



**INSTITUTO POTOSINO DE INVESTIGACIÓN  
CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA, A.C.**

**POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR**

**Caracterización de una cepa de preadipocitos humanos  
como modelo experimental para estudios de  
adipogénesis *in vitro***

Tesis que presenta

**Claudia Griselda Cárdenas León**

Para obtener el grado de

**Maestra en Ciencias en Biología Molecular**

Director de tesis

**Dr. Luis Antonio Salazar Olivo**

San Luis Potosí, S.L.P., Junio de 2016



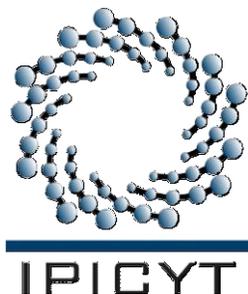
## Constancia de aprobación de la tesis

La tesis "**Caracterización de una cepa de preadipocitos humanos como modelo experimental para estudios de adipogénesis in vitro**" presentada para obtener el Grado de Maestra en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por **Claudia Griselda Cárdenas León** y aprobada el **doce de julio del dos mil dieciséis** por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

**Dr. Luis Antonio Salazar Olivo**  
Director de la tesis

**Dra. Gabriela Margarita Montero Morán**  
Miembro del Comité Tutorial

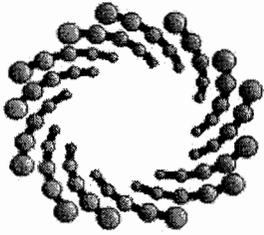
**Dr. Rubén Hipólito López Revilla**  
Miembro del Comité Tutorial



## **Créditos institucionales**

Esta tesis fue elaborada en el Laboratorio de Biotecnología Médica y Pecuaria de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., bajo la dirección del Dr. Luis Antonio Salazar Olivo. El manuscrito se redactó siguiendo las normas para autor de la revista *Adipocyte*, publicada por Taylor & Francis Group

Durante la realización del trabajo la autora recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (número de registro 330683).



**IPICYT**

# Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

## Acta de Examen de Grado

El Secretario Académico del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., certifica que en el Acta 149 del Libro Primero de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Maestría en Ciencias en Biología Molecular está asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 12 días del mes de julio del año 2016, se reunió a las 12:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

<b>Dr. Rubén Hipólito López Revilla</b>	<b>Presidente</b>	<b>IPICYT</b>
<b>Dr. Luis Antonio Salazar Olivo</b>	<b>Secretario</b>	<b>IPICYT</b>
<b>Dra. Gabriela Margarita Montero Morán</b>	<b>Sinodal externo</b>	<b>UASLP</b>

a fin de efectuar el examen, que para obtener el Grado de:

**MAESTRA EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR**

sustentó la C.

**Claudia Griselda Cárdenas León**

sobre la Tesis intitulada:

*Caracterización de una cepa de preadipocitos humanos como modelo experimental para estudios de adipogénesis in vitro*

que se desarrolló bajo la dirección de

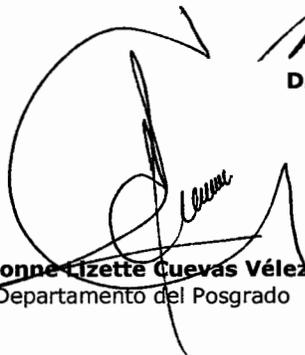
**Dr. Luis Antonio Salazar Olivo**

El Jurado, después de deliberar, determinó

**APROBARLA**

Dándose por terminado el acto a las 12:55 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fe el Secretario Académico del Instituto.

A petición de la interesada y para los fines que a la misma convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 12 días del mes de julio de 2016.



**Mtra. Ivonne Lizette Cuevas Vélez**  
Jefa del Departamento del Posgrado



**Dr. Marcial Benilla Makin**  
Secretario Académico



## **Dedicatorias**

*A mis papas, quienes son mi apoyo firme y constante a lo largo de toda la vida, les debo más de lo que pueda llegar a darles el resto de mi vida, los amo mucho.*

*A mis hermanos quienes siempre están ahí y siempre intentaron comprenderme, escucharme y darme ánimos, los quiero mucho.*

*A JSS quien fue el que tuvo que aguantar mis subidas y bajadas de ánimo, espectador de esta aventura y motivación de mis planes de vida.*

## **Agradecimientos**

*Agradezco a CONACYT por la beca 330683 y al Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica por el apoyo otorgado para la realización de este trabajo.*

*Gracias Dr. Luis Antonio Salazar Olivo por permitirme formar parte de su equipo de trabajo y ser paciente conmigo.*

*Gracias Dra. Angélica Montoya Contreras por el apoyo técnico y académico brindado para el desarrollo de este trabajo.*

*Gracias Biol. Mireya Guadalupe Sánchez Garza por el apoyo técnico y académico brindado para el desarrollo de este trabajo.*

*Gracias Dra. O. Araceli Patrón Soberano por el apoyo técnico brindado en la toma de micrografías para el desarrollo de este trabajo.*

*Gracias Dra. Verónica Gallegos García y la M. María de los Ángeles Aguilar Santamaría por apoyarme en la técnica del cariotipo, así como por sus consejos en la obtención de cromosomas.*

*Al Dr. Rubén López Revilla y a la Dra. Gabriela Margarita Montero Morán por sus comentarios realizados para este escrito.*

*Gracias C. Gloria Alicia López Niño por siempre contagiarme de tu interminable energía, me hiciste reír mucho, siempre me diste tu apoyo y consejo.*

*Gracias Dra. Elvira Arellanes Licea por el apoyo académico y la amistad.*

*Gracias Lic. Emma Félix Hernández por darme tu compañía y amistad constante, siempre me diste ánimos y apoyo incondicional, te debo mucho.*

# Contenido

Constancia de aprobación de la tesis	ii
Créditos institucionales	iii
Copia del acta de examen	iv
Dedicatorias	v
Agradecimientos	vii
Abreviaturas	viii
Resumen	ix
Abstract	x
1. Introducción	2
2. Resultados	6
2.1 Las células PASH-4 retienen su capacidad proliferativa durante 36 subcultivos	6
2.2 Las células PASH-4 expresan marcadores de senescencia en subcultivos avanzados	9
2.3 Las células PASH-4 retienen el cariotipo diploide	10
2.4 Las células PASH-4 muestran una alta capacidad adipogénica aún en subcultivos tardíos	11
4. Discusión	16
5. Materiales y métodos	20
Células PASH-4	20
Evaluación de la capacidad proliferativa en subcultivo	20
Determinación del tiempo de duplicación	21
Capacidad clonogénica	21
Porcentaje de células senescentes	22
Cariotipo	22
Diferenciación de preadipocitos y cuantificación de Rojo Oleoso O	23
Aislamiento de RNA, síntesis de cDNA y PCR punto final	23
6. Referencias	25
Pies de figura	30
Tabla 1. Secuencias de los oligonucleótidos	33

