

Cambios en el perfil proteómico de preadipocitos con diferentes condiciones metabólicas

Changes in the proteomic profile of preadipocytes with different metabolic status

Natalia R Moreno Castellanos¹

Forma de citar: Moreno-Castellanos N. Cambios en el perfil proteómico de preadipocitos con diferentes condiciones metabólicas. Rev Univ Ind Santander Salud. 51(4): 279-287. doi: <http://dx.doi.org/10.18273/revsal.v51n4-2019001> 

Resumen

Introducción y objetivos: El tejido adiposo subcutáneo se considera un depósito con un papel protector desde un punto de vista metabólico. El exceso de tejido adiposo desencadena en obesidad, la cual, está acompañada típicamente por resistencia a insulina, dislipidemia, e hipertensión arterial. No obstante, se conoce que existe un subgrupo de obesos que parecen estar protegidos de dichas complicaciones. Estos individuos son definidos como obesos sanos metabólicamente. A pesar de los avances en el conocimiento de las alteraciones que suceden en el tejido adiposo en obesidad, aún se desconocen los mecanismos que subyacen en el desarrollo de resistencia a insulina. Por lo tanto, en este trabajo, se estudió la asociación entre obesidad y desarrollo de enfermedad metabólica identificando factores y procesos que determinan la transición desde el fenotipo obeso sano y no sano, empleando preadipocitos provenientes de tejido adiposo subcutáneo. **Metodología:** Se emplearon datos de un estudio de proteómica comparada de preadipocitos de tejido subcutáneo obtenidos de pacientes obesos normoglucémicos no resistentes a insulina y de pacientes obesos con diabetes mellitus de tipo 2. El estudio proteómico, se llevó a cabo utilizando la técnica de iTRAQ combinada con LC-MSMS. **Resultados y conclusiones:** Las diferencias entre preadipocitos de tejido adiposo subcutáneo en sujetos normoglucémicos y con diabetes, afectan sobre todo a proteínas citosólicas y, en particular, a proteínas relacionadas con procesos metabólicos mientras que, las membranales no cambian entre fenotipos obesos. En el estudio se identificaron importantes diferencias en el perfil proteómico de los preadipocitos de tejido adiposo subcutáneo en obesidad, tanto en sujetos normoglucémicos como diabéticos, apoyando la importancia de estas células en el mantenimiento de la identidad del depósito graso. También se encontró que, la transición desde el fenotipo obeso sano hacia el no sano conlleva un mayor desarrollo de estrés oxidativo e inflamación en las células precursoras adipocitarias.

Palabras clave: Preadipocito; obesidad; proteómica; normoglucemia; diabetes; tejido adiposo subcutáneo.

1. Universidad Industrial de Santander. Bucaramanga, Colombia.

Correspondencia: Natalia Moreno-Castellanos. Dirección: Facultad de salud, carrera 32 No. 29-31, Ed. administrativo 1, Piso 1 Of. 205. Teléfono: +57 3222458530 Correo electrónico: Email: nrmorcas@uis.edu.co

Abstract

Introduction and objectives: The subcutaneous adipose tissue is considered as a depot with a protective role from a metabolic point of view. An excess of adipose tissue is triggered in obesity, which is accompanied by insulin resistance, dyslipidemia and arterial hypertension. However, it is known that, there is a subgroup of obese people who seem to be protected from obese complications. These individuals are defined as metabolically healthy obese. Despite the advances in the knowledge of the alterations that occur in adipose tissue during obesity, the mechanisms underlying the development of insulin resistance are still unknown. Therefore, in this work, we studied the association between obesity and the development of metabolic disease, we identified factors and processes that determined the transition of healthy and unhealthy obesity phenotype, using preadipocytes from subcutaneous adipose tissue. **Methods:** Data obtained from a comparative proteomics study of subcutaneous adipose tissue preadipocytes from normoglycemic obese patients-not resistant to insulin and from obese patients with type 2 diabetes mellitus were used. The proteomic study was carried out using the iTRAQ combined with LC -MSMS. **Results and conclusions:** The differences between pre-adipocytes of subcutaneous adipose tissue in normoglycemic subjects and with diabetes affect mainly cytosolic proteins and, in particular, proteins related to metabolic processes while, membrane proteins do not change between obese phenotypes. In this study, we identified significant differences in the proteomic profile of preadipocytes from subcutaneous adipose tissue in obesity in both, normoglycemic and diabetic subjects, supporting the importance of these cells in the maintenance of the fat depot identity. We also found that, the transition from unhealthy to healthy phenotype in obesity, leads to further development of oxidative stress and inflammation in adipocyte precursor cells.

Keywords: Preadipocyte; obesity; proteomic; normoglycemia; diabetes; subcutaneous adipose tissue.

