

# **CONTRIBUCIÓN DE NUEVOS DETERMINANTES DE LA MATRIZ EXTRACELULAR Y LA FIBROSIS EN LA FISIOPATOLOGÍA DEL TEJIDO ADIPOSO**

## **ALUMNADO**

Alcaide-Puerto, N.<sup>1</sup>, Buciegas-Quiles, S.<sup>2</sup>, López-Pérez, L.<sup>2</sup>, Molina-Bravo, A.<sup>2</sup>,  
Olmo-Agudo, P.<sup>1</sup>, Peno-Montes, M.A.<sup>1</sup>, Puerto-Nieto, J.<sup>1</sup>  
Serrano-Abad, P.<sup>2</sup>

## **INVESTIGADORES**

Mateo-Fernández, M.<sup>2</sup>, Tercero-Alcaraz, C.<sup>3</sup>

## **CENTROS**

1. IES Fidiana
2. CES Lope de Vega SCA
3. Departamento de Biología Celular, Fisiología e Inmunología Grupo GC11.  
Metabolismo y diferenciación adipocitaria. Síndrome metabólico

Investigador Principal: Carmen Tercero-Alcaraz  
*Instituto Maimónides de Investigación Biomédica de Córdoba (IMIBIC)*

Profesor/Tutor: Marcos Mateo-Fernández  
*CES Lope de Vega SCA, Córdoba*

Curso 2021/2022

Abril de 2022





## INDEX

<b>RESUMEN</b> .....	<b>1</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>2</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>2</b>
<b>2. ANTECEDENTES/FUNDAMENTOS TEÓRICOS</b> .....	<b>4</b>
2.1. Componentes celulares del tejido adiposo.....	4
2.2. Remodelación del tejido adiposo en obesidad.....	6
<b>3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b> .....	<b>7</b>
<b>4. PLANIFICACIÓN DE LAS SESIONES</b> .....	<b>8</b>
<b>5. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>8</b>
5.1. Línea celular 3T3 y Cultivos 3D .....	8
5.2. Diferenciación en adipocitos .....	10
5.3. Estudio de microscopía de microscopía confocal .....	11
5.3.1. Tinción de Oil-Red.....	11
5.4. Análisis estadístico.....	12
5.5. Diseño experimental.....	12
<b>6. RESULTADOS</b> .....	<b>13</b>
6.1. Recogida de datos .....	13
6.2. Estudio estadístico.....	14
<b>7. CONCLUSIÓN</b> .....	<b>14</b>
<b>8. AGRADECIMIENTOS</b> .....	<b>15</b>
<b>9. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>15</b>

## **CONTRIBUCIÓN DE NUEVOS DETERMINANTES DE LA MATRIZ EXTRACELULAR Y LA FIBROSIS EN LA FISIOPATOLOGÍA DEL TEJIDO ADIPOSEO**

Alcaide-Puerto, N.<sup>1</sup>, Buciegas-Quiles, S.<sup>2</sup>, López-Pérez, L.<sup>2</sup>, Molina-Bravo, A.<sup>2</sup>, Olmo-Agudo, P.<sup>1</sup>, Peno-Montes, M.A.<sup>1</sup>, Puerto-Nieto, J.<sup>1</sup>, Serrano-Abad, P.<sup>2</sup>, Mateo-Fernández, M.<sup>2</sup>, Tercero-Alcaraz, C.<sup>3</sup>

### **RESUMEN**

La obesidad se caracteriza por una acumulación de grasa en el tejido adiposo formando adipocitos que tienen la capacidad de expandirse controlando la homeostasis energética. Esta capacidad de expansión puede verse limitada en la obesidad por procesos como la fibrosis llegando a originar patologías como la insulinoresistencia. Por lo tanto, nuestro estudio se basa en la idea de que un componente de la matriz extracelular como lumican podría tener una función clave en la disfunción del tejido adiposo y por tanto, podría ser un factor importante en el desarrollo de enfermedades metabólicas asociadas a obesidad como la insulinoresistencia. Para ello, sembraremos la línea celular 3T3-L1 en un cultivo 3D de elaboración propia permitiendo desarrollar las condiciones asociadas a la obesidad y resistencia a la insulina. Posteriormente, esta línea celular, será diferenciada por adipogénesis a adipocito para analizar la interacción extracelular con los adipocitos de tal manera que unos cultivos 3D poseerán colágeno en su matriz y otros colágeno y lumican. Una vez se establecieron los adipocitos en el cultivo, se procedió a su tinción con NILE-RED y con DAPI para observar al microscopio confocal tanto las gotas lipídicas como el núcleo celular para poder identificar el tamaño de la gota de grasa por célula. Una vez cuantificada la cantidad de lípidos por célula se procedió a realizar el estudio estadístico mediante una prueba T-student para comparar la cantidad de lípidos por célula en presencia o ausencia de lumican en su matriz extracelular. Nuestros resultados demuestran que existe un menor porcentaje de lípidos en las células testadas en presencia de Lumican con respecto a las células control sin lumican en su matriz extracelular. Por lo tanto, dichos resultados apoyan la idea de que el desequilibrio en la concentración de lumican como ocurre en obesidad e insulinoresistencia podría contribuir a los efectos patogénicos de la fibrosis sobre la función de los adipocitos.

**PALABRAS CLAVE:** adipocito, cultivo 3D, lumican, matriz extracelular, obesidad, insulinoresistente.

## ABSTRACT

Obesity is characterized by an accumulation of fat in adipose tissue, producing adipocytes that have the ability to expand, managing energy homeostasis. This expansion capacity can be limited in obesity by several processes such as fibrosis, leading to pathologies such as insulin resistance. Therefore, our study is based on the idea that a component of the extracellular matrix such as lumican could play a key role in adipose tissue dysfunction and, therefore, could be an important factor in the development of obesity-associated metabolic diseases, such as insulin resistance. Thus, it was cultivated 3T3-L1 cell line in an appropriate 3D culture allowing the development of conditions associated with obesity and insulin resistance. Then, this cell line was differentiated by adipogenesis into an adipocyte to analyze the extracellular interaction with adipocytes in presence of collagen in their matrix or in presence of collagen and lumican. Once the adipocytes were established in the culture, they were stained with NILE-RED and DAPI to observe both the lipid droplets and the cell nucleus under a confocal microscope in order to identify the size of the fat droplet per cell. Once the amount of lipids per cell was quantified, the statistical study was carried out using a T-student test to compare the amount of lipids per cell in the presence or absence of lumican in its extracellular matrix. Our results show that there is a lower percentage of lipids in the cells tested in the presence of lumican compared to control cells without lumican in their extracellular matrix. Therefore, these results support the idea that lumican concentration imbalance, as occurs in obesity and insulin resistance, could contribute to the pathogenic effects of fibrosis on adipocyte function.

