

EFFECTO DE LA HIDROCORTISONA SOBRE LA EXPRESIÓN DE LA ACUAPORINA 7, DURANTE LA DIFERENCIACION DE ADIPOCITOS DE LA LINEA 3T3L1.

Quesada López, T. P.⁽¹⁾; Mora Izaguirre, O⁽²⁾; Ghinis Hozumi, Y⁽²⁾.

⁽¹⁾Facultad de Ciencias Naturales.

Universidad Autónoma de Querétaro.

⁽²⁾Laboratorio de Rumiología y Metabolismo Nutricional.

Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Neurobiología, Campus Juriquilla.

RESUMEN

El Síndrome Metabólico (SM) es el antecedente de diferentes enfermedades crónicas que ponen en riesgo la salud humana. Se sabe que la exposición continua a corticoesteroides puede conducir a la presentación del SM, también está reportado que en la obesidad se disminuye la expresión de la acuaporina 7 (AQP7), proteína relacionada con el transporte de glicerol. El objetivo del presente estudio fue conocer el efecto de la adición de diferentes niveles de hidrocortisona sobre la expresión de AQP7 en adipocitos 3T3L1. Para ello se plantearon tres diferentes protocolos de aplicación: uno continuo (aplicado durante todo el proceso de diferenciación adipocitaria), otro al que se denominó medio-final (el tratamiento se aplicó a partir del segundo medio de diferenciación y se mantuvo hasta el final de ésta) y uno denominado final (los tratamientos fueron aplicados en el medio de diferenciación tres, es decir en la últimas 48 horas del proceso de diferenciación). En cada uno de los protocolos de aplicación se probaron cuatro diferentes concentraciones de hidrocortisona: 0, 10, 100 y 1000 nM. Al final del proceso de diferenciación se obtuvo el RNA total de las células de todos los tratamientos, se realizó una transcripción reversa para obtener el cDNA y se midió por PCR de tiempo real la expresión de AQP7. Los resultados indican que en el caso de la aplicación final, la adición de los diferentes niveles de hidrocortisona provocan un disminución de la expresión de AQP7 ($P < 0.05$), para el caso de la aplicación medio-final la dosis 10 nM provocó un aumento de la expresión de AQP7, no así las dosis de 100 y 1000 que disminuyeron su expresión ($P < 0.01$). En el caso de la aplicación continua se observó que hubo una disminución de AQP7 en todas las concentraciones adicionadas de hidrocortisona ($P < 0.01$). Se puede concluir que la hidrocortisona, aplicada durante el proceso de diferenciación adipocitaria, afecta la expresión de AQP7, es decir la AQP7 podría explicar en parte los efectos negativos de la hidrocortisona sobre el metabolismo de las células adiposas.

INTRODUCCIÓN

El Síndrome Metabólico (SM) es un conjunto de factores que ponen en riesgo la salud del individuo, siendo el principal la obesidad visceral (Barrera y col., 2008).

Estudios recientes sugieren que alteraciones en los niveles de hormonas que forman parte del metabolismo intermedio, contribuyen al desarrollo de la obesidad, ya sea favoreciendo la hipertrofia del adipocito o bien provocando un incremento en los niveles de glucosa y de lípidos circulantes (Balachandran y col., 2008; Bujalska, 2007).

El cortisol es una hormona de tipo corticoesteroide que cumple diversas funciones; participa en la regulación metabólica, en el mantenimiento de la presión sanguínea, en la modulación del estrés y en la respuesta inflamatoria (Tomilinson y col., 2004).

La exposición crónica a niveles elevados de esta hormona como respuesta al estrés, puede provocar un desequilibrio en el metabolismo energético y conducir a diferentes patologías,

entre ellas el SM. El SM se caracteriza por la acumulación de grasa visceral, por un incremento en la resistencia a la insulina y un aumento en los niveles de los lípidos circulantes (Anagnostis y col., 2009; Balachandran y col., 2008; Andrews y col., 2002). En el SM el cortisol se incrementa localmente en el tejido adiposo, especialmente en la grasa visceral, afectando su función y forma (Stewart, 2003).