Introducción

El tejido adiposo constituye el depósito energético más importante del organismo. Almacena el exceso energético en forma de triglicéridos (TAGs), que son liberados de forma controlada en condiciones de déficit de energía y utilizados por otros órganos y tejidos corporales. Además, constituye un sitio fundamental de utilización de glucosa, que es empleada para producir la energía necesaria para el metabolismo celular y para esterificar los ácidos grasos (AGs) con glicerol, formando así los TAGs^{1,2}. Destaca por otro lado su función endocrina³, llevada a cabo por medio de la producción de una enorme variedad de moléculas señalizadoras, las adipoquinas, que regulan desde la ingesta y la homeostasis energética hasta la reproducción, estableciendo también un importante diálogo con el sistema inmunitario y cardiovascular^{1,2}.

El tejido adiposo está constituido por adipocitos maduros, que representan el componente celular principal del mismo, y por la denominada Fracción de Estroma Vascular (FEV), siendo ambos componentes fundamentales para la función del mismo. La FEV está integrada por las Células Madre Mesenquimales (MSCs) y preadipocitos que permiten la renovación del tejido, así como terminaciones nerviosas, diversos tipos de células sanguíneas (macrófagos, linfocitos T y B, neutrófilos) y tejido vascular².

El tejido adiposo se distribuye en diferentes depósitos corporales, siendo los depósitos de Tejido Adiposo Visceral (TAV) y Subcutáneo (TASC) los más importantes. Ambos depósitos difieren en su distribución, sus propiedades moleculares, metabólicas y su perfil secretor².

En particular, el TASC, se localiza bajo la piel y a lo largo de todo el cuerpo, en condiciones normales, se caracteriza por mantener una elevada producción de adiponectina (con funciones insulino-sensibilizantes) y baja producción de citoquinas pro-inflamatorias (IL-6, TNF- α)⁴.

Actualmente se sabe que el incremento de tejido adiposo que se produce con la obesidad se suele asociar a resistencia a insulina, siendo esta un factor de riesgo independiente para el desarrollo de diabetes tipo 2, enfermedad cardiovascular, dislipemia, hipertensión (enfermedades y factores de riesgo del síndrome metabólico) y diferentes tipos de cáncer⁵. El aumento del tejido adiposo se produce por hiperplasia (generación de nuevos adipocitos a partir de precursores/preadipocitos como resultado del recambio de adipocitos tras la adolescencia) la cual se mantiene en individuos delgados y obesos en la edad adulta⁶ e hipertrofia (incremento de tamaño)⁷.

El TAV sufre una mayor infiltración de linfocitos y macrófagos que el TASC en la obesidad² de manera que la acumulación de TAV está estrechamente relacionada con el desarrollo de insulino-resistencia y enfermedad cardiovascular⁸. Por el contrario, el TASC se ha llegado a considerar un protector metabólico⁹.

La obesidad se considera hoy en día como un estado crónico de inflamación de bajo grado y de alteración del patrón de hormonas secretadas por el tejido adiposo, lo que explicaría la etiología del desarrollo de insulino-resistencia⁹. La inflamación asociada a la obesidad puede ser el detonante de diferentes procesos de estrés celular en el adipocito^{1,10} que frecuentemente desencadenan en resistencia a insulina, dislipidemia, e hipertensión arterial. No obstante, actualmente se sabe que existe un subgrupo de obesos (entre el 25-30%) que parecen estar protegidos frente a dichas complicaciones¹¹. A pesar de presentar un exceso de grasa corporal (índices de masa corporal superiores a 40 kg/m²), estos individuos, definidos como obesos metabólicamente sanos (MHO-*Metabolically Healthy Obese*), son sensibles a insulina, normoglucémicos, no son hipertensos y presentan perfiles inmunológicos, hormonales, de inflamación, de lípidos y de enzimas del hígado favorables, en contraposición con las personas obesas con enfermedad metabólica (MUHO-*Metabolically Unhealthy Obese*)^{12,13}.

A pesar de los avances recientes en el conocimiento de las alteraciones que suceden en el tejido adiposo en obesidad, aún no se conocen totalmente los mecanismos que subyacen en el desarrollo de resistencia a insulina en condiciones de obesidad en el tejido adiposo.

Teniendo en cuenta lo mencionado previamente, este artículo, pretende profundizar en el estudio de la asociación entre obesidad y desarrollo de enfermedad metabólica, principalmente en preadipocitos provenientes de TASC de sujetos obesos normoglucémicos (NG)/MHO y sujetos obesos con diabetes tipo 2 (DM)/MUHO, utilizando como punto de partida la identificación de los factores y procesos que determinan la transición desde el fenotipo MHO a MUHO en obesidad.

Materiales y metodos

Selección de pacientes y diseño del estudio

Se seleccionaron 12 pacientes obesos, a los que se les extrajeron muestras pareadas de Tejido Adiposo Subcutáneo (TASC) mediante cirugía bariátrica

(n=12). Se utilizaron dos grupos de estudio: I) Sujetos obesos normoglucémicos (NG) (n=6), con un nivel de glucosa en sangre en ayunas entre 70 y 100 mg / dl y un índice HOMA inferior a 3; y II) Sujetos obesos diabéticos (DM) (n=6), con un nivel de glucosa en sangre en ayunas mayor de 126 mg / dl y un índice HOMA superior a 3. Los sujetos con DM no estaban en tratamiento con insulina o medicación que pudiera afectar los parámetros bioquímicos.