KEYWORDS: adipocyte, 3D culture, lumican, extracellular matrix, obesity, insulin resistance.

## 1. INTRODUCCIÓN

La obesidad es una enfermedad de etiología multifactorial que está en continuo crecimiento llegando a constituir un grave problema a nivel mundial (Seger *et al.*, 2014) tanto en países desarrollados como en los países en vías de desarrollo. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) en 2014, el 39% de las personas adultas en todo el mundo de 18 o más años tenían sobrepeso, y el 13% eran obesas (OMS, <http://who.int/es/>). Además, este fenómeno está afectando cada vez en mayor medida a niños (Daniels *et al.*, 2009).

Se trata de una patología caracterizada por el exceso o acumulación de grasa corporal, la cual puede estar asociada a efectos muy negativos tanto física como

mentalmente e incluso en los últimos años la tasa de mortalidad ha aumentado debido a la misma; esto último se debe a que aquellas personas que la sufren ven disminuida su esperanza de vida por las diferentes enfermedades y trastornos a los que la obesidad suele estar asociada. Este exceso de grasa, producido principalmente por un desajuste entre la ingesta de calorías y el gasto energético siendo la ingesta de calorías notablemente superior, se acumula en el tejido adiposo (formado por adipocitos) cuya función principal es la de almacenar estas grasas.



**Ilustración 1.** Desajuste calórico que provoca la pérdida o ganancia de peso.

Además, el tejido adiposo (TA) también cumple una importante función como órgano endocrino, interviniendo en la homeóstasis energética, y como aislante térmico del cuerpo así como actuar de protector de los órganos frente a choques y daños mecánicos. Debido a que es el principal órgano de almacenamiento y gestión de la energía, posee una capacidad de expansión superior a la gran mayoría de las demás células que podemos encontrar en nuestro organismo. Sin embargo, esta capacidad de expansión se ve limitada por procesos que se alteran en obesidad, como la adipogénesis, lipogénesis, muerte celular y fibrosis, provocando el desarrollo de patologías entre las que se incluyen la insulinoresistencia (Virtue y Vidal-Puig, 2010).

La fibrosis consiste en una acumulación excesiva de los componentes de la matriz extracelular, en especial, el colágeno. Y, en el tejido adiposo de personas que presentan obesidad, hay muchas más áreas fibrosadas que están asociadas con la reducción de la plasticidad provocando disfuncionalidad metabólica.

En la actualidad, existen diversos tratamientos para la obesidad. Por un lado, tenemos el aspecto psicológico de la enfermedad donde intentar cambiar y mejorar los hábitos de vida por unos más saludables sería un buen comienzo y a veces suficiente. En ocasiones, este cambio en el estilo de vida debe ser apoyado por una

intervención psicológica con ayuda de especialistas en la materia. Por otro lado, existen las terapias farmacológicas, diana de muchos de los ensayos y experimentos realizados por científicos. Para ello, necesitamos profundizar en el conocimiento de los procesos fisiológicos que rodea a la adipogénesis, lipogénesis, y la función de la matriz extracelular, entre otros. Por último, otra posible solución sería la cirugía bariátrica., que se realiza cuando las otras no han resultado efectivas y en caso de obesidad extrema.

## 2. ANTECEDENTES/FUNDAMENTOS TEÓRICOS

### 2.1. Componentes celulares del tejido adiposo

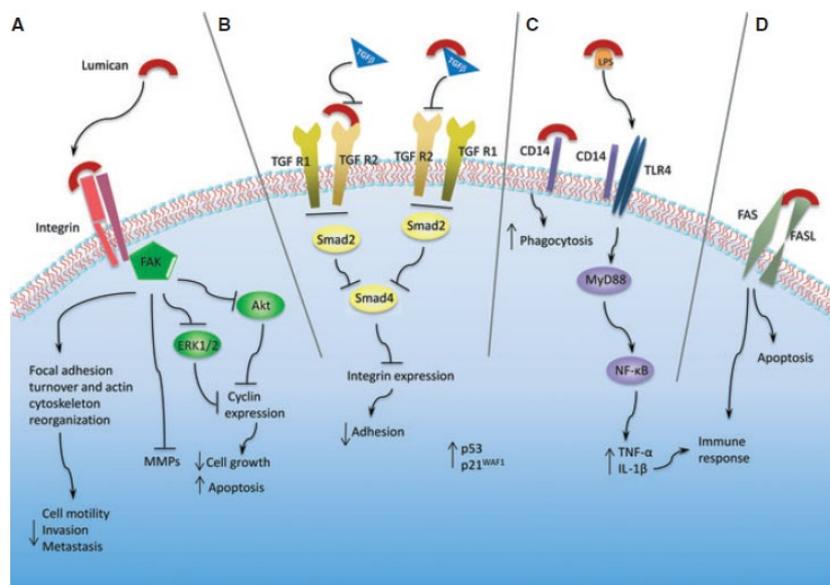
El TA está formado por los adipocitos maduros y la denominada *fracción de estroma vascular* (FEV). Los adipocitos del TA son células muy grandes que pueden alcanzar un diámetro de 20-200  $\mu\text{m}$ , y que presentan una única gota lipídica que ocupa la mayor parte del citoplasma y desplaza el núcleo hacia la periferia. La principal función de los adipocitos es almacenar la grasa en forma de energía pero también de secretar adipoquinas (Sik *et al.*, 2016). Los adipocitos se encuentran rodeados por una matriz de tejido conectivo (ECM) que contiene la FEV (Napolitano., 1963; Chun *et al.*, 2006), la cual incluye células madre mesenquimales, preadipocitos, tejido nervioso, células del sistema inmune y vasos (Frayn *et al.*, 2003). Además de los adipocitos, la FEV también puede contribuir a la secreción de péptidos y proteínas del tejido adiposo (Alvarez *et al.*, 2007). Además, las células madre mesenquimales y preadipocitos renuevan las células maduras del tejido mediante el proceso de adipogénesis (Rodeheffer *et al.*, 2008).