## Abreviaturas

<b>ASC52telo</b>	Células troncales derivadas del tejido adiposo humano inmortalizadas con hTERT
<b>C/EBP</b>	Proteínas de unión a secuencias CCAAT
<b>Chub-S7</b>	Células estromales derivadas del tejido adiposo humano inmortalizadas con hTERT y E7
<b>EDTA</b>	Ácido etilendiaminotetracético
<b>hASCs-M</b>	Células estromales derivadas del tejido adiposo humano
<b>hASC-TE</b>	Células estromales derivadas del tejido adiposo humano inmortalizadas con hTERT y E6/E7
<b>hMSC</b>	Células troncales mesenquimales humanas
<b>HNPA</b>	Preadipocitos humanos normales
<b>LPL</b>	Lipoproteín lipasa
<b>LS14</b>	Células derivadas de liposarcoma clona 14
<b>MB</b>	Medio de cultivo basal
<b>MDI</b>	Medio de cultivo de inducción
<b>MM</b>	Medio de cultivo de mantenimiento
<b>M-MLV</b>	Virus de la leucemia murina de Moloney
<b>PASH-4</b>	Preadipocitos subcutáneos humanos clona 4
<b>PBS</b>	Solución salina amortiguadora de fosfato
<b>PLA</b>	Población celular similar a fibroblastos procesados de un lipoaspirado
<b>PPAR<math>\gamma</math></b>	Receptor gamma activado por proliferadores de peroxisomas
<b>RT</b>	Retrotranscriptasa
<b>SA-<math>\beta</math>-Gal</b>	$\beta$ -galactosidasa asociada a la senescencia
<b>SGBS</b>	Cepa celular de preadipocitos humanos derivados de paciente con el síndrome Simpson-Golabi-Behmel
<b>TD</b>	Terminalmente diferenciada

## Resumen

### Caracterización de una cepa de preadipocitos humanos como modelo experimental para estudios de adipogénesis *in vitro*

El estudio del tejido adiposo aprovecha modelos experimentales *in vitro* constituidos por cultivos primarios de preadipocitos o líneas celulares adiposas. Los primeros representan con alta fidelidad el metabolismo del linaje adiposo *in vivo*, pero tienen un tiempo de vida limitado y una decreciente capacidad adipogénica al subcultivarse. Las segundas muestran capacidad proliferativa ilimitada pero no necesariamente poseen todos los atributos funcionales del linaje adiposo. Las líneas celulares adipogénicas más empleadas son de origen murino pero tienen diferencias genéticas y metabólicas con las células humanas. Aunque se han descrito líneas celulares adipogénicas humanas, hasta ahora su uso es limitado y no hay un modelo *in vitro* de adipogénesis humana de uso generalizado. Aquí caracterizamos una cepa de preadipocitos subcutáneos humanos de naturaleza clonal, PASH-4, para explorar su utilidad como modelo *in vitro* de la adipogénesis humana. Las células PASH-4 proliferaron durante 30 subcultivos consecutivos mostrando tiempos de duplicación de 47 h y 95 h en los subcultivos 17 y 26, y capacidad clonogénica del 7% y 2% en los subcultivos 15 y 25, respectivamente. Las células PASH-4 mantuvieron su capacidad adipogénica aun en el subcultivo 26, expresando los marcadores adipogénicos tempranos C/EBP $\beta$  y C/EBP $\delta$  aun en preadipocitos. Las células PASH-4 fueron diploides (46XY) al menos hasta el subcultivo 20. Estas características hacen de la cepa PASH-4 un modelo útil para estudios de adipogénesis humana *in vitro* y una población de preadipocitos humanos normales adecuada para generar una línea establecida de preadipocitos humanos.

**Palabras clave:** Tejido adiposo, diferenciación adiposa, precursores de adipocitos humanos.

## Abstract

### Characterization of a strain of human preadipocytes as a experimental model system for *in vitro* adipogenesis

The study of adipose tissue takes advantage of *in vitro* experimental models constituted by cultures of primary preadipocytes or adipogenic cell lines. The first ones represent with high fidelity the metabolism of the cell adipose lineage but have a limited life span and a decreasing adipogenic capacity when subcultured. The second ones show an ilimited proliferative capacity but they do not necessarily have all the functional attributes of the adipose cell lineage. The most commonly used adipose cell lines have a murine origin and present genetic and metabolic differences with respect to the human cells. Although human adipogenic cell lines have been described, its use is limited, and currently there is not an *in vitro* model system widely used for the study of human adipogenesis. Here we characterized a clonal cell strain of human subcutaneous preadipocytes, PASH-4, to explore its utility as an *in vitro* model system for human adipogenesis. The PASH-4 cells proliferated for 30 serial subcultures, showing population doubling times of 47 h and 95 h in the 17<sup>th</sup> and 26<sup>th</sup> subculture, and a clonogenic capacity of 7% and 2% in the 15<sup>th</sup> and 25<sup>th</sup> subculture, respectively. The PASH-4 cells maintained their adipogenic capacity until the 26<sup>th</sup> subculture, expressing the early adipose molecular markers C/EBP $\beta$  and C/EBP $\delta$  even as preadipocytes. The PAHS-4 cells were diploid (46XY) at least until the 20<sup>th</sup> subculture. All these characteristics make the PASH-4 strain a useful model for *in vitro* human adipogenesis studies and a population suitable of normal human preadipocytes to generate an established cell line of human preadipocytes.

**Key Words:** Adipose tissue, adipocyte differentiation, human adipocyte precursor.

**Caracterización de una cepa de preadipocitos humanos como modelo experimental para estudios de adipogénesis *in vitro***

Claudia G. Cárdenas-León, Luis A. Salazar-Olivo\*

División de Biología Molecular, Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, Camino a la Presa San José 2055, 78216 San Luis Potosí, S.L.P., México.

\* Autor para correspondencia:

Tel: +52 444 834 2054. E-mail: [olivo@ipicyt.edu.mx](mailto:olivo@ipicyt.edu.mx)

## 1. Introducción

El tejido adiposo, principal sitio de almacenamiento y movilización de energía en eucariotes superiores, almacena triglicéridos en periodos de consumo excesivo de energía y los moviliza durante la privación de la misma. <sup>1</sup> Además, el tejido adiposo funciona como un órgano endócrino, pues secreta una gran variedad de proteínas involucradas en la regulación del metabolismo, la reproducción y la inmunidad, entre otras. Por ejemplo, la leptina es una hormona producida y secretada por los adipocitos que actúa como señal de saciedad al interactuar con su receptor hipotalámico <sup>2</sup> y participa en la regulación del ciclo menstrual y la función reproductiva. <sup>3</sup>

El tejido adiposo es también una fuente de células troncales adultas capaces de proliferar y diferenciarse en adipocitos maduros, así como también en osteocitos, condrocitos y miocitos, bajo condiciones de cultivo específicas. <sup>4,5</sup> Las aplicaciones de células troncales derivadas del tejido adiposo son amplias en la terapia génica e ingeniería de tejidos. <sup>6</sup> Incluyendo la regeneración de heridas agudas y crónicas, la reconstrucción de tejido graso, cartílago y hueso, el tratamiento de la disfunción eréctil y de distrofias vulvares. <sup>7-9</sup>