Ensayos bioquímicos

Los ensayos bioquímicos y hormonales realizados en los sujetos del estudio se midieron como se describió previamente¹⁴ siguiendo los criterios de los fabricantes para los kits comerciales. Los parámetros bioquímicos y antropométricos de los sujetos que formaron parte del estudio se muestran en la **Tabla 1**. El índice de resistencia insulínica (HOMA-IR) fue calculado como (insulina*glucosa) /405.

Tabla 1. Características antropométricas y bioquímicas de los sujetos.

	NG	DM	P
N	6	6	
Sexo (hombre/mujer)	3/3	3/3	
Edad	34 ± 3,8	38,8 ± 3,5	0,67
Peso (kg)	129,3 ± 14,7	158 ± 8,6	0,39
Talla (cm)	168,7 ± 4,3	163,3 ± 9,1	0,60
IMC ^a	57,27 ± 3,8	60,4 ± 4,2	<0,0001
Glucosa (mg/dL)	94,3 ± 4,9	208,8 ± 13,4	<0,0001
Colesterol total (mg/dL)	183 ± 28,4	202,5 ± 11,6	0,53
HDLc ^b (mg/dL)	36,6 ± 1,9	27 ± 2,4	<0,05
LDLc ^c (mg/dL)	139,2 ± 24,7	111,5 ± 12,4	0,32
Triglicéridos (mg/dL)	117,7 ± 16,6	183,5 ± 18,6	
HbA1c ^d (%)	5,35 ± 1,6	13,3 ± 1,2	<0,0001
Insulina (mU/L)	10,8 ± 0,7	16,2 ± 2,5	<0,0001
HOMA-IR ^e	2,2 ± 0,4	6,8 ± 0,7	<0,0001

a) IMC: índice de masa corporal; b) HDLc: Colesterol lipoproteico de alta densidad.; c) LDLc: Colesterol lipoproteico de baja densidad; d) HbA1C: hemoglobina glicosilada; e) HOMA-IR: índice de resistencia insulínica. Los datos representan la media ± SEM. NG vs IR comparados por T-test.

Dispersión de tejido adiposo, separación de adipocitos maduros y de fracción de estroma vascular

La separación del tejido adiposo se realizó siguiendo el protocolo descrito previamente¹⁵. Para llevar a cabo los estudios, se recogieron muestras de TASC sumergiéndose en medio de cultivo estéril.

El tejido se cortó en trozos de aproximadamente 1-3 mm³ y se digirieron con colagenasa (10 µL/g de tejido adiposo) durante 1 h a 37°C en agitación. La suspensión celular se filtró a través de un filtro (tipo cell strainer) de 100 µm de poro, seguido por centrifugación (900 rpm durante 10 min). Al terminar la centrifugación, se recogió una capa blanca flotante correspondiente a los adipocitos maduros, los adipocitos maduros se congelaron en nitrógeno líquido y fueron almacenados a -80°C; por otro lado, el sedimento celular correspondiente a la fracción de estroma vascular (FEV) se resuspendió en 5 mL de medio de dispersión (DMEM/F-12 suplementado con biotina 16 µM, ácido ascórbico 100 µM, antibiótico/antimicótico pasándose posteriormente a través de un filtro de 40 µm de poro. Se centrifugó (950 rpm, 10 min) y el sedimento se trató durante 5 minutos con 500 µL de tampón de lisis de eritrocitos (RBC Lysis solution). Se realizó una nueva centrifugación (950 rpm, 10 min) para obtener los preadipocitos del tejido, resuspendiéndose el sedimento celular para sembrarse en frascos con medio de mantenimiento (DMEM/F-12 suplementado al 10% de suero fetal bovino (FBS) con glucosa al 17,5 mM, biotina 16 µM, ácido pantoténico 18 µM, antibiótico/antimicótico.

Cultivo de preadipocitos

Pasadas 48 horas de cultivo, el medio de cultivo fue remplazado por medio de mantenimiento, renovando el mismo cada dos o tres días hasta alcanzar confluencia (5-7 días). Una vez confluentes, se levantaron las células (preadipocitos) con tripsina-EDTA y se sembraron en placas de 35 mm a una densidad de 5.000 células/pocillo. Las células fueron cultivadas en medio de mantenimiento suplementado al 10% (v/v) de FBS durante 3 días hasta alcanzar confluencia para la realización de los ensayos posteriores.