La función de la ECM no es únicamente proporcionar un soporte mecánico para los adipocitos, sino que también regula procesos fisiológicos y patológicos que intervienen en la remodelación del TA a través de la modulación de sus componentes, permitiendo acomodar el crecimiento de los adipocitos (Khan *et al.*, 2009).

La ECM del TA incluye varios tipos de colágeno (I, IV, VI) y otras proteínas de la matriz [laminina, fibronectina, calreticulina y proteoglicanos (PG)] (Mariman y Wang., 2010). La mayoría de las propiedades físicas de la ECM son dependientes de la correcta formación de las fibrillas de colágeno (fibrillogénesis), en la que intervienen un gran número de factores entre los que destacamos los PG (Neame *et al.*, 2000). Los PG son una familia de proteínas que contienen un núcleo proteico al que se une al menos un glucosaminoglicano, jugando un papel importante en la fisiología y función biomecánica de tejidos y órganos a través de su participación en el montaje y mantenimiento de la ECM. Además, participan en la proliferación celular a través de interacciones con factores de crecimiento (Yoon, Halper., 2005; Iozzo., 1998). Los PG se dividen en dos grandes grupos de pequeños y grandes PG. Los pequeños son conocidos como PG ricos en leucina (SLRPs), entre los que se encuentran biglicano,

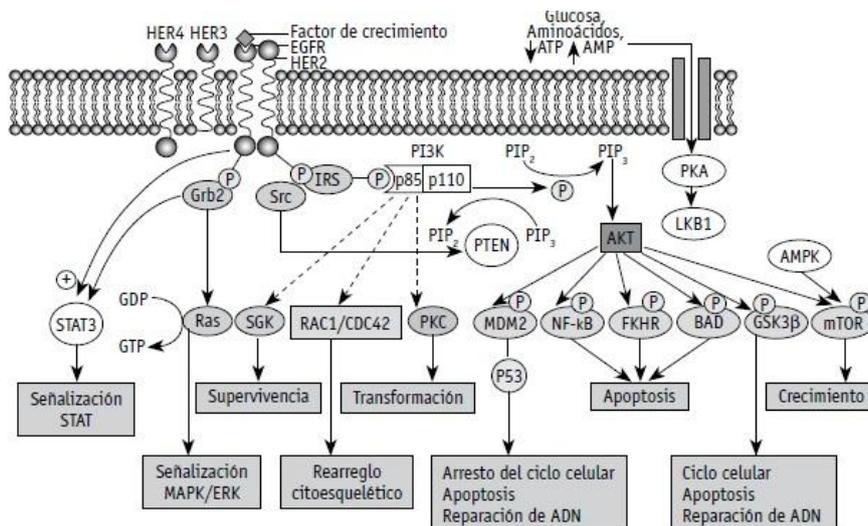
decorina y lumican (LUM) que regulan la fibrillogénesis de colágeno delimitando el grosor de las fibrillas (Halper., 2014; Nikitovic *et al.*, 2008; Neame *et al.*, 2000). Dicha función se lleva a cabo a nivel extracelular, donde interactúan con el colágeno.

Además de modular la fibrillogénesis, LUM también se ha relacionado con otras funciones tales como la infiltración y migración de las células inflamatorias (Lee *et al.*, 2009; Lorh *et al.*, 2012), así como con la regulación de la contractilidad y activación de los fibroblastos (Liu *et al.*, 2013) a través de  $\beta 1$ -integrina (Liu *et al.*, 2013; lee *et al.*, 2009; Nissinen *et al.*, 2012).



**Ilustración 2. Mecanismos de la acción de lumican (LUM) en la modulación de funciones celulares.** A) Interacción con integrina y la activación de vías de señalización a través de quinasas de adhesión focal (FAK). B) Interacción con TGF- $\beta$  y la regulación de la vía Smad, regulando la expresión de integrina. C) Interacción con CD14 en macrófagos favoreciendo la fagocitosis; Interacción con receptor tipo Toll (TLR) regulando la respuesta inmune. D) Interacción con el ligando de Fas-Fas, mediando la apoptosis y la respuesta inmune. Imagen tomada de Brezillon *et al* (2013).

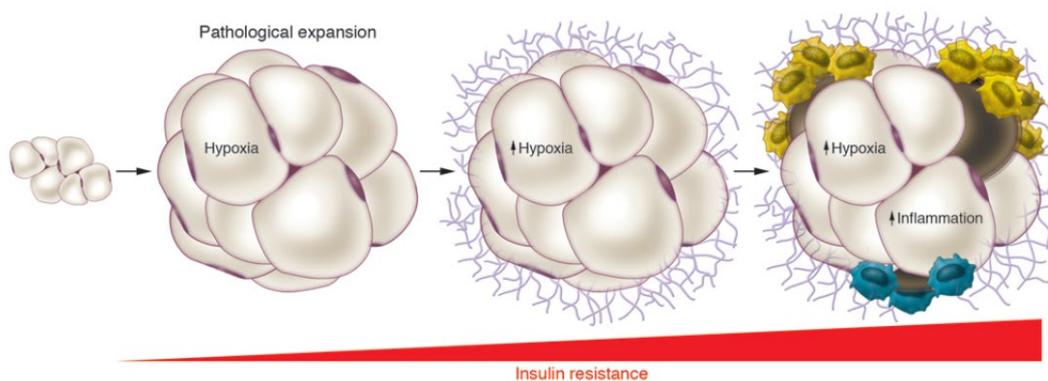
La unión de la ECM a las células requiere de proteínas de adhesión celular transmembrana que actúan como ligandos entre la ECM y el citoesqueleto de las células (Zong *et al.*, 2008). Los principales receptores que median esta unión son las integrinas, una familia de proteínas heterodiméricas (subunidad  $\alpha$  y  $\beta$ ) transmembrana (Humphries., 2000; Giancotti., 1999) que actúan como receptores (Velling *et al.*, 2004). Varios estudios han sugerido una importante relación entre la ECM y la señalización de la insulina mediada por integrinas (Guilheme *et al.*, 1998; Delcommenne *et al.*, 1998), a través de la fosforilación de IRS (Receptor insulina sustrato), estimulando la síntesis de glucógeno, transportadores de glucosa, y la reorganización del citoesqueleto (Huang *et al.*, 2006).