Es necesario estudiar el tejido adiposo para entender los mecanismos que participan en el desarrollo de disfunciones como la obesidad, que está fuertemente asociada a desordenes que incluyen diabetes, hipertensión, cáncer, enfermedades de la vesícula y arteriosclerosis. <sup>1</sup>

El estudio del tejido adiposo puede realizarse empleando modelos experimentales *in vivo*, generalmente cepas isogénicas de ratas o ratones, o

modelos *in vitro*; estos últimos pueden ser cultivos celulares primarios o bien líneas celulares establecidas. Los cultivos primarios están constituidos por células obtenidas directamente de tejidos *ex vivo* de un organismo específico, por ejemplo humano o ratón, las cuales son mantenidas en condiciones de temperatura y humedad que permiten su supervivencia, proliferación y diferenciación terminal.<sup>10</sup> Los cultivos primarios de preadipocitos utilizados para estudios del tejido adiposo se obtienen de tejido graso y sus células tienen la capacidad de proliferar y diferenciarse en adipocitos maduros bajo estímulos específicos.<sup>11</sup> Aunque, los cultivos primarios reflejan con gran fidelidad el funcionamiento adiposo *in vivo*,<sup>11</sup> representan un modelo de cultivo finito, pues las células que los integran senescen y dejan de proliferar después de alcanzar alrededor de 50 duplicaciones de la población.<sup>12</sup> Asimismo, estas células pierden su capacidad adipogénica después de subcultivarse un número determinado de veces.<sup>13</sup>

Por el contrario, las líneas celulares establecidas están constituidas por células transformadas espontáneamente a lo largo de sucesivos subcultivos o por transfección. Estas poblaciones tienen la capacidad de proliferar indefinidamente en cultivo y expresan algunas características terminales del linaje celular del que se originan.<sup>14</sup> Las líneas celulares 3T3-L1<sup>15</sup> y 3T3-F442A<sup>16</sup> son las más utilizadas para estudios *in vitro* del tejido adiposo.<sup>1</sup> Estas células derivaron por selección de una línea de fibroblastos embrionarios de ratón suizo inmortalizados mediante subcultivo serial rutinario.<sup>17</sup> 3T3-L1 fue la primera línea celular preadiposa reportada<sup>1</sup> y es hasta ahora la más utilizada en estudios de adipogénesis *in vitro* por su facilidad de cultivo, su alto potencial adipogénico y su disponibilidad para la

comunidad científica.<sup>18, 19</sup> Las células 3T3-L1, sin embargo, no se diferencian en adipocitos cuando se implantan en ratones atímicos, como sí lo hacen las células 3T3F442A, lo que indica que estas últimas responden a señales fisiológicas y podrían reflejar más adecuadamente la adipogénesis *in vivo*.<sup>11</sup>

El uso de líneas celulares murinas como modelos *in vitro* para estudios de adipogénesis humana presenta desventajas entre las que destacan las diferencias genéticas y metabólicas entre el tejido adiposo humano y murino.<sup>20</sup> Otros aspectos de las líneas celulares murinas en comparación con los cultivos primarios son los bajos niveles de expresión de leptina, la variación entre los *loci* genómicos regulados durante la adipogénesis y la imprecisión del tejido de origen de las células ya que provienen de embriones disgregados.<sup>21</sup>

Diversas líneas celulares derivadas de tejido adiposo humano han sido establecidas. Las células ASC52telo,<sup>22</sup> Chub-S7,<sup>23</sup> hASC-TE,<sup>5</sup> derivan de tejido adiposo subcutáneo y se immortalizaron por inserción de la retrotranscriptasa de la telomerasa humana,<sup>22</sup> la retrotranscriptasa y el gen E7 del virus del papiloma humano tipo 16<sup>23</sup> o la retrotranscriptasa y los genes E6 y E7 del mismo virus.<sup>5</sup> A pesar de su origen humano, estas líneas han sido poco usadas, posiblemente debido a su bajo potencial adipogénico y la falta de expresión de algunos marcadores moleculares de adipogénesis.<sup>5, 24</sup> Además, esas células no están disponibles en agencias distribuidoras de cultivos celulares como la Colección Europea de Cultivos Celulares (ECACC) o la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC).

Por lo anterior es clara la necesidad de contar con modelos experimentales *in vitro* adicionales que sean adecuados para estudiar el metabolismo del tejido adiposo humano. En nuestro laboratorio contamos con una cepa de preadipocitos subcutáneos humanos derivados de tejido adiposo subcutáneo de un donante masculino de 20 meses de edad, la cual mostró alto potencial proliferativo y adipogénico en los primeros subcultivos. Del 10<sup>o</sup> subcultivo de esta población se aisló la clona PASH-4 (Preadipocitos humanos subcutáneos clona 4) con potencial proliferativo y adipogénico similar a la población inicial (A. Montoya-Contreras, L.A. Salazar Olivo, resultados no publicados). En el presente estudio caracterizamos el potencial proliferativo y adipogénico de las células PASH-4 a fin de explorar su utilidad como modelo *in vitro* de la adipogénesis humana.

## **2. RESULTADOS**

### *2.1 Las células PASH-4 retienen su capacidad proliferativa durante 36 subcultivos*

La capacidad de proliferación *in vitro* de una población celular se evalúa con base en tres características principales: capacidad para soportar múltiples subcultivos seriales, tiempo de duplicación de la población y eficiencia de clonación. Para determinar la esperanza de vida de las células PASH-4, sometimos dos porciones de éstas a un protocolo de subcultivo serial con inóculo a densidad constante y se reinocularon al cuarto día de cultivo, como se describe en materiales y métodos. Bajo este protocolo las células PASH-4 soportaron 23 subcultivos seriales a lo largo de 90 días y mostraron proliferación durante los primeros 17 de estos subcultivos (Figura 1). Durante estos subcultivos, las poblaciones celulares se duplicaron 22 veces. Dado que la capacidad de proliferación se evaluó a partir del subcultivo 13, las células PASH-4 soportaron 36 subcultivos totales y se duplicaron 70 veces desde que fueron obtenidas en el cultivo primario.