Proteómica comparativa (iTRAQ)

Los preadipocitos obtenidos del cultivo de FEV fueron tratadas con urea 8 M, CHAPS 4%, Tris 30 mM, sonicadas y cuantificadas. Se adicionó ditiotretol (DTT) 2 mM y yodoacetamida (IAA) 7 mM para la reducción y alquilación. Cada grupo de muestras fue tratado con TCA y posteriormente fueron digeridas con tripsina 2%. Cada grupo fue marcado con su correspondiente reactivo de iTRAQ: iTRAQ 116 (muestras de sujetos NG) y iTRAQ 117 (muestras de sujetos DM), el protocolo se realizó según las instrucciones del fabricante. Posteriormente, las muestras fueron secadas y resuspendidas en fase de inyección y los extractos fueron diluidos con una mezcla de metanol 5% y ácido

fórmico 1% analizándose por LC-MS/MS, usando un espectrómetro de masas Orbitrap XL (ThermoFisher) equipado con una interfaz de ionización micro-ESI (Proxeon). El sistema cromatográfico consistió en un cartucho de preconcentración C18 (Agilent Technologies) conectado a una columna C18 de 15 cm con diámetro interno de 100 µm (Nikkoy Technos Co.). La separación se realizó con un gradiente de acetonitrilo de 3 a 40% (0,4 µL/min durante 90 min). Los espectros obtenidos fueron analizados en SEQUEST (Proteome Discoverer v1.3 ThermoFisher). La búsqueda se realizó con una base de datos que incluye proteínas humanas (Uniprot taxonomy 9606).

A partir de los datos generados por el estudio proteómico mediante iTRAQ, se analizaron las funciones, características y redes de interacción de las proteínas identificadas utilizando la base de datos incluidas en la web de Genecards (<http://www.genecards.org>) y los softwares Panther (<http://www.pantherdb.org>) e Ingenuity Pathway Analysis (IPA) (<http://www.ingenuity.com/products/ipa>).

Análisis estadístico

Todos los datos están representados como Media ± SEM. La significación estadística entre dos medias fue evaluada por Mann-Whitney y T-test para muestras no pareadas. Se tuvo en cuenta un $p < 0,05$ como criterio para la significación. Todos los gráficos y análisis se realizaron utilizando el paquete estadístico SPSS 15.0.

Resultados

En los datos paramétricos y bioquímicos de los sujetos de estudio se encontró que el índice de masa corporal (IMC) era superior a 40 Kg/m², lo que incluye a los dos grupos de pacientes (NG y DM) dentro de una población de sujetos obesos mórbidos. Sin embargo, el grupo de pacientes DM tenían un IMC superior a los sujetos NG ($P < 0,0001$). Las diferencias en los parámetros de glucosa, hemoglobina glicosilada (HbA1C), insulina e índice de resistencia insulínica (HOMA-IR), demuestran las claras diferencias durante la clasificación de los dos grupos de estudio, obesos mórbidos normoglucémicos (NG) y obesos mórbidos con diabetes mellitus tipo 2 (DM). El colesterol lipoproteico de alta densidad (HDLc) presentó diferencias significativas ($P < 0,05$) entre los dos grupos de pacientes que hacían parte del estudio.

En el ensayo iTRAQ se obtuvieron un total de 781 proteínas en el proteoma global de los preadipocitos. Estas proteínas fueron clasificadas de acuerdo a su

localización y función con la base de datos de Ingenuity Pathways Analysis (IPA) y Panther. Respecto a su localización, se pudo asignar la localización intracelular de 374 proteínas, entre las cuales el 53% (268 proteínas) correspondían a proteínas citoplasmáticas, 26% (57

proteínas) estaban localizadas en el núcleo, 12% (30 proteínas) en la membrana plasmática y un 9% (19 proteínas) en el espacio extracelular, estos datos se evidencian en la Figura 1A.

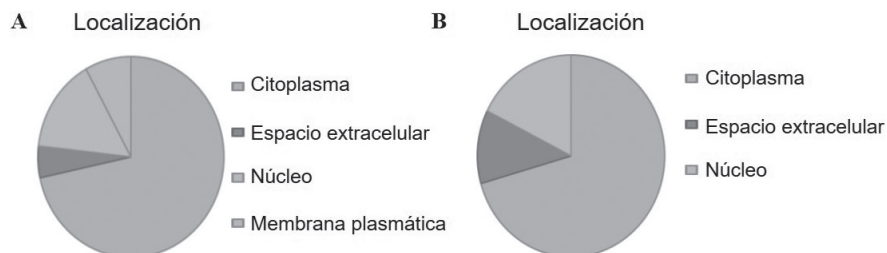


Figura 1. Localización de proteínas identificadas. A- Clasificación de las proteínas según su localización celular. B- Clasificación de proteínas diferencialmente expresadas entre sujetos obejos normoglucémicos y sujetos obesos diabéticos. Datos extraídos del software *Ingenuity Pathway Analysis* (IPA) y de la base de datos *Panther*.

Preadipocitos de TASC de pacientes obesos normoglucémicos vs. Pacientes obesos con DM

Se identificaron 17 proteínas que se encuentran enlistadas en la **Tabla 2**. Estas 17 proteínas, fueron expresadas diferencialmente en preadipocitos

provenientes de pacientes obesos DM y NG, de las cuales 16 se encontraban aumentadas en DM y 1 en NG. El análisis IPA reveló que el 70% de las proteínas se encuentran localizadas en citoplasma (12 proteínas), el 12% en el espacio extracelular (2 proteínas) y el 18% (3 proteínas) se encuentran en el núcleo, Figura 1B.

Tabla 2. Proteínas diferencialmente expresadas en preadipocitos de TASC de sujetos obesos NG y DM.