**Ilustración 2. Activación de la ruta de los receptores tirosina quinasa a través de Integrina. La fosforilación de IRS activa una cascada de señalización intracelular. Imagen tomada de Pinzón (2009).**

## 2.2. Remodelación del tejido adiposo en obesidad

El TA responde rápida y dinámicamente a las alteraciones en el exceso de ingesta de nutrientes mediante dos mecanismos que aumentan la cantidad del TA: la hipertrofia (aumento del volumen de los adipocitos) y/o hiperplasia (aumento del número de adipocitos), cumpliendo así su función principal en la regulación de la homeostasis energética (Sun *et al.*, 2011). La remodelación del TA es un proceso continuo que se acelera patológicamente en el estado de obesidad, ocasionando reducción en la remodelación angiogénica, sobreproducción de ECM, y una elevada tasa de infiltración de células inmunes con la consecuente respuesta pro-inflamatoria característica de la obesidad (Sun *et al.*, 2014). Sin embargo, no toda la expansión del TA está necesariamente asociada con cambios patológicos. El concepto de “obesos metabólicamente sanos” (Ruderman *et al.*, 1981) sugiere que algunos individuos pueden presentar una expansión del TA sin las consecuentes patologías asociadas con la obesidad (Unger *et al.*, 2010).



**Ilustración 3. Expansión patológica del tejido adiposo (TA) consistente en el aumento de los adipocitos con angiogénesis limitada y acumulación de macrófagos dando lugar a un fenotipo inflamatorio que se asocia a insulinoresistencia (IR). Imagen tomada de Sun K *et al.* (2014).**

Durante la expansión del TA, la ECM se remodela activamente para acomodarse al crecimiento, demostrándose que en obesidad, algunos de sus componentes están aumentados, principalmente colágeno I, IV y V (Khan *et al.*, 2009; O'Hara A *et al.*, 2009; Catalan *et al.*, 2012). La acumulación en exceso de componentes de la ECM del TA, definida como fibrosis, está asociada con la reducción de la plasticidad provocando disfuncionalidad metabólica (Sun *et al.*, 2011). Sun y colaboradores demostraron que el debilitamiento de la ECM que rodea al TA por eliminación del colágeno tipo VI mejora las tasas de supervivencia de los adipocitos (Sun *et al.*, 2011) y produce mejoras en el metabolismo (Khan *et al.*, 2009). Además, se ha observado una correlación entre niveles elevados de colágeno tipo IV e hiperglucemia y IR (Berria *et al.*, 2006; Muona *et al.*, 1993).

También se ha visto que la inflamación característica de la obesidad desencadena un aumento en la producción y deposición de ECM en el TA (Divoux *et al.*, 2010). En este contexto, se ha sugerido que , el aumento de LUM posiblemente contribuya al desarrollo y mantenimiento de la fibrosis mediante su acción sobre la fibrilogénesis (Neamea *et al.*, 2000). En lesiones fibróticas, la ECM aumenta su rigidez lo que, a su vez, incrementa la proliferación de fibroblastos y aumenta aún más la deposición de ECM (Friedman *et al.*, 2013; Bonnans *et al.*, 2014). Tam y sus colaboradores sugieren que la remodelación del colágeno en el TA y la IR están claramente vinculadas, y que esta inducción de la ECM puede ser el resultado de la adaptación del TA a este cuadro clínico (Tam *et al.*, 2010), limitando la expansión de los adipocitos (Sun *et al.*, 2013).

Atendiendo a lo anteriormente descrito, se ha observado que, en obesidad, se produce una alteración en los componentes de la ECM, dando lugar a la aparición de fibrosis, y al desarrollo de enfermedades metabólicas en obesidad. En este sentido el grupo de Adipobiología ha realizado un estudio previo de proteómica cuantitativa (2D-DIGE) en TA SC y OM en pacientes normoglucémicos (NG) e IR, con el fin de identificar posibles dianas terapéuticas asociadas a la obesidad y la IR. Los resultados obtenidos muestran alteraciones de diversas proteínas de la ECM, como colágeno tipo VI, que aumenta en el TA SC de pacientes IR vs NG, y LUM, que disminuye en pacientes IR vs NG en TA OM.

### 3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

En conjunto, estos resultados y los publicados por otros autores, sugieren que hipoteticemos que LUM podría tener una función clave en la disfunción del TA y por tanto, podría ser un factor importante en el desarrollo de enfermedades metabólicas asociadas a obesidad.

Por lo tanto, el objetivo principal de nuestra investigación será analizar la interacción extracelular con los adipocitos por medio del desarrollo de un sistema de cultivos 3D que permita desarrollar las condiciones asociadas a la obesidad y resistencia a la insulina.

Otros objetivos alcanzados en este proyecto son:

- Aprender los fundamentos de la microscopía confocal
- Profundizar en las aplicaciones básicas de marcaje
- Realizar la práctica y conocer los materiales de laboratorio .
- Cuantificar imágenes y análisis de resultados .