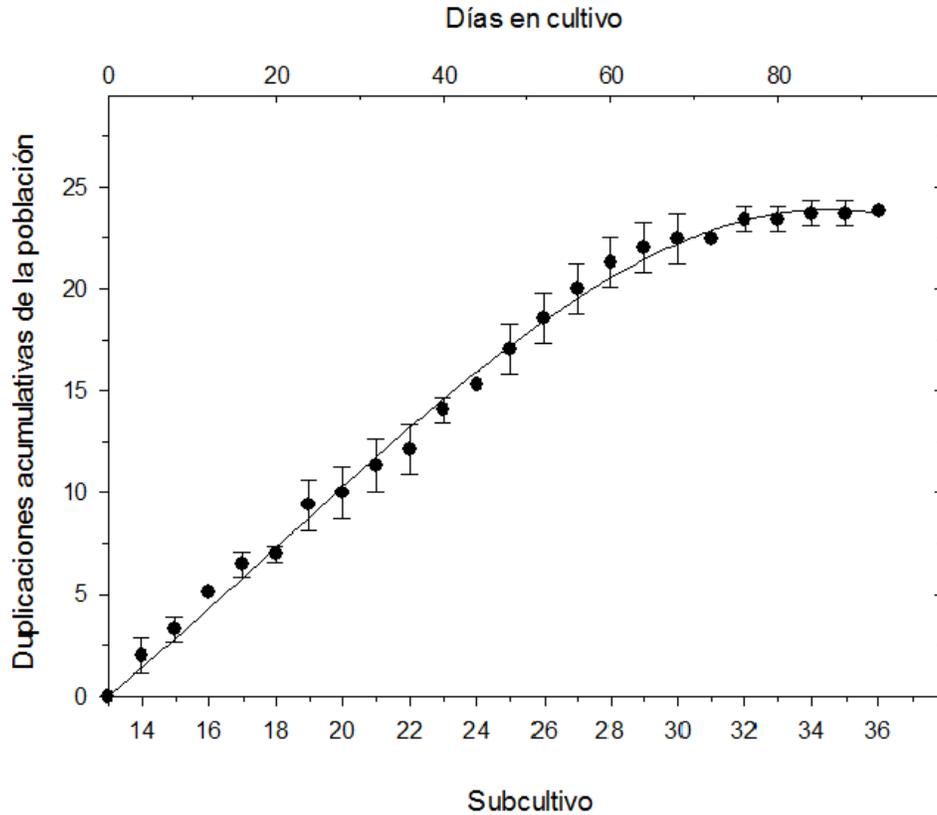


Figura 1. Duplicaciones acumulativas de la cepa PASH-4 en subcultivos sucesivos.

Además de la capacidad de subcultivo serial, el tiempo de duplicación permite analizar la capacidad proliferativa de una población celular en cultivo. El tiempo de duplicación es el tiempo que tarda la población en duplicarse en cultivo y se evalúa en la fase de crecimiento exponencial.<sup>25</sup> Las células PASH-4 del subcultivo 17, inoculadas a una densidad de  $5.3 \times 10^3$  células/cm<sup>2</sup>, mostraron una activa proliferación entre los días 2 y 6 de cultivo y alcanzaron la confluencia total hacia el día 10 de cultivo (Figura 2). El tiempo de duplicación de las células PASH-4 en este subcultivo fue de  $50 \pm 4$  h y alcanzaron la confluencia total a una densidad de  $13.1 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup>. La Figura 2 muestra también que en el subcultivo 26 el tiempo

de duplicación fue de  $143 \pm 18$  h llegaron a confluencia celular con una densidad de  $1.33 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup>.

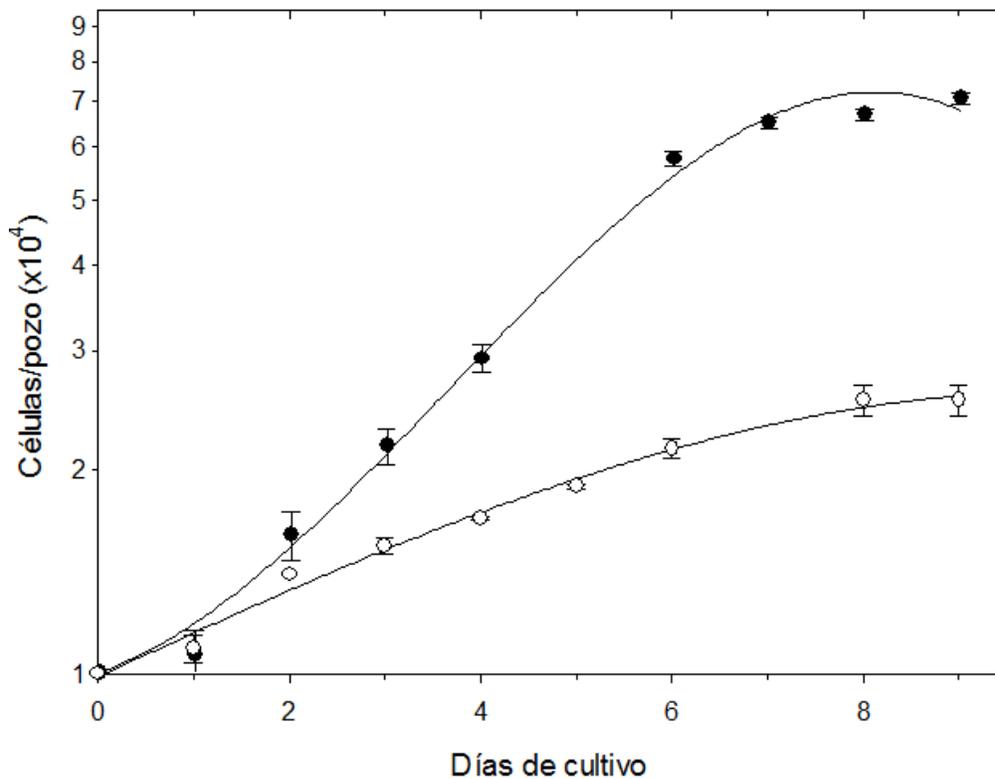


Figura 2. Capacidad de proliferación de las células PASH-4 de distintos subcultivos.

La eficiencia de clonación o capacidad clonogénica es la capacidad de las células para originar clonas o poblaciones derivadas de una sola célula fundadora y por lo tanto genéticamente homogéneas.<sup>26</sup> Nosotros evaluamos esta característica en subcultivos sucesivos de las células PASH-4. Los subcultivos 15, 17, 19, 21, 23 y 25 tuvieron eficiencias de clonación del 7%, 7%, 8%, 12%, 2% y 2%, respectivamente (Figura 3), y del subcultivo 26 en adelante no formaron clonas. Este resultado muestra que la población PASH-4 se mantiene vigorosa por 21 subcultivos aunque, su capacidad proliferativa disminuye a partir de este subcultivo.