Las acuaporinas son una familia de proteínas transportadoras, principalmente de agua. En la actualidad se conocen 13, de las cuales 4 se subdividen en acuagliceroporinas ya que transportan glicerol. Al igual que en el caso de las hormonas, la expresión anormal de éstas puede producir diversas patologías (Marrades y col., 2005; Beitz y col., 2009).

La relevancia de la existencia de estos canales o proteínas de transporte en el SM radica en que en el tejido adiposo, se localiza la acuaporina 7 también conocida como acuaporina adiposa (AQP7/AQPap), que forma parte del metabolismo energético ya que contribuye a mantener niveles adecuados de glucosa, triglicéridos y proteínas debido a su responsabilidad en la movilización de glicerol (Beitz y col., 2009; Maeda y col., 2009).

Se sabe que en la obesidad se disminuye la expresión de la AQP7, lo que provoca una acumulación de triglicéridos y una disminuida liberación de glicerol a la sangre, provocando hipertrofia y resistencia a la insulina (Maeda y col., 2009; Hibusi y col., 2005).

El objetivo del presente estudio fue conocer el efecto de la adición de diferentes niveles de hidrocortisona sobre la expresión de AQP7, aplicada durante el proceso de diferenciación adipocitaria de la línea celular 3T3L1.

DISEÑO DEL EXPERIMENTO

Condiciones de cultivo

Es importante resaltar que la línea 3T3L1 ha sido ampliamente usada como modelo de diferenciación adipocitaria y como base para el estudio de los procesos de diferenciación y metabolismo del tejido adiposo. El proceso de diferenciación de éste tipo celular consiste en que una vez que los preadipocitos han alcanzado la confluencia, se añaden tres diferentes cócteles de diferenciación a saber: medio de diferenciación 1 aplicado durante 48 hrs., contiene Suero Bovino Fetal (2%), Penicilina/Estreptomicina (100u/ml), Insulina (5 µg/ml), dexametasona (0.25 µM), IBMx (0.5mM) y DMEM; medio de diferenciación 2 aplicado durante 24 hrs., contiene Suero Bovino Fetal (2%), penicilina/estreptomicina (100 u/ml), insulina (5 µg/ml) y DMEM; finalmente, el medio de diferenciación 3 aplicado durante 96 hrs y contiene Suero Bovino Fetal (2%), Penicilina/estreptomicina (100 u/mL) y DMEM.

Tratamientos

Para cumplir con el objetivo aquí propuesto, se plantearon tres diferentes protocolos de aplicación: uno continuo (aplicado durante todo el proceso de diferenciación adipocitaria, es decir en los tres diferentes medios de diferenciación), otro al que se denominó medio-final (el tratamiento se aplicó a partir del segundo medio de diferenciación y se mantuvo hasta el final de ésta) y uno denominado final (los tratamientos fueron aplicados en el medio de diferenciación tres, es decir en la últimas 48 horas del proceso de diferenciación). En cada uno de los protocolos de aplicación se probaron cuatro diferentes concentraciones de hidrocortisona: 0, 10, 100 y 1000 nM.

Obtención del RNA y cDNA

Al final del proceso de diferenciación se obtuvo el RNA total de las células de todos los tratamientos (kit RNA Isolation Promega), para obtener el DNA complementario (cDNA)

se realizó una transcripción reversa usando un oligo (dT)₁₂₋₁₈ (Sigma-Genosys, St. Louis, MO) y la enzima Super script II (Invitrogen).

Se diseñaron un par de oligonucleótidos para obtener el mRNA de AQP7. Estos fueron un sentido 5'-GCCTAGTGCCACAATTGGTGA-3'; y un antisentido 5'-TATGGTGCAGAGATTTCTGG-3' (NM_007473.4 GI: 145301575). Con éstos nucleótidos se obtuvo por PCR convencional un fragmento de 220 pares de bases, dicho fragmento fue secuenciado para probar su identidad en un secuenciador 310 ABI prism con la versión 3 Big Dye de Applied Biosystems (Carlsbad, CA).