#### 4. PLANIFICACIÓN DE LAS SESIONES

Se trabajó durante cuatro sesiones:

Sesión 1 16/02/22 : Presentación institucional del IMIBIC y visita a las instalaciones del grupo "GC11 Metabolismo y diferenciación adipocitaria". Síndrome metabólico", del IMIBIC. Presentación de las normas de laboratorio, objetivos del proyecto e introducción a la obesidad y los efectos patogénicos de la fibrosis sobre la función de los adipocitos.

Sesión 2 16/03/22 : Aprender los fundamentos de la microscopía confocal, la microscopía de fluorescencia y sus aplicaciones. Profundizar en las aplicaciones básicas de marcaje, así como las correspondientes técnicas de marcaje fluorescente utilizadas para este proyecto (Nile Red y DAPI). Práctica de laboratorio Tinción Oil Red O y conocimientos del material de laboratorio .

Sesión 3 30/03/22 : Cuantificación de las imágenes y análisis de resultados. Realización de gráficas y estudios estadísticos.

Sesión 4 20/04/22 : Asesoramiento sobre la elaboración de un póster científico (estructura, número de elementos gráficos, colores, letra).

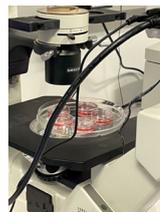
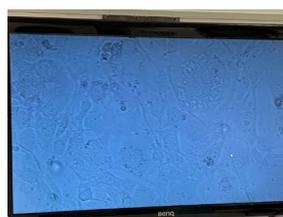
#### 5. MATERIALES Y MÉTODOS

##### *5.1. Línea celular 3T3 y Cultivos 3D*

El cultivo 3D nos permite mimetizar las condiciones asociadas a obesidad y resistencia a la insulina. Para llevar a cabo los cultivos 3D, se preparó en primer lugar una solución de colágeno (3,6 mg/mL) a partir de una solución stock de colágeno tipo

I (5 mg/mL) [3D Culture collagen (Rat tail), Cultex] previamente neutralizada y diluida en medio de cultivo manteniendo las siguientes proporciones en relación al volumen de Col-I: 1/4 de DMEM y 1/8 tampón HEPES (0,24 g/L). La solución de DMEM contiene las células 3T3-L1 en suspensión a una densidad de  $10^5$  células/mL (recuperadas de los cultivos iniciales a 70-80% de confluencia). En algunos experimentos, se añadió lumican (Recombinant Human Lumican, RD Systems) a la solución anterior, quedando este PG a una concentración final de 30 ng/mL.

Inmediatamente tras su preparación, se añadió un volumen final de 200  $\mu$ L de matriz por pocillo (placas de 24 pocillos), que se repartieron para cubrir el fondo del pocillo de forma homogénea. Las placas se incubaron a 37°C, durante 45 min para la gelificación de la matriz de colágeno. Pasado este tiempo, se añadió 1 mL de DMEM/pocillo y las placas se mantuvieron durante 4 días a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> para la estabilización de las células. El proceso de adipogénesis se llevó a cabo siguiendo el protocolo descrito a continuación, hasta el día 10, cambiando el 50% del medio por medio DMEM+10% FBS fresco cada 48 h.



*Ilustración 5. Fotografía representativa de adipocitos observados al microscopio y de una placa de cultivo.*

### ***Materiales empleados***

Estos cultivos tridimensionales son generalmente cultivados en biorreactores, pequeñas cápsulas en las cuales las células pueden crecer en esferoides o en colonias 3D.

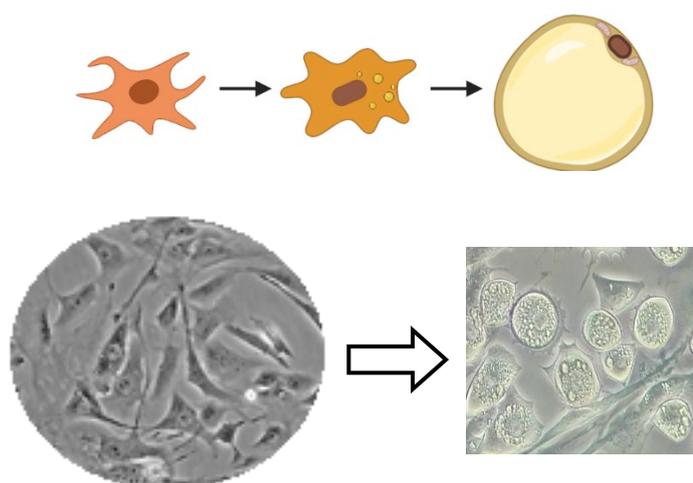
La línea celular consiste en células de un tipo único (humano, animal o vegetal) que se han adaptado para crecer continuamente en el laboratorio y que se usan en investigación.

El cultivo de adipocitos 3T3-L1 en matrices de colágeno (hidrogeles), con o sin lumican.

## 5.2. Diferenciación en adipocitos

El cultivo 3D mediante el uso de matrices de colágeno permite el crecimiento de fibroblastos y su posterior diferenciación en adipocitos maduros incluyendo el componente extracelular.

La adipogénesis es el proceso durante el cual las células, inmaduras (no especializadas) adoptan las características individuales y alcanzan su forma y función maduras (especializadas).



**Ilustración 6.** diferenciación de fibroblasto a adipocito.

### **Materiales empleados**

Los fibroblastos se diferenciaron a adipocitos mediante la administración de un cóctel hormonal. Para ello, las células se incubaron con medio de diferenciación 1 [día 0; DMEM con 4.5 g/L de glucosa suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS), 0.01 mg/mL de insulina, 41 mM IBMX (3-Isobutyl-1-methylxanthine) y 600  $\mu$ M Dexametasona]. Pasados 3 días, el medio fue reemplazado por medio de diferenciación 2 (DMEM con 4.5 gr de glucosa/L suplementado con 10% de FBS y 0.01 mg/mL de insulina), que se mantuvo nuevamente durante 3 días. Pasado dicho tiempo (día 6), las células se cultivaron con DMEM suplementado con 10% de FBS, hasta alcanzar el día 10 de diferenciación.