Nombre	Símbolo	Masa (Da)	Número de hallazgos significativos	Número de secuencias significativas	Puntaje Mascot	% Cobertura	Ratio DM/NG	T-test
Proteína de unión a poli (RC) 2	PCBP2	38580	179	1	280	58.7	2.641	0.010
Fibronectina 1	FN1	262625	141	4	139	47.2	2.037	0.014
Colágeno Tipo VI Alpha-cadena 1	COL6A1	108529	151	2	364	49.6	2.014	0.021
Factor de alargamiento de la traducción eucariótica 1 gamma	EEF1G	50119	24	5	336	21.8	1.945	0.001
Serpina B10	SERPINB10	45403	26	1	1109	20.6	1.896	0.019
Chaperonina de TCP1, Subunidad 8	CCT8	59621	11	1	456	18.4	1.732	0.001
Factor de alargamiento de la traducción eucariótica 1 gamma	EEF1G	50119	50	1	134	33.9	1.653	0.046
Colágeno Tipo VI Alpha-cadena 3	COL6A3	343669	7	6	133	20.1	1.587	0.001
Familia Aldo-Keto Reductasa 1 Miembro B	AKR1B1	35853	1	8	287	19.5	1.474	0.001
Importina subunidad 1 beta	KPNB1	97170	2	12	286	25.6	1.431	0.001
Proteína de ensamblaje a Clatrina-complejo 2	AP2B1	104553	19	4	843	26.9	1.417	0.016
Aldehído deshidrogenasa 1 miembro de la familia A3	ALDH1A3	56108	3	3	479	19.1	1.382	0.004
Prolyl 4-Hidroxilasa Subunidad Beta	P4HB	57116	27	10	1004	26.8	1.343	0.027
Proteína Disulfuro Isomerasa 6	PDIA6	48121	10	1	375	19.6	1.341	0.015
Superoxido dismutasa 2	SOD2	24750	7	1	447	21.5	1.336	0.006
Proteína ribosomal L10a	RPL10A	24831	12	30	101	56.4	1.332	0.030
Vimentina	VIM	53652	10	2	954	22.7	-1.502	0.022

El análisis de las proteínas aumentadas en preadipocitos de TASC de pacientes DM mediante el software Panther, reveló que el proceso biológico que mostraba más

modificaciones (28,6% de las proteínas aumentadas) se relacionaba con reacciones del metabolismo. Según el análisis IPA, 8 proteínas se encuentran implicadas en

la red “Señalización e interacción celular, desarrollo del tejido”; entre éstas se encuentran dos proteínas sobre las que confluyen varias interacciones, FN1, involucrada en la producción de matriz extracelular y en procesos inflamatorios, y SOD2, relacionada con estrés oxidativo, estos datos se encuentran en la **Tabla 3**.

TNF α ocupa un lugar central en la red de interacciones entre las proteínas. Curiosamente, en la red definida por las proteínas aumentadas en DM también se incluye la única proteína que se encontró disminuida en dichos pacientes, RPL10A (sombreada en la red de interacción de la **Figura 2**).

Tabla 3. Procesos biológicos en los que participan proteínas diferencialmente expresadas.

Procesos biológicos	Proteínas asociadas
Procesos apoptóticos	PCBP2
Adhesión biológica	FN1, COL6A1
Regulación biológica	EEF1G, SERPINB10, COL6A1
Organización de los componentes celulares o biogénesis	CCT8, COL6A1
Procesos celulares	PCBP2, EEF1G, FN1, COL6A
Procesos del desarrollo	PCBP2, COL6A1
Sistema inmune	EEF1G, COL6A1
Localización	AKR1B1, PCBP2, KPNB1, AP2B1, COL6A1
Procesos metabólicos	ALDH1A3, P4HB, AKR1B1, PCBP2, EEF1G, PDIA6, SOD2, CCT8, SERPINB10, RPL10A
Respuesta a estímulos	EEF1G, COL6A1



Figura 2. Análisis de las proteínas diferencialmente expresadas en preadipocitos de TASC provenientes de pacientes obesos normoglucémicos (NG) y diabéticos (DM). Red (network) en la que se incluyen proteínas con expresión diferencial, generada mediante el software Ingenuity Pathways Analysis (IPA).

Discusión

En el presente trabajo, analizamos datos de un estudio de proteómica comparada de preadipocitos de TASC obtenido de pacientes obesos normoglucémicos, no

resistentes a insulina (NG), y de pacientes obesos que habían desarrollado diabetes mellitus de tipo 2 (DM). Este estudio se lleva a cabo empleando la técnica iTRAQ. Esta técnica ha sido empleada previamente por otros autores para el estudio de la adipogénesis,

utilizando como modelo la línea celular 3T3-L1¹⁶⁻¹⁸. Los escasos estudios realizados con preadipocitos humanos han empleado otras técnicas proteómicas y estaban centrados bien en el análisis comparativo de preadipocitos antes y después del proceso de diferenciación¹⁹ o bien en establecer el proteoma de la membrana de los preadipocitos²⁰, sin hacer además referencia al peso de los donantes. De la misma manera, se han empleado otras técnicas proteómicas para el análisis del proteoma global o de diferentes compartimentos celulares (membrana plasmática, núcleo, etc) de preadipocitos 3T3-L1 o de ratón²¹. En conjunto, éste estudio permitió identificar un total de 781 proteínas del proteoma de los preadipocitos humanos, lo que se sitúa un poco por debajo de lo obtenido sobre el proteoma global de células 3T3-L1²¹, aunque esos estudios se destinaron específicamente a la determinación del proteoma, no para establecer comparativas como es el caso de este estudio.