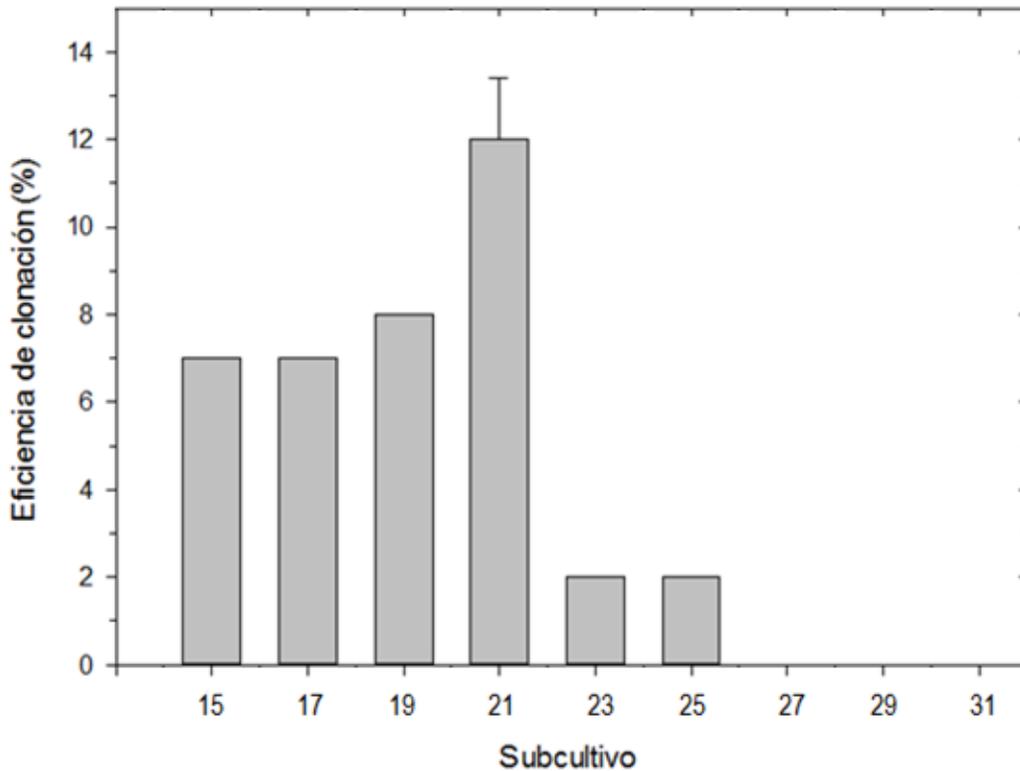


Figura 3. Eficiencia de clonación de las células PASH-4 a lo largo de subcultivos sucesivos.

## 2.2 Las células PASH-4 expresan marcadores de senescencia en subcultivos avanzados

La senescencia celular es una forma irreversible de detención del ciclo celular que se desencadena por eventos relacionados con el estrés, tales como daño al DNA, estrés oxidativo y disfunción de los telómeros. En cultivos de células humanas la senescencia se caracteriza por pérdida de las capacidades de proliferación y diferenciación en células que posean estas dos características.<sup>27</sup> La tinción histoquímica del marcador de  $\beta$ -galactosidasa asociado a la senescencia (SA- $\beta$ -Gal) permite evaluar las células senescentes en cultivo.<sup>28</sup> Las células PASH-4 se

analizaron cada cinco subcultivos para determinar la presencia de células senescentes. En los subcultivos 15, 20, 25, 30 y 35, las proporciones de células senescentes que expresaron el marcador SA- $\beta$ -Gal fueron del 1%, 25%, 27%, 45% y 95%, respectivamente (Figura 4) lo que demostró aumento progresivo de la senescencia a lo largo del subcultivo.

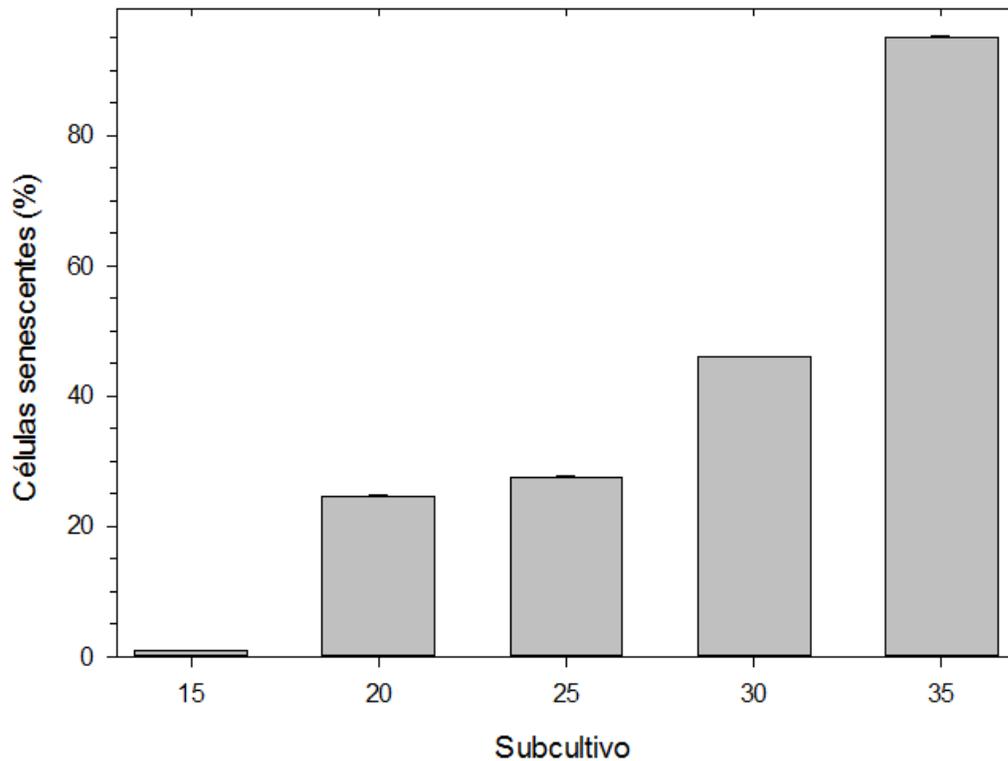


Figura 4. Eficiencia de clonación de las células PASH-4 a lo largo de subcultivos sucesivos.

### 2.3 Las células PASH-4 retienen el cariotipo diploide

El cultivo de células animales puede inducir alteraciones cromosómicas. El cariotipo consiste en el análisis visual y la determinación del número de cromosomas sirve como indicador de la estabilidad genética de las células.<sup>29</sup> Para

determinar el cariotipo de la cepa PASH-4 tratamos células del 20<sup>o</sup> subcultivo en crecimiento exponencial con colchicina y colorante de Giemsa en 13 preparaciones, 12 de las cuales (92.3%) presentaron un cariotipo normal 46XY y en la restante 45XY,-20 faltaba un cromosoma (Figura 5).