### 5.3. Estudio de microscopía de microscopía confocal

Se realizó un estudio de microscopía confocal en adipocitos 3T3-L1 diferenciados hasta día 10 en la matriz 3D de Col-I (3,6 mg/mL), sembrados sobre cubreobjetos (105/mL) para detectar la presencia de lípidos neutros, componente principal de la gota lipídica de los adipocitos, mediante el uso de la tinción Nile Red (Sigma). Al final de la diferenciación, las células en los cubreobjetos se fijaron con paraformaldehído al 4% (m/v) durante 15 min, a temperatura ambiente. Posteriormente, se lavaron 3 veces en PBS (0,01 M, pH 7,4) y se procedió a la tinción con el reactivo Nile Red (1 mg/mL metanol) diluido 1/1000 en tampón PBS durante 15 min, tras lo cual se realizaron nuevamente 3 lavados en PBS. Tras el último lavado, las muestras se prepararon para su observación mediante microscopía confocal añadiendo a cada pocillo 20  $\mu$ l de medio de montaje DAKO (Dako North America, CA) y DAPI (1 $\mu$ g/mL) (Sigma) para marcar los núcleos.

Las preparaciones fueron examinadas mediante microscopía confocal utilizando un equipo LSM 7 Exciter (Carl Zeiss). Las muestras fueron excitadas a 540 nm y se recogió la emisión 535 nm. Se adquirieron entre 3 y 5 planos focales por cada canal y la cantidad de lípidos de las imágenes se analizó utilizando el software ImagenJ 1.5 (NIH).

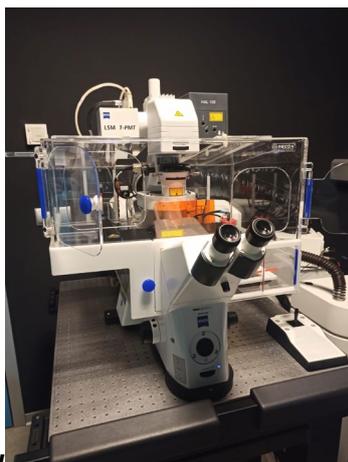


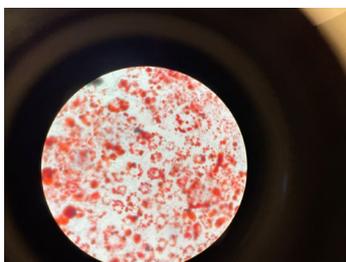
Ilustración 1. Microscopio confocal

#### 5.3.1. Tinción de Oil-Red

La tinción de Oil Red O (rojo aceite O) es un colorante lipófilo que, debido a su comportamiento en solución, difunde hacia los lípidos de la muestra y se utiliza para la detección de grasas neutras como los triglicéridos, que forman las gotas lipídicas de los adipocitos. La presente solución de Oil Red O está lista para ser usada y

proporciona una intensa y luminosa coloración en rojo de los lípidos, mientras que los núcleos celulares son contra teñidos en azul por medio de una solución de DAPI (un marcador fluorescente que se une fuertemente a regiones enriquecidas en adenina y timina en secuencias de ADN).

Para el ensayo de Oil Red O es necesario sembrar con adipocitos 3T3-L1 una placa de cultivo con un portaobjetos en el fondo del pocillo, para que las células se adhieran y poder observarlas al microscopio posteriormente.



**Ilustración 8.** Imagen al microscopio óptico de un cultivo de adipocitos teñidos de rojo.

#### **5.4. Análisis estadístico**

En este estudio se comparó únicamente dos grupos experimentales, y se utilizó una prueba *t* de Student. Los valores representan la media  $\pm$  SEM (error estándar de la media). Los análisis estadísticos y los gráficos se realizaron con el programa GraphPad Prism 5.0. Las diferencias entre los grupos experimentales se consideraron estadísticamente significativas a partir de un nivel de confianza superior al 95% ( $P < 0,05$ ).

#### **5.5. Diseño experimental**

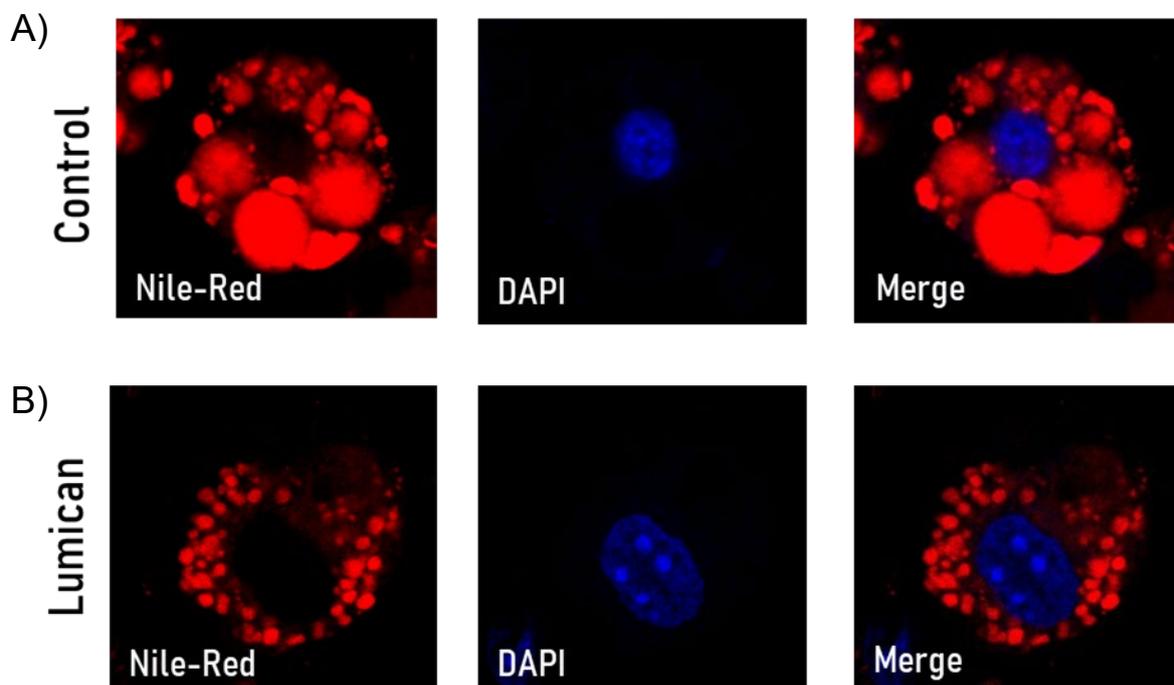
Para esta investigación, sembraremos la línea celular 3T3-L1 en un cultivo 3D de elaboración propia permitiendo desarrollar las condiciones asociadas a la obesidad y resistencia a la insulina. Posteriormente, en la línea celular, será diferenciada por adipogénesis a adipocito para analizar la interacción extracelular con los adipocitos de tal manera que unos cultivos 3D poseerán colágeno en su matriz y otros colágeno y lumican. Una vez se establecieron los adipocitos en el cultivo, se procedió a su tinción con NILE-RED y con DAPI para observar al microscopio confocal tanto las gotas lipídicas como el núcleo celular para poder identificar el tamaño de la gota de grasa por célula. Una vez cuantificada la cantidad de lípidos por célula se procedió a realizar un estudio estadístico mediante una prueba T-student para saber la cantidad de lípidos por célula en presencia o ausencia de lumican en su matriz extracelular. Los resultados demuestran que existe un menor porcentaje de lípidos en las células testadas en presencia de Lumican con respecto a las células control sin