A partir del listado de proteínas identificadas, procedimos a analizar su función, características moleculares y distribución, usando tres tipos de bases de datos: Genecards, Panther e *Ingenuity Pathway Analysis* (IPA). En particular, el análisis IPA reconoció 781 proteínas diferentes en el proteoma de preadipocitos humanos, que corresponden fundamentalmente a proteínas citoplasmáticas, nucleares, asociadas a la membrana plasmática o productos de secreción (i.e., de la matriz extracelular). No obstante, para un relativamente elevado número de proteínas no se pudo asignar su asociación a ningún compartimento celular.

El depósito de TASC muestran importantes diferencias moleculares, bioquímicas y celulares, que se reflejan en su distinta fisiología²². Nuestros estudios permiten añadir nuevas diferencias entre los preadipocitos TASC en individuos obesos para identificar puntos de comparación entre obesos NG y con DM.

Un estudio de la fracción de estroma vascular (FEV) (que incluye células mesenquimales, preadipocitos, células inmunes, etc) demostró que existen diferencias entre TASC y TAV entre sujetos delgados²³. En dicho estudio, realizado mediante 2D-PAGE (aplicado a FEV, tejido adiposo total y adipocitos aislados), se concluía que la FEV contribuye de manera importante a mantener las diferencias entre los depósitos de tejido adiposo²³. Los resultados del estudio comparativo de iTRAQ amplían esta idea, al demostrar que en los preadipocitos provenientes de TASC, se conservan diferencias dependientes del fenotipo obesos, ya sea, obesidad en condiciones de sensibilidad a insulina (NG) como de diabetes de tipo 2 (DM). Concretamente, la FEV de

TASC de individuos delgados difieren en proteínas relacionadas con el plegamiento (chaperonas), el citoesqueleto y procesos asociados a membrana (lamina, ezrina, etc), o el mantenimiento del estado redox (varias isoformas de ALDH1)^{23,24}. Nuestro estudio muestra que, en individuos obesos NG, las diferencias entre preadipocitos de TASC afectan sobre todo a proteínas citosólicas y, en particular, a proteínas implicadas en procesos metabólicos. También observamos diferencias en relación a procesos de regulación biológica. Al observar detalladamente los datos, se puede observar que en todos los procesos biológicos se encuentran una o varias proteínas que hacen parte de la matriz extracelular y algunas proteínas del citoesqueleto (vimentina). Estas observaciones podrían estar de acuerdo con la importancia en la respuesta de las células, en particular en la respuesta a insulina²⁵.

Uno de los resultados comunes en preadipocitos de TASC en los dos grupos de pacientes, es que no se encontraron diferencias en proteínas de la membrana plasmática en la transición de NG a DM, lo que sugiere que esta estructura puede estar sometida a menos cambios que otros componentes celulares en dicha transición.

Entre las proteínas aumentadas en preadipocitos TASC de obesos DM con respecto a obesos NG se identificaron varias relacionadas con la regulación de procesos metabólicos, lo que sugiere que estos presumiblemente determinan la diferencia entre la situación NG y DM. Adicionalmente, identificamos la proteína SOD2 (superóxido dismutasa 2), una proteína mitocondrial fundamental en la eliminación del daño oxidativo que protege de la oxidación a los componentes de la cadena respiratoria y otros constituyentes celulares^{24,26}. El aumento de SOD2 en DM apoya la idea de la existencia de un mayor daño oxidativo en estas condiciones que el existente en preadipocitos de sujetos obesos NG. De hecho, existe una clara correlación positiva entre el incremento del tejido adiposo y el estrés oxidativo de éste²⁷. Nuestros datos en preadipocitos concuerdan con esta última hipótesis. Puesto que, aunque los dos grupos de pacientes son obesos mórbidos, los sujetos con DM tienen un IMC superior a los NG, podrían tener un mayor nivel de daño oxidativo asociado al peso adicional respecto a los pacientes NG, a pesar del aumento en la expresión de algunas proteínas con capacidad antioxidante como un posible efecto compensatorio.