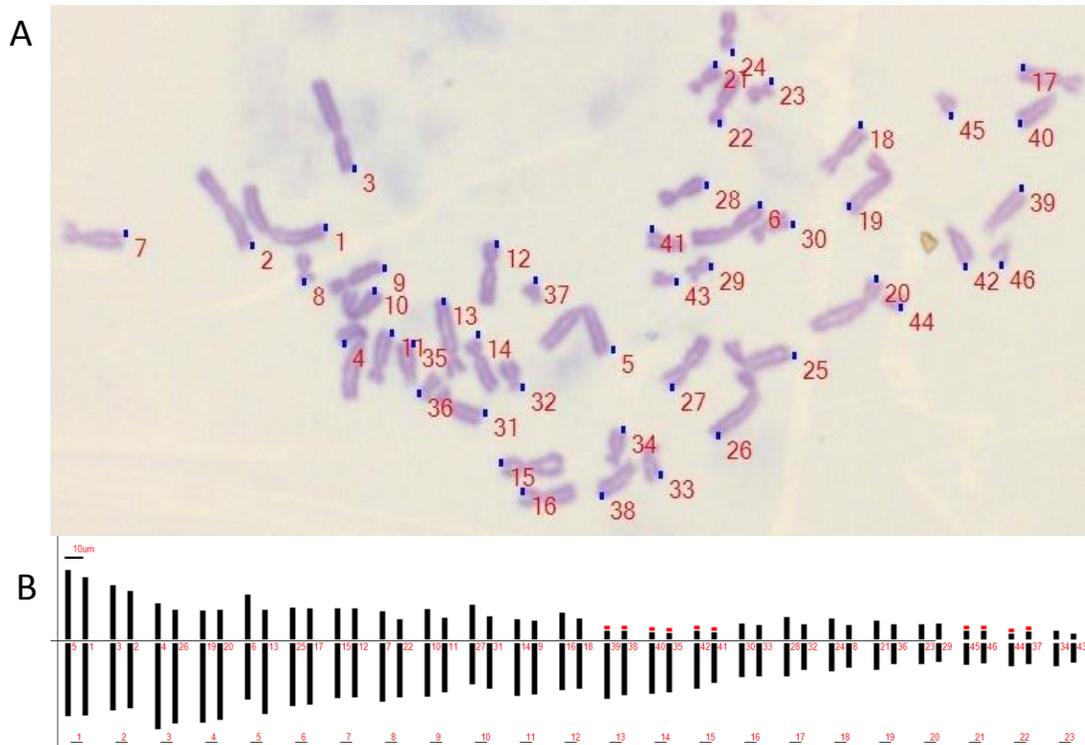


Figura 5. Cariograma de las células PASH-4 en su 20<sup>o</sup> subcultivo.

#### 2.4 Las células PASH-4 muestran una alta capacidad adipogénica aún en subcultivos tardíos

La capacidad de adipogénesis es el potencial de los preadipocitos para diferenciarse en adipocitos maduros, en un proceso gradual de modificaciones metabólicas, morfológicas y de expresión génica. Los preadipocitos en cultivo pueden inducirse a diferenciación terminal con una mezcla de agentes químicos y

hormonales.<sup>21</sup> La capacidad adipogénica de las poblaciones de preadipocitos en cultivos primarios tiende a disminuir conforme las células senescen, hasta perderla totalmente.<sup>30</sup> Evaluamos la capacidad adipogénica de las células PASH-4 de diferentes subcultivos induciendo la diferenciación como se detalla en Materiales y métodos. Las células PASH-4 retuvieron la capacidad de diferenciarse en adipocitos hasta el subcultivo 26, equivalente a la 66ª duplicación acumulativa, a juzgar por la presencia de células con numerosas inclusiones lipídicas intracitoplasmáticas (Figura 6). Las células PASH-4 de subcultivos posteriores al 26 no formaron adipocitos terminalmente diferenciados (datos no mostrados).

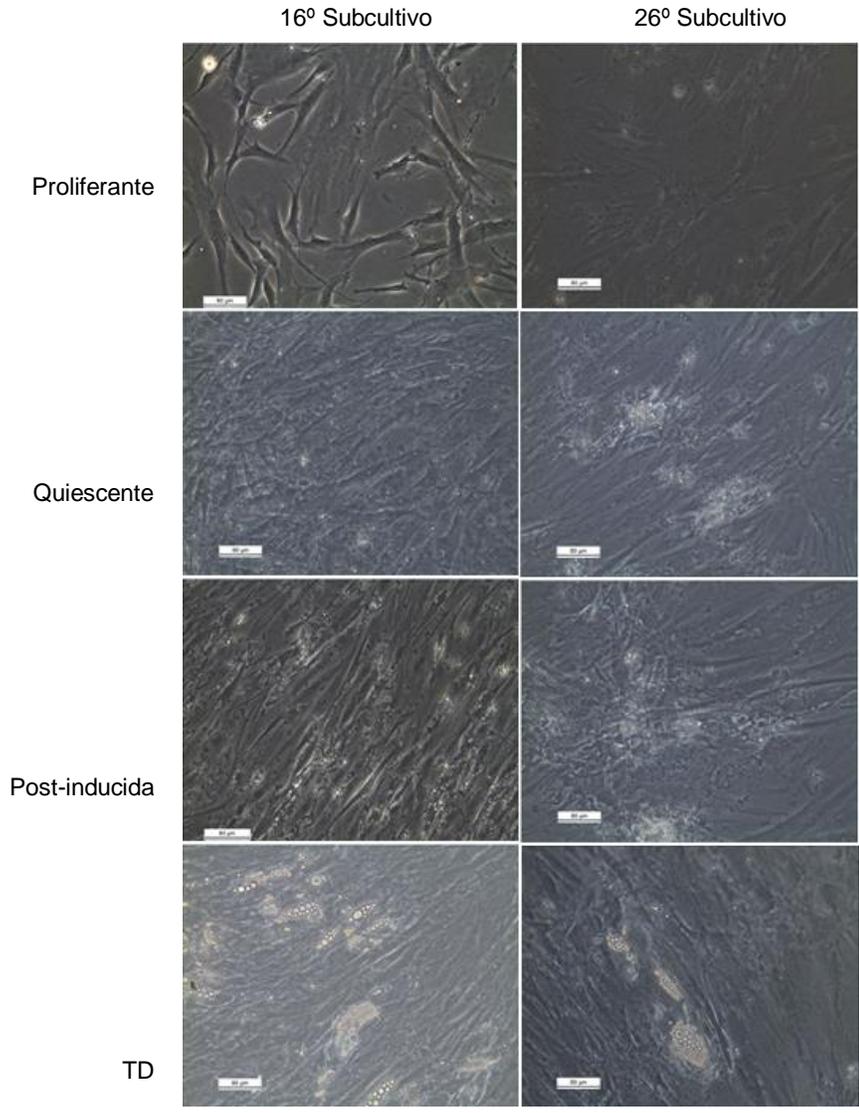


Figura 6. Adipogénesis *in vitro* de las células PASH-4 en los subcultivos 15 y 23 mantenidos en las condiciones señaladas.

También cuantificamos la acumulación intracitoplasmática de triglicéridos, el rasgo más evidente de los adipocitos terminalmente diferenciados, mediante tinción de los cultivos con Rojo Oleoso O.<sup>31</sup> La Figura 7 muestra que células PASH-4 del subcultivo 16, inducidas a diferenciación adiposa, incrementaron la acumulación

lipídica respecto al control (células del mismo subcultivo no tratadas con el medio de inducción). La Figura 7 muestra también que células PASH-4 de subcultivos posteriores, 20 y 23 mantuvieron e incrementaron la acumulación lipídica respecto a las células control y a las células inducidas del subcultivo 16. Este resultado indica que la cepa PASH-4 tiene un potencial adipogénico creciente hasta el subcultivo 23.