lumican en la matriz extracelular. Por lo tanto, los resultados apoyan la idea de que el desequilibrio en la concentración de lumican como ocurre en obesidad e insulinoresistencia podría contribuir a los efectos patogénicos de la fibrosis sobre la función de los adipocitos.

## 6. RESULTADOS

### 6.1. Recogida de datos

Para la obtención de resultados, comenzamos con la cuantificación de las imágenes de nuestras dos células: una control y otra en presencia de Lumican. De cada célula se cuantifican tres variables con sus correspondientes tinciones (DAPI para el núcleo celular y Nile-Red para los lípidos). Para ello empleamos "IMAGE J".

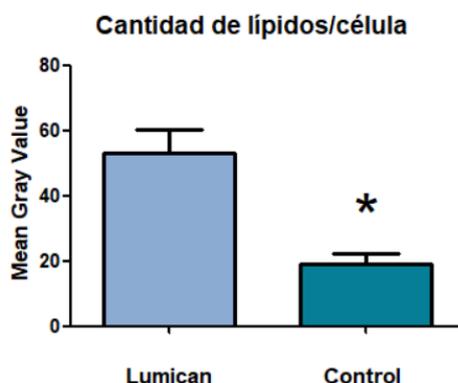


**Figura 1:** Líneas celulares testadas, (A) En presencia de Lumican, (B) Control

Posteriormente, los datos obtenidos fueron trasladados a un Excel, que nos facilitó el paso de variables hacia nuestro siguiente procedimiento, la creación de un gráfico de barras representativo. Insertamos las cifras previamente obtenidas en el programa "GraphPad Prism", que finalmente dio paso a nuestro estudio estadístico.

## 6.2. Estudio estadístico

Tras el análisis de las variables obtenidas, se observa un menor porcentaje de lípidos en las células testadas en presencia de Lumican.



**Figura 2:** Gráfica representativa de la presencia de lípidos en dos distintas líneas celulares

La existencia de esta proteína en la matriz extracelular, apenas conlleva una acumulación de lípidos frente a la que poseen las células control. Como consecuencia, se plantea la hipótesis de que los pacientes que no acumulan lípidos en sus células, los acumulan en otros órganos de su cuerpo, dando lugar a una enfermedad.

## 7. CONCLUSIÓN

En conjunto, los resultados obtenidos en el presente trabajo indican que:

1. El cultivo 3D mediante el uso de matrices de colágeno permite el crecimiento de fibroblastos y su posterior diferenciación en adipocitos maduros incluyendo el componente extracelular, que está ausente en modelos convencionales (2D).
2. La combinación de matrices de colágeno junto con PGs, como lumican, permiten generar modelos 3D modulables que permitan reproducir, en parte, las condiciones fisiopatológicas y estudiar el impacto que ejerce la matriz extracelular sobre la función celular en patologías como la fibrosis.
3. Altas concentraciones de lumican, como ocurre en el tejido adiposo de individuos obesos con resistencia a insulina, altera la acumulación de lípidos en los adipocitos.

Nuestros resultados apoyan la idea de que el desequilibrio en la concentración de lumican como ocurre en obesidad e insulinoresistencia podría contribuir a los efectos patogénicos de la fibrosis sobre la función de los adipocitos.

## 8. AGRADECIMIENTOS

Damos las gracias a todas las personas e instituciones que han hecho posible la realización de este trabajo. En especial al IES Fidiana y al CES Lope de Vega por darnos esta oportunidad, y entre ellos a Elena (profesora del IES Fidiana) y a Marcos (profesor del CES Lope de Vega). También a nuestra investigadora Carmen Tercero, por permitirnos disponer de sus materiales, sus instalaciones y por dedicarnos un poco de su tiempo, y a Jose María por su atención en todo momento y su agradable trato hacia nosotros. Y por último, gracias a nuestros padres por confiar en nosotros y apoyarnos en todo momento.

## 9. BIBLIOGRAFÍA

Berria R, et al (2006). Increased collagen content in insulin-resistant skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 290(3):E560–E565.

Bonnans C, Chou J, Werb Z (2014). Remodelling the extracellular matrix in development and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 15(12):786–801.

Catalán V, Gómez-Ambrosi J, Rodríguez A y Frühbeck G (2012). “Role of extracellular matrix remodelling in adipose tissue pathophysiology: relevance in the development of obesity”. *Histol Histopathol.* 27:1515-1528.

Daniels SR, Jacobson MS, McCrindle BW, Eckel RH, Sanner BM (2009). American Heart Association Childhood Obesity Research Summit Report. *Circulation.* 119:e489-517.