En esta línea, dentro de los resultados relevantes proporcionados por el análisis IPA es que las redes de interacción en la que están incluidas las

proteínas con expresión diferencial en TASC, tanto en individuos obesos NG como DM, sitúan a un marcador de inflamación (TNF α) en el centro de dichas interacciones. En este sentido hay que indicar que, aunque se ha propuesto que la obesidad sin complicaciones metabólicas (NG) presenta niveles menores de inflamación en el tejido adiposo que la obesidad metabólicamente comprometida (MHO vs. MUHO)^{24,28}, lo cierto es que, el incremento de tejido adiposo produce ya de por sí el desarrollo de un estado de inflamación crónico²⁹. Es posible que, en condiciones de diabetes, en los que encontramos por ejemplo mayores niveles el Factor Inhibidor de la Migración de macrófagos (MIF), el grado de inflamación sea superior al existente en el tejido adiposo de obesos NG o, alternatively, que los preadipocitos de TASC sean capaces de adaptarse a las condiciones de inflamación (y de estrés celular en general) de manera eficaz. No obstante lo anterior, hay que indicar que la mayoría de los estudios relacionados con las diferencias proteómicas en relación a la obesidad y la resistencia a insulina se han llevado a cabo sobre muestras de tejido adiposo total, por lo que recogen cambios tanto en los preadipocitos como en los adipocitos y otros componentes del tejido a diferencia de nuestro estudio realizado que recoge la información de los preadipocitos de TASC.

Finalmente, se puede concluir que, existen importantes diferencias en el perfil proteómico de los preadipocitos de TASC en obesidad, tanto en condiciones de sensibilidad a insulina como de diabetes, lo que apoya la importancia de estas células en el mantenimiento de la identidad de cada depósito y que, la transición desde el fenotipo NG a DM en obesidad conlleva un mayor desarrollo de estrés oxidativo e inflamación desde los precursores adipocitarios.

Agradecimientos

Este trabajo fue financiado por MINECO / FEDER (BFU2010-17116); Fue apoyado por el programa de movilidad de la Universidad Industrial de Santander, programa académico eventos internacionales 2018 (2051). Agradecemos a María Malagón del IMIBIC por el suministro de muestras, Jana Alonso [Plataforma proteómica del Instituto de Investigación en Salud de Santiago (IDIS), Universidad de Santiago de Compostela, España] y las Instalaciones de Proteómica del IMIBIC / Universidad de Córdoba-SCAI (ProteoRed, PRB2-ISCIII, apoyada por la beca PT13 / 0001) por su ayuda con los estudios iTRAQ.

Consideraciones éticas

Todos los experimentos se realizaron teniendo en cuenta los criterios de la declaración de Helsinki. Los apartados éticos del estudio, así como el diseño experimental fueron debidamente aprobados por el comité encargado de la investigación (073/2013) del Hospital Reina Sofía, España, se contó con el consentimiento informado de todos los voluntarios.

Conflicto de interés

Los autores confirman que no tienen ningún conflicto de interés.

Referencias

1. Malagon M, Díaz-Ruiz A, Guzman-Ruiz R, Jimenez-Gomez Y, Moreno N, Garcia-Navarro S, et al. Adipobiology for Novel Therapeutic Approaches in Metabolic Syndrome. *Curr Vasc Pharmacol*. 2014; 11(6): 954-967.
2. Anaizi N. Fat facts: An overview of adipose tissue and lipids. *Ibnosina J Med Biomed Sci*. 2019; 11(1): 5-15.
3. Schoettl T, Fischer IP, Ussar S. Heterogeneity of adipose tissue in development and metabolic function. *J Exp Biol* 2018; 221. (Pt Suppl 1). doi: 10.1242/jeb.162958.
4. Vohl M-C, Sladek R, Robitaille J, Gurd S, Marceau P, Richard D, et al. A survey of genes differentially expressed in subcutaneous and visceral adipose tissue in men. *Obes Res*. 2004; 12(8): 1217-1222. doi: 10.1038/oby.2004.153.
5. Ekpenyong CE. Relationship between Insulin Resistance and Metabolic Syndrome Clusters: Current Knowledge. *Acta Sci Med Sceinces*. 2019; 3(3): 99-104.
6. Spalding KL, Arner E, Westermark PO, Bernard S, Buchholz BA, Bergmann O, et al. Dynamics of fat cell turnover in humans. *Nature*. 2008; 453(7196): 783-787. doi: 10.1038/nature06902.
7. Rosen ED, MacDougald OA. Adipocyte differentiation from the inside out. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2006; 7(12): 885-896. doi: 10.1038/nrm2066.
8. Hamdy O, Porramatikul S, Al-Ozairi E. Metabolic obesity: the paradox between visceral and subcutaneous fat. *Curr Diabetes Rev*. 2006; 2(4): 367-373.
9. Virtue S, Vidal-Puig A. Adipose tissue expandability, lipotoxicity and the metabolic syndrome — An allostatic perspective. *Biochim Biophys Acta*. 2010; 1801(3): 338-349. doi: 10.1016/j.bbali.2009.12.006.

