con los obtenidos en este trabajo, ya que sus células fueron un cultivo primario obtenido de ratones *staggerer* (24). Otros trabajos que evidencian una menor adiposidad con la ausencia de ROR α , como el modelo *in vivo* de ratones *staggerer* o el modelo de ratones KO, *ElRORaKO*, apoyarían nuestros resultados (26, 30). Sin embargo, al analizar sus resultados y los nuestros, es importante tener en cuenta las diferencias existentes entre un modelo *in vivo* (26-31) y uno *in vitro* (24, 25). La influencia de las hormonas y el microambiente presentes en un sistema *in vivo* son críticos para el desarrollo de las funciones de un receptor como ROR α , y, por lo tanto, deben ser considerados al momento de analizar resultados y establecer conclusiones.

6. CONCLUSIÓN

De acuerdo a los objetivos planteados y resultados obtenidos, podemos concluir que:

- Incrementos moderados de $ROR\alpha$ regulan de manera positiva el proceso de diferenciación adipocitaria favoreciendo la acumulación lipídica de un modo independiente a los factores de transcripción clásicos tales como $PPAR\gamma$ y $C/EBP\alpha$, sin alterar la entrada de glucosa en la célula y sin un aumento en la lipogénesis *de novo*.
- Según distintos algoritmos bioinformáticos $ROR\alpha$ podría ser una diana de *miR-19b*. Sin embargo, debido a problemas técnicos surgidos durante el desarrollo de este trabajo, no podemos proporcionar una conclusión sin antes repetir los experimentos planteados.

7. AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, me gustaría agradecer a mi directora Susana, por su constante apoyo y supervisión durante la realización de este trabajo. A mi co-directora, Paula, por todos los días compartidos en el laboratorio. A mis compañeras y compañeros del Máster que han sido de lo mejor que me ha pasado en este curso. Al INIBIC y la UDC por abrirme las puertas a nuevos conocimientos y técnicas en investigación. A la Xunta de Galicia, ya que sin su ayuda no podría haber hecho este posgrado. Y, finalmente, a mi compañero, amigas y familia que, a pesar de la distancia, han sido mi cable a tierra y mi sostén para que pueda llegar a este momento.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. World Health Organization (WHO) [Internet]. Copenhague: WHO; 2019 [citado 20 de abril de 2019]. Obesity. Disponible en: <http://www.euro.who.int/en/health-topics/noncommunicable-diseases/obesity/obesity>
2. World Health Organization (WHO) [Internet]. Copenhague: WHO; 2019 [citado 20 de abril de 2019]. Body mass index - BMI. Disponible en: <http://www.euro.who.int/en/health-topics/disease-prevention/nutrition/a-healthy-lifestyle/body-mass-index-bmi>.
3. Jensen MD, Ryan DH, Donato KA, Apovian CM, Ard JD, Comuzzie AG, et al. Executive summary: Guidelines (2013) for the management of overweight and obesity in adults. *Obesity*. 2014;22(S2):5-39.
4. Instituto Gallego de Estadística (IGE) [Internet]. Galicia: Xunta de Galicia; 2011-2012 [actualizado 12 de septiembre de 2017; citado 20 de abril de 2019]. Índice de Masa Corporal de población adulta (18 y más años) e infantil (2 a 17 años) según sexo (España). Disponible en: <https://www.ige.eu/igebdt/esqv.jsp?ruta=verTabla.jsp?OP=1&B=1&M=&COD=8905&R=1%5ball%5d;3%5b22:18:19:20%5d&C=9924%5b108%5d;4%5b1%5d&F=&S=0:2012&SCF>.
5. Instituto Gallego de Estadística (IGE) [Internet]. Galicia: Xunta de Galicia; 2011-2012 [actualizado 12 de septiembre de 2017; citado 20 de abril de 2019]. Índice de Masa Corporal de población adulta (18 y más años) e infantil (2 a 17 años) según sexo (Galicia). Disponible en: <https://www.ige.eu/igebdt/esqv.jsp?ruta=verTabla.jsp?OP=1&B=1&M=&COD=8905&R=1%5ball%5d;3%5ball%5d&C=9924%5b12%5d;4%5b1%5d&F=&S=0:2012&SCF>.

6. Tandon P, Wafer R, Minchin JEN. Adipose morphology and metabolic disease. *J Exp Biol.* 2018;221(Pt Suppl 1):1-11.
7. Rutkowski JM, Stern JH, Scherer PE. The cell biology of fat expansion. *J Cell Biol.* 2015;208(5):501-512.
8. Vegiopoulos A, Rohm M, Herzig S. Adipose tissue: between the extremes. *EMBO J.* 2017;36(14):1999-2017.
9. Coelho M, Oliveira T, Fernandes R. Biochemistry of adipose tissue: an endocrine organ. *Arch Med Sci AMS.* 2013;9(2):191-200.
10. Stern JH, Rutkowski JM, Scherer PE. Adiponectin, Leptin, and Fatty Acids in the Maintenance of Metabolic Homeostasis through Adipose Tissue Crosstalk. *Cell Metab.* 2016;23(5):770-84.
11. Huang Q, Ma C, Chen L, Luo D, Chen R, Liang F. Mechanistic Insights Into the Interaction Between Transcription Factors and Epigenetic Modifications and the Contribution to the Development of Obesity. *Front Endocrinol.* 2018;9(370):1-15.
12. Ghaben AL, Scherer PE. Adipogenesis and metabolic health. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2019;20(4):242-258.
13. Li Y, Rong Y, Bao L, Nie B, Ren G, Zheng C, et al. Suppression of adipocyte differentiation and lipid accumulation by stearidonic acid (SDA) in 3T3-L1 cells. *Lipids Health Dis.* 2017;16(1):181-191.
14. Iacomino G, Siani A. Role of microRNAs in obesity and obesity-related diseases. *Genes Nutr.* 2017;12:23-39.
15. Olive V, Bennett MJ, Walker JC, Ma C, Jiang I, Cordon-Cardo C, et al. miR-19 is a key oncogenic component of mir-17-92. *Genes Dev.* 2009;23(24):2839-2849.