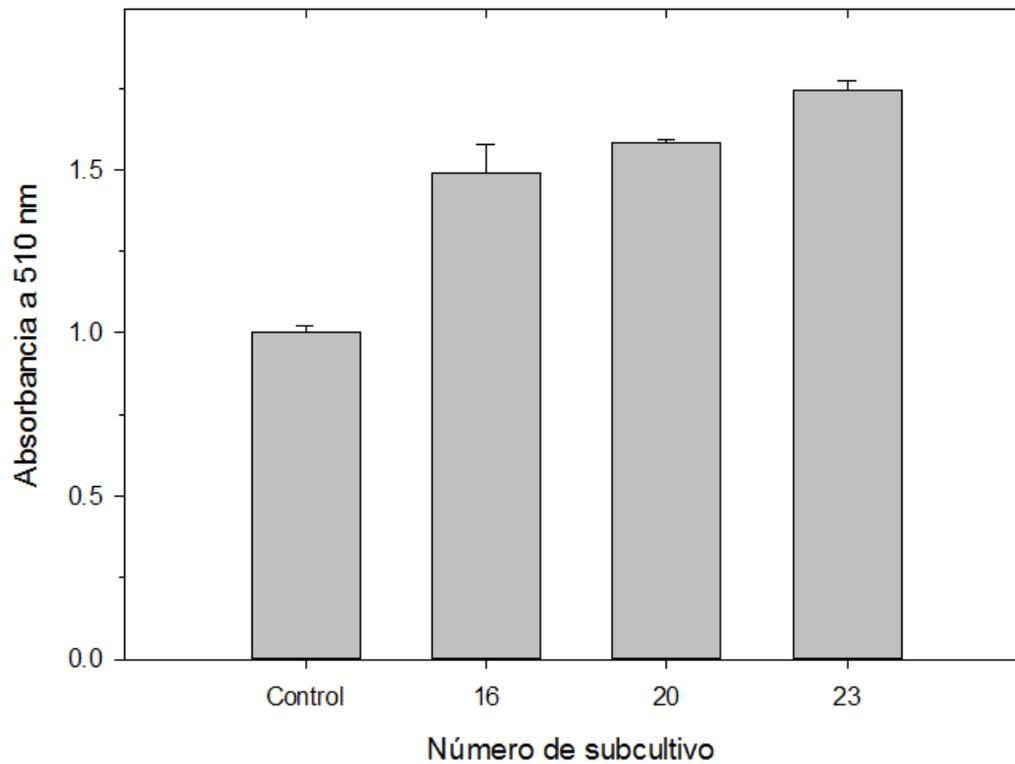


Figura 7. Retención de la capacidad adipogénica de las células PASH-4.

Diversos genes están involucrados en el proceso de la adipogénesis. Las proteínas alfa, beta y delta de unión a secuencias CCAAT (C/EBP- $\alpha$ , - $\beta$  y - $\delta$ ) y el receptor gama activado por proliferadores de peroxisomas (PPAR $\gamma$ ), son genes que se activan progresivamente en el curso de la adipogénesis. <sup>11</sup> Evaluamos la expresión de los marcadores adipogénicos tempranos C/EBP- $\beta$  y C/EBP- $\delta$  en diferentes estadios de diferenciación de células PASH-4 de subcultivos tempranos (subcultivo 15) y tardíos (subcultivo 23). Los estadios de diferenciación analizados fueron preadipocitos proliferantes, preadipocitos quiescentes, células inducidas a diferenciación y adipocitos terminales. La Figura 8 muestra que las células PASH-4 expresan los marcadores adipogénicos C/EBP $\beta$  y C/EBP $\delta$  en estadios previos a la inducción de diferenciación y en la diferenciación terminal.

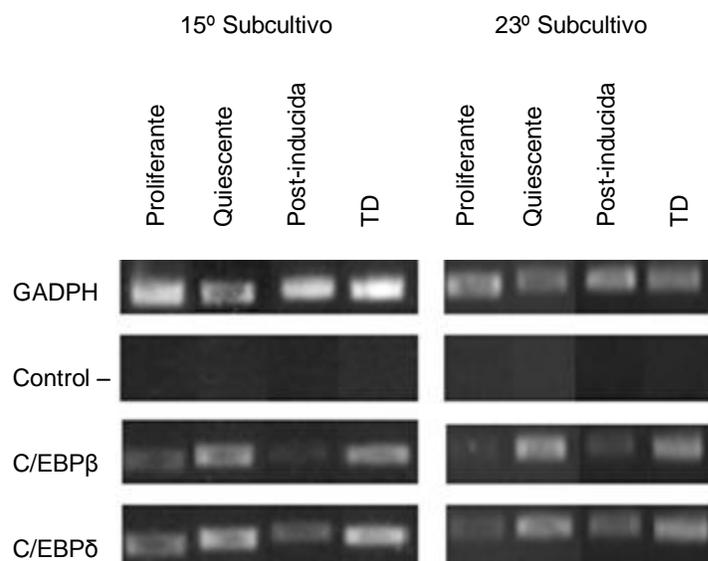


Figura 8. Expresión de marcadores adipogénicos en células PASH-4.

#### 4. DISCUSIÓN

Los preadipocitos 3T3 de ratón son un modelo experimental ampliamente usado para el estudio *in vitro* de la adipogénesis en mamíferos, pero no óptimo para el estudio de la adipogénesis humana.<sup>31-33</sup> El establecimiento de modelos adipogénicos adecuados para estudios *in vitro* facilitaría grandemente el estudio del desarrollo y el metabolismo de las distintas poblaciones adiposas humanas y sus aplicaciones en terapia génica e ingeniería de tejidos.<sup>6,34</sup> Múltiples laboratorios han tratado de conseguir un modelo de adipogénesis humano adecuado, sin conseguirlo.<sup>35,36</sup>

Las células PASH-4 son una población de naturaleza clonal capaz de soportar hasta 36 subcultivos y al menos 70 duplicaciones de la población a partir de su origen como cultivo primario. Se sabe que las células humanas diploides normales soportan  $50 \pm 10$  duplicaciones de la población en cultivo según Hayflick.<sup>12</sup> Los modelos de preadipocitos primarios hASCs-M,<sup>5</sup> hMSC<sup>24</sup> y HNPA,<sup>37</sup> han logrado duplicarse 20, 24 y 71.18 veces en cultivo, respectivamente. Lo anterior nos permite concluir que la población PASH-4 tiene una alta capacidad de proliferación a largo plazo (70 duplicaciones).

El tiempo de duplicación de una población celular normal depende del subcultivo en que se encuentre y se sabe que las células humanas normales se duplican aproximadamente cada 48 h en cultivo. El tiempo de duplicación de las células PASH-4 del subcultivo 17 fue de  $50 \pm 4$  h, similar al tiempo de duplicación promedio de las células humanas normales y menor que el reportado para otras poblaciones de preadipocitos humanos en cultivo: las células PLA,<sup>6</sup> HNPA<sup>37</sup> y

hASCs-M<sup>5</sup> se duplican cada 60 h,  $59.8 \pm 10.4$  h y  $53.2 \pm 9.3$  h respectivamente. Aunque las células SGBS, otra cepa de preadipocitos humanos con alta capacidad de diferenciación<sup>13</sup> muestran un tiempo de duplicación sensiblemente menor ( $38.4 \pm 1$  h),<sup>13</sup> estas células derivan de un paciente con síndrome de Simpson-Golabi-Behmel y no representan un modelo de tejido adiposo humano normal. Por lo tanto, podemos concluir que la cepa PASH-4 muestra menores tiempos de duplicación de la población que otras poblaciones de preadipocitos humanos en cultivo.

La cepa PASH-4 es una población celular mayormente normal a juzgar por su cariotipo diploide normal (46XY). La presencia de esta condición al menos hasta el subcultivo 20, indica estabilidad genética de la población y sugiere una expresión génica normal en condiciones *in vitro*.<sup>29</sup> Otras poblaciones de células adiposas humanas como las células SGBS<sup>13</sup> y LS14<sup>38</sup>, por su obtención de tejido graso anormal o de tumores presentan anomalías en su complemento cromosómico.