Divoux A, Tordjman J, Lacasa D, Veyrie N, Hugol D, Aissat A, Basdevant A, Guerre-Millo M, Poitou C, Zucker J-D, others (2010). Fibrosis in human adipose tissue: composition, distribution, and link with lipid metabolism and fat mass loss. *Diabetes.* 59(11): 2817–2825.

Friedman SL, Sheppard D, Duffield JS, Violette S (2013). Therapy for fibrotic diseases: Nearing the starting line. *Sci Transl Med.* 5(167):167sr1.

Flegal K.M, Kit B.K, Orpana H y Graubard B.I (2013). "Association of all-cause mortality with overweight and obesity using standard body mass index categories: a systematic review and meta-analysis". *JAMA.* 309:71-82.

Frayn KN, Karpe F, Fielding BA, Macdonald IA, Coppack SW (2003). Integrative physiology of human adipose tissue. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 27:875-888.

Giancotti F. G, and Ruoslahti E (1999). Integrin signaling. *Science.* 285, 1028–1032.

Guilherme A, Virbasius JV, Puri V, Czech M P (2008). Adipocyte dysfunctions linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 9, 367-77.

Haihong Zong, Claire C. Bastie, Jun Xu, Reinhard Fassler, Kevin P. Campbell, Irwin J. Kurland, and Jeffrey E. Pessin (2008). Insulin Resistance in Striated Muscle-specific Integrin Receptor-deficient Mice. *JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY.*

Humphries, M. J (2000). Integrin structure. *Biochem. Soc. Trans.* 28: 311–339. Iozzo RV (1997). The family of the small leucine-rich proteoglycans: key regulators of matrix assembly and cellular growth. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 32: 141–174.

Iu SL, Cretu A, Razinia Z, Xu T, Puré E, Assoian RK (2014). AFAK-Cas-Rac-lamellipodin signaling module transduces extracellular matrix stiffness into mechanosensitive cell cycling. *Sci Signal.* Jun 17.7(330).

Khan T, et al (2009). Metabolic dysregulation and adipose tissue fibrosis: role of collagen VI. *Mol Cell Biol.* 29(6):1575–1591.

Lee HY, SW, JY, Park kw, Hwang CI, Park WY, oh Bh, Park YB, K, Seo JS, Kim HS (2008). FOXO3a turns the tumor necrosis factor receptor signaling towards apoptosis through reciprocal regulation of c-Jun N-Terminal kinase and NF- $\kappa$ B. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 28(1):112-20.

Lee S, Bowrin K, Hamad AR, Chakravarti S (2009). Extracellular matrix lumican deposited on the surface of neutrophils promotes migration by binding to beta2 integrin. *Journal of Biological Chemistry.* 284: 23662–23669.

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

Muona P, et al (1993). Hyperglycemic glucose concentrations up-regulate the expression of type VI collagen in vitro. Relevance to alterations of peripheral nerves in diabetes mellitus. *Am J Pathol.* 142(5):1586–1597.

Neame P.J, Kaya C.J, McQuillanc D.J, Beales M.P and Hassella J.R (2000). Independent modulation of collagen fibrillogenesis by decorin and lumican. *CMLS, Cell. Mol. Life Sci.* Vol. 57.

O'Hara A, Lim FL, Mazzatti DJ, Trayhurn P (2009). Microarray analysis identifies matrix metalloproteinases (MMPs) as key genes whose expression is up-regulated in human adipocytes by macrophage-conditioned medium. *Pflugers Arch.* 458(6):1103–1114.

Rodeheffer M. S, Birsoy K and Friedman J. M (2008). Identification of White adipocyte progenitor cells in vivo. *Cell*; 135, 240-9.

Ruderman NB, Schneider SH, Berchtold P (1981). The “metabolically-obese,” normal-weight individual. *Am J Clin Nutr.* 34(8):1617–1621.

Seger J.C, Horn D.B, Westman E.C, Lindquis, R, Scinta W, Richardson L.A, Primack C, Bryman D.A, McCarty W, Hendricks E, Sadowit, B.N, Schmidt S.L y Bays H.E (2014). “Obesity Algorithm”. American Society of Bariatric Physicians website: American Society of Bariatric Physicians.

Sik S Choe S, Young Huh J, Jae Hwang I, In Kim J, and Bum Kim J (2016). Adipose Tissue Remodeling: Its Role in Energy Metabolism and Metabolic Disorders. *Front Endocrinol (Lausanne).* 7: 30

Sun K, Kusminski C.M, and Scherer P.E (2011). Adipose tissue remodeling and obesity. *The journal of clinical investigation.*

Sun K, Tordjman J, Clément K, Scherer E (2013). Fibrosis and adipose tissue dysfunction. *Cell Metabolism.* 18 (4):470-477.

Tam C.S, Viardot A, Clement K, Tordjman J, Tonks K, Greenfield J.R, Campbell L.V, Samocho-Bonet D, and Heilbronn L.K (2010). Short-term overfeeding may induce peripheral insulin resistance without altering subcutaneous adipose tissue macrophages in humans. *Diabetes* 59, 2164–2170.

Unger RH, Scherer PE. Gluttony (2010). Sloth and the metabolic syndrome: a roadmap to lipotoxicity. *Trends Endocrinol Metab.* 21(6):345–352.

Velling T, Nilsson S, Stefansson A and Johansson S (2004).  $\beta$ 1-Integrins induce phosphorylation of Akt on serine 473 independently of focal adhesion kinase and Src family kinases. *EMBO reports* VOL 5; NO 9.

Virtue S y Vidal-Puig A (2010). "Adipose tissue expandability, lipotoxicity and the Metabolic Syndrome—an allostatic perspective". *Biochim Biophys Acta*. 1801:338-349.

Zhang Y-K, Zhang X-L, Yang S-L, Zhang Z-G (2013). Lumican Accelerates Wound Healing by Enhancing  $\alpha 2\beta 1$  Integrin-Mediated Fibroblast Contractility. *Plos one*.