16. Engin AB. MicroRNA and Adipogenesis. *Adv Exp Med Biol.* 2017;960:489-509.
17. Wang Q, Li YC, Wang J, Kong J, Qi Y, Quigg RJ, et al. miR-17-92 cluster accelerates adipocyte differentiation by negatively regulating tumor-suppressor Rb2/p130. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(8):2889-2894.
18. Guo L, Li X, Tang Q-Q. Transcriptional regulation of adipocyte differentiation: a central role for CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP) β . *J Biol Chem.* 2015;290(2):755-761.
19. Li J, Yang S, Yan W, Yang J, Qin Y-J, Lin X-L, et al. MicroRNA-19 triggers epithelial-mesenchymal transition of lung cancer cells accompanied by growth inhibition. *Lab Investig J Tech Methods Pathol.* 2015;95(9):1056-1070.
20. Gantier MP, Stunden HJ, McCoy CE, Behlke MA, Wang D, Kaparakis-Liaskos M, et al. A miR-19 regulon that controls NF- κ B signaling. *Nucleic Acids Res.* 2012;40(16):8048-8058.
21. Hsieh C-H, Rau C-S, Wu S-C, Yang JC-S, Wu Y-C, Lu T-H, et al. Weight-reduction through a low-fat diet causes differential expression of circulating microRNAs in obese C57BL/6 mice. *BMC Genomics.* 2015;16:699-710.
22. Grandjean V, Fourné S, De Abreu DAF, Derieppe M-A, Remy J-J, Rassoulzadegan M. RNA-mediated paternal heredity of diet-induced obesity and metabolic disorders. *Sci Rep.* 2015;5:18193-18202.
23. Zhang Y, Luo X, Wu D, Xu Y. ROR nuclear receptors: structures, related diseases, and drug discovery. *Acta Pharmacol Sin.* 2015;36(1):71-87.

- 24.** Duez H, Duhem C, Laitinen S, Patole PS, Abdelkarim M, Bois-Joyeux B, et al. Inhibition of adipocyte differentiation by RORalpha. *FEBS Lett.* 2009;583(12):2031-2046.
- 25.** Ohoka N, Kato S, Takahashi Y, Hayashi H, Sato R. The orphan nuclear receptor RORalpha restrains adipocyte differentiation through a reduction of C/EBPbeta activity and perilipin gene expression. *Mol Endocrinol Baltim Md.* 2009;23(6):759-771.
- 26.** Lau P, Fitzsimmons RL, Raichur S, Wang S-CM, Lechtken A, Muscat GEO. The orphan nuclear receptor, RORalpha, regulates gene expression that controls lipid metabolism: staggerer (SG/SG) mice are resistant to diet-induced obesity. *J Biol Chem.* 2008;283(26):18411-18421.
- 27.** Pearen MA, Muscat GEO. Orphan nuclear receptors and the regulation of nutrient metabolism: understanding obesity. *Physiol Bethesda Md.* 2012;27(3):156-166.
- 28.** Lau P, Tuong ZK, Wang S-C, Fitzsimmons RL, Goode JM, Thomas GP, et al. Rora deficiency and decreased adiposity are associated with induction of thermogenic gene expression in subcutaneous white adipose and brown adipose tissue. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2015;308(2):159-171.
- 29.** Liu Y, Chen Y, Zhang J, Liu Y, Zhang Y, Su Z. Retinoic acid receptor-related orphan receptor α stimulates adipose tissue inflammation by modulating endoplasmic reticulum stress. *J Biol Chem.* 2017;292(34):13959-13969.
- 30.** Billon C, Sitaula S, Burris TP. Metabolic Characterization of a Novel ROR α Knockout Mouse Model without Ataxia. *Front Endocrinol.* 2017;8:141-151.

- 31.** Tuong ZK, Fitzsimmons R, Wang S-CM, Oh TG, Lau P, Steyn F, et al. Transgenic Adipose-specific Expression of the Nuclear Receptor ROR α Drives a Striking Shift in Fat Distribution and Impairs Glycemic Control. *EBioMedicine*. 2016;11:101-117.
- 32.** Wang Y, Kumar N, Nuhant P, Cameron MD, Istrate MA, Roush WR, et al. Identification of SR1078, a synthetic agonist for the orphan nuclear receptors ROR α and ROR γ . *ACS Chem Biol*. 2010;5(11):1029-34.
- 33.** Ameer F, Scandiuzzi L, Hasnain S, Kalbacher H, Zaidi N. De novo lipogenesis in health and disease. *Metabolism*. 2014;63(7):895-902.
- 34.** Jaldin-Fincati JR, Pavarotti M, Frendo-Cumbo S, Bilan PJ, Klip A. Update on GLUT4 Vesicle Traffic: A Cornerstone of Insulin Action. *Trends Endocrinol Metab TEM*. 2017;28(8):597-611.
- 35.** Warfel JD, Vandanmagsar B, Dubuisson OS, Hodgeson SM, Elks CM, Ravussin E, et al. Examination of carnitine palmitoyltransferase 1 abundance in white adipose tissue: implications in obesity research. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2017;312(5):816-837.
- 36.** Kadiri S, Monnier C, Ganbold M, Ledent T, Capeau J, Antoine B. The nuclear retinoid-related orphan receptor- α regulates adipose tissue glyceroneogenesis in addition to hepatic gluconeogenesis. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2015;309(2):E105-114.