10. Maury E, Brichard SM. Adipokine dysregulation, adipose tissue inflammation and metabolic syndrome. *Mol Cell Endocrinol.* 2010; 314(1): 1-16. doi: 10.1016/j.mce.2009.07.031.
11. Xu XJ, Pories WJ, Dohm LG, Ruderman NB. What distinguishes adipose tissue of severely obese humans who are insulin sensitive and resistant? *Curr Opin Lipidol.* 2013; 24(1) : 49-56. doi: 10.1097/MOL.0b013e32835b465b.
12. Primeau V, Coderre L, Karelis AD, Brochu M, Lavoie M-E, Messier V, et al. Characterizing the profile of obese patients who are metabolically healthy. *Int J Obes.* 2011; 35(7): 971-981. doi: 10.1038/ijo.2010.216.
13. Samocha-Bonet D, Chisholm DJ, Tonks K, Campbell LV, Greenfield JR. Insulin-sensitive obesity in humans – a ‘favorable fat’ phenotype? *Trends Endocrinol Metab.* 2012; 23(3): 116-124. doi: 10.1016/j.tem.2011.12.005.
14. Rodríguez A, Gómez-Ambrosi J, Catalán V, Rotellar F, Valentí V, Silva C, et al. The ghrelin O-acyltransferase–ghrelin system reduces TNF- α -induced apoptosis and autophagy in human visceral adipocytes. *Diabetologia.* 2012; 55(11): 3038-3050. doi: 10.1007/s00125-012-2671-5.
15. Moreno-Castellanos N, Rodríguez A, Rabanal-Ruiz Y, Fernández-Vega A, López-Miranda J, Vázquez-Martínez R, et al. The cytoskeletal protein septin 11 is associated with human obesity and is involved in adipocyte lipid storage and metabolism. *Diabetologia.* 2017; 60(2): 324-335. doi: 10.1007/s00125-016-4155-5.
16. Ye F, Zhang H, Yang Y-X, Hu H-D, Sze SK, Meng W, et al. Comparative proteome analysis of 3T3-L1 adipocyte differentiation using iTRAQ-coupled 2D LC-MS/MS. *J Cell Biochem.* 2011; 112(10): 3002-3014. doi: 10.1002/jcb.23223.
17. Gómez-Serrano M, Camafeita E, López A, Rubio M, Bretón I, et al. Differential proteomic and oxidative profiles unveil dysfunctional protein import to adipocyte mitochondria in obesity-associated aging and diabetes. *Redox Biol.* 2017; 11: 415-428. doi: 10.1016/j.redox.2016.12.013.
18. Ojima K, Oe M, Nakajima I, Muroya S, Nishimura, T. Dynamics of protein secretion during adipocyte differentiation. *FEBS Open Bio.* 2016; 6: 816-826. doi: 10.1002/2211-5463.12091.
19. Lee H-K, Lee B-H, Park S-A, Kim C-W. The proteomic analysis of an adipocyte differentiated from human mesenchymal stem cells using two-dimensional gel electrophoresis. *Proteomics.* 2006; 6(4): 1223-1229. doi: 10.1002/pmic.200500385.
20. Jeong JA, Ko K-M, Park HS, Lee J, Jang C, Jeon C-J, et al. Membrane proteomic analysis of human mesenchymal stromal cells during adipogenesis. *Proteomics.* 2007; 7(22): 4181-4191. doi: 10.1002/pmic.200700502.
21. Renes J, Mariman E. Application of proteomics technology in adipocyte biology. *Mol Biosyst.* 2013; 9(6): 1076. doi: 10.1039/c3mb25596d.
22. Lee M-J, Wu Y, Fried SK. Adipose tissue heterogeneity: Implication of depot differences in adipose tissue for obesity complications. *Mol Aspects Med.* 2013; 34(1): 1-11. doi: 10.1016/j.mam.2012.10.001.
23. Peinado JR, Jimenez-Gomez Y, Pulido MR, Ortega-Bellido M, Diaz-Lopez C, Padillo FJ, et al. The stromal-vascular fraction of adipose tissue contributes to major differences between subcutaneous and visceral fat depots. *Proteomics.* 2010; 10(18): 3356-3366. doi: 10.1002/pmic.201000350.
24. Moreno-Castellanos N, Guzmán-Ruiz R, Cano DA, Madrazo-Atutxa A, Peinado JR, Pereira-Cunill JL, et al. The effects of bariatric surgery-induced weight loss on adipose tissue in morbidly obese women depends on the initial metabolic status. *Obes Surg.* 2016; 26(8): 1757-1767. doi: 10.1007/s11695-015-1995-x.
25. Kanzaki M, Pessin JE. Insulin-stimulated GLUT4 Translocation in Adipocytes Is Dependent upon Cortical Actin Remodeling. *J Biol Chem.* 2001; 276(45): 42436-42444. doi: 10.1074/jbc.M108297200.
26. Flynn JM, Melov S. SOD2 in mitochondrial dysfunction and neurodegeneration. *Free Radic Biol Med.* 2013; 62: 4-12. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2013.05.027.
27. Furukawa S, Fujita T, Shimabukuro M, Iwaki M, Yamada Y, Nakajima Y, et al. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J Clin Invest.* 2004; 114(12): 1752-1761. doi: 10.1172/JCI21625.
28. Barbarroja N, López-Pedraza R, Mayas MD, García-Fuentes E, Garrido-Sánchez L, Macías-González M, et al. The obese healthy paradox: is inflammation the answer? *Biochem J.* 2010; 430(1): 141-149. doi: 10.1042/BJ20100285.
29. Wellen KE, Hotamisligil GS. Inflammation, stress, and diabetes. *J Clin Invest.* 2005; 115(5): 1111-1119. doi: 10.1172/JCI25102.