PCR de tiempo real

Se midió la expresión de AQP7 a partir de los cDNA obtenidos de los diferentes tratamientos por PCR de tiempo real o cuantitativo (LightCycler[®] 1.5, Roche Diagnostics; Basel, Switzerland), usando ciclofilina como gen endógeno para normalizar al cDNA.

Las condiciones del PCR de tiempo real fueron: desnaturalización inicial a 95°C por 10 min. Amplificación por 55 ciclos: desnaturalización a 95°C por 10 s, 20°C/s, alineamiento a 60°C por 10 s, 20°C/s, y extensión a 72°C por 9 s, 20°C/s. Para realizar la cuantificación relativa se usó la fórmula $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$.

Análisis estadísticos

Los resultados fueron analizados mediante el procedimiento de modelos lineales generales del SAS (2009) y se usó una prueba de comparación de medias por diferencias mínimo cuadráticas (lsmeans).

RESULTADOS Y DISCUSION

Se observa en la figura 1 que en el caso de la aplicación final, los diferentes niveles de hidrocortisona disminuyen la expresión de AQP7 ($P < 0.05$), para el caso de la aplicación medio-final la dosis 10 nM provocó un aumento de la expresión de AQP7, no así las dosis de 100 y 1000 que disminuyeron su expresión ($P < 0.01$). En el caso de la aplicación continua se observó que hubo una disminución de AQP7 en todas las concentraciones adicionadas de hidrocortisona ($P < 0.01$).

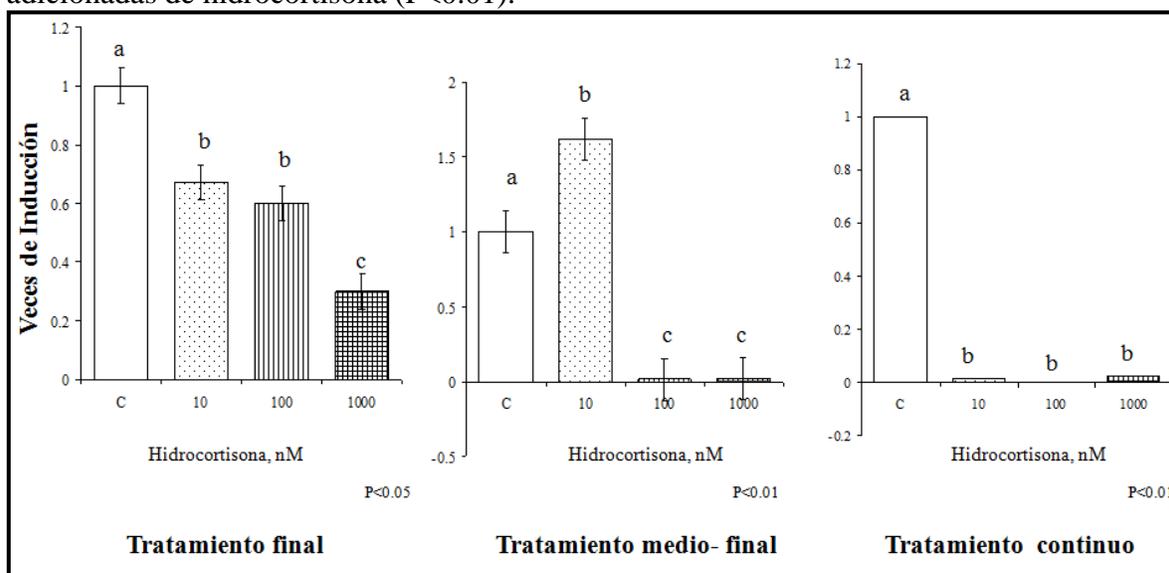


Figura 1. Efecto de diferentes niveles de Hidrocortisona sobre la expresión de AQP7 en adipocitos 3T3L1, aplicados durante tres tiempos de la diferenciación celular.

Nota. Las gráficas se obtuvieron con los resultados arrojados por el PCR tiempo real.

CONCLUSIONES

Con base en los resultados obtenidos, se puede concluir que la hidrocortisona aplicada durante el proceso de diferenciación adipocitaria, afecta la expresión de AQP7 y que dicha disminución es efecto de la dosis y del momento de la diferenciación durante el cual se aplique, siendo menor su expresión a mayor concentración de hidrocortisona y a un mayor tiempo de exposición al tratamiento. Esto significaría, que debido a su importancia en el transporte de glicerol, la expresión de AQP7 influiría sobre los efectos negativos de la hidrocortisona, en el metabolismo de las células adiposas. Resultan muy interesantes los resultados obtenidos en éste estudio, ya que no existen reportes en la literatura que mencionen la relación entre los corticoesteroides y la AQP7, por lo que el explorar más a cerca de dicha relación ayudará en un futuro a comprender mejor las interacciones que se suceden en la presentación del SM.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Anagnostis P., Athyros V., Tziomalos K., Karagiannis A., Mikhailidis D. “The Pathogenetic Role of Cortisol in the Metabolic Syndrome: A Hypothesis.” The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism Vol. 94, No. 8 2692-2701, 2009.
- Andrews R., Herlihy O., Livingstone D., Andres R., Walter B. “Abnormal Cortisol Metabolism and Tissue Sensitivity to Cortisol in Patients with Glucose Intolerance.” The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism Vol. 87, No. 12 5587-5593., 2002.
- Balachandran A., Guan H. Sellan M., van Uum S., Yang K. “Insulin and Dexamethasone Dynamically Regulate Adipocyte 11-Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 1.” Endocrinology 149(8):4069–4079, 2008
- Beitz E. “Handbook of Experimental Pharmacology.”Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, Alemania, 2009.
- Bujalska I., Durrani O., Abbott J., Onyimba C., Khosla P., Moosavi A., Reuser T., Stewart P., Tomlinson J., Walker E., Rauz S. “Characterization of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase 1 in human orbital adipose tissue: a comparison with subcutaneous and omental fat.” Journal of Endocrinology 192, 279–288 DOI: 10.1677/JOE-06-0042, 2007.
- Hibuse T, Maeda N, Funahashi T, Yamamoto K, Nagasawa A, Mizunoya W, Kishida K, Inoue K, Kuriyama H, Nakamura T, Fushiki T, Kihara S, Shimomura I. “Aquaporin 7 deficiency is associated with development of obesity through activation of adipose glycerol kinase.” Proc Natl Acad Sci. Aug 2;102(31):10993-8, 2005.
- Maeda N, Hibuse T, Funahashi T. “Role of aquaporin-7 and aquaporin-9 in glycerol metabolism; involvement in obesity.” Handb Exp Pharmacol. (190):233-49, 2009.
- Marrades MP, Milagro FI, Martínez JA, Moreno-Aliaga MJ (2006) “Differential expression of aquaporin 7 in adipose tissue of lean and obese high fat consumers.” Biochem Biophys Res Commun. Jan 20;339(3):785-9. Epub 2005 Nov 22, 2006.
- Stewart P. “Tissue-specific Cushing’s syndrome, 11 β -hydroxysteroid dehydrogenases and the redefinition of corticosteroid hormone action.” European Journal of Endocrinology 149 163–168
- Tomlinson J., Walker E., Bujalska I., Draper N., Lavery G., Cooper M., Hewison M., Stewart P. “11 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 1: A Tissue-Specific Regulator of Glucocorticoid Response.” Endocrine Reviews 25 (5): 831-866, 2004.

Ofelia Mora Izaguirre. Investigador Anfitrión. _____