Dada su condición cromosómica normal, las células PASH-4 mostraron senescencia. Esta característica se hizo evidente por la pérdida de las capacidades proliferativa y adipogénica de las células y por el aumento en la expresión del marcador SA- $\beta$ -Gal a medida que las poblaciones PASH-4 son subcultivadas (Figura 5). La senescencia también se caracteriza por cambios morfológicos en las células, como un aumento en el tamaño celular debido a modificaciones estructurales, así como cambios fenotípicos en la matriz extracelular secretada.<sup>30</sup> Las células PASH-4 presentaron cambios en el tamaño celular en distintos subcultivos, ya que el número requerido para la confluencia celular varió de

$13.1 \times 10^4/\text{cm}^2$  a  $1.33 \times 10^4/\text{cm}^2$  en los subcultivos 17 y 26 respectivamente (Figura 2). Otra prueba de que las células PASH-4 senescieron fue disminución en las proporciones de adipocitos maduros en los subcultivos 15 y 23, (Figura 6).<sup>39</sup> Todo lo anterior muestra que la cepa PASH-4 a pesar de tener características proliferativas favorables, presenta un tiempo de vida limitado.

La cascada transcripcional desencadenada en la adipogénesis involucra la expresión de los marcadores moleculares C/EBP $\beta$  y C/EBP $\delta$  durante las primeras horas de inducción adiposa.<sup>19</sup> Los marcadores moleculares C/EBP $\beta$  y C/EBP $\delta$  activan transcripcionalmente a C/EBP $\alpha$  que en conjunto con PPAR $\gamma$  coordinan la diferenciación terminal de las células preadiposas.<sup>11, 19</sup> El potencial de diferenciación adiposa fue evaluado mediante la expresión de los marcadores moleculares adipogénicos C/EBP- $\beta$  y - $\delta$  en subcultivos tempranos y tardíos. La población PASH-4 expresó los marcadores moleculares C/EBP $\beta$  y C/EBP $\delta$  en todos los estadios (Figura 8) a diferencia de la población primaria HNPA<sup>37</sup> y de la línea celular múrida 3T3-L1,<sup>11</sup> que solo expresan estos marcadores moleculares después de la inducción adiposa.<sup>39</sup> La expresión de los marcadores moleculares C/EBP $\beta$  y C/EBP $\delta$  en el estadio preconfluyente, explica que la población PASH-4 está predispuesta a diferenciarse en adipocitos maduros. Por otra parte, la cuantificación de Rojo Oleoso O se utilizó para evaluar la capacidad adipogénica de la población PASH-4, la acumulación lipídica de los adipocitos maduros aumento conforme las células fueron subcultivadas. Sin embargo, el aumento de la acumulación de lípidos se vio aceleradamente disminuido después del subcultivo 23 (datos no mostrados), esta pérdida de la capacidad adipogénica corresponde con lo sucedido a modelos

*in vitro* descritos antes. Por ejemplo, las células SGBS <sup>13</sup> y precursores de adipocitos condicionalmente inmortalizados por la expresión del antígeno T del Virus 40 del simio, pierden su capacidad de adipogénesis después del 5<sup>o</sup> subcultivo. <sup>40</sup> También, las células PLA <sup>6</sup> y SGBS <sup>13</sup> mantienen la capacidad adipogénica hasta su 25<sup>a</sup> y 50<sup>a</sup> duplicación respectivamente. Sin embargo, las células PASH-4 mantienen la capacidad de diferenciarse en adipocitos maduros hasta el 26<sup>o</sup> subcultivo equivalente a su 66<sup>a</sup> duplicación, lo cual establece una grande ventaja con respecto a otros modelos de la adipogénesis humana.

En resumen, podemos concluir que la cepa PASH-4, población clonal de preadipocitos subcutáneos humanos normales con cariotipo diploide normal y alto potencial proliferativo y adipogénico, es un modelo *in vitro* eficiente pero transitorio de la adipogénesis humana. La inmortalización de las células PASH-4 podría dar lugar a un nuevo modelo celular adecuado y permanente para el estudio *in vitro* de la adipogénesis humana.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### *Células PASH-4*

Una muestra de tejido adiposo subcutáneo inguinal de un paciente masculino (20 meses de edad) sometido a cirugía correctiva de sindactilia en los dedos 3º y 4º de la mano derecha en el Hospital del Niño y la Mujer (San Luis Potosí, México) se obtuvo con el consentimiento informado de los padres y de acuerdo con los lineamientos del Comité de Ética del Hospital. Para la obtención de preadipocitos primarios, el tejido se disgregó por el método mecánico-enzimático descrito por Herrera-Herrera y cols.<sup>37</sup> La fracción del estroma vascular se obtuvo de lavar y picar finamente la muestra de tejido adiposo, digerir con colagenasa tipo II (Sigma-Aldrich) centrifugar a baja velocidad y resuspender las células. Los preadipocitos aislados se subcultivaron varias veces y del 10º subcultivo de esta población se aisló una clona denominada PASH- (Preadipocitos humanos subcutáneos clona 4) que mostró un alto potencial proliferativo y adipogénico similar al de la población parental (Montoya-Contreras A, Salazar-olivo LA, resultados no publicados). El presente trabajo muestra la caracterización de la población PASH-4 a partir del 13º subcultivo serial de la población inicial (~45 duplicaciones acumulativas).

### *Evaluación de la capacidad proliferativa en subcultivo*

El potencial proliferativo de largo plazo de las células PASH-4 se evaluó al realizar subcultivos seriales con inóculos de  $3.4 \times 10^3$  células/cm<sup>2</sup> en medio de cultivo basal (MB). El cual contiene L15-Medium Leibovitz (GIBCO) suplementado con 5% de suero fetal bovino, 5% de suero de ternera (Hyclone), Penicilina 80 U/ml y Estreptomina 80 µg/ml (Sigma-Aldrich). Las células se cosecharon al cuarto día

de cultivo de manera regular. Los cultivos se mantuvieron a 37°C en una atmósfera humidificada de libre intercambio de gases. Para cada subcultivo las células se cosecharon con tripsina al 0.15% (Sigma-Aldrich) y EDTA al 0.02% (J.T. Baker). Las células se centrifugaron a 4,300 rpm por 5 min y se contaron en hematímetro. El número de duplicaciones acumulativas se calculó mediante la fórmula:  $PD (n / (n-1)) = \log (N_n / N_{n-1}) / \log 2$ , en la que n es el subcultivo y N es el número de células. <sup>24</sup>

#### *Determinación del tiempo de duplicación*

El tiempo de duplicación de las células PASH-4 en los subcultivos 17 y 26 fue determinado al inocular células a una densidad de  $5.3 \times 10^3$  células/cm<sup>2</sup> en MB a 37°C en una atmósfera humidificada de libre intercambio de gases, con cambio de MB cada tercer día. Se realizaron conteos en hematímetro cada 24 h por 8 a 10 días. El tiempo de duplicación se calculó mediante la fórmula:  $48h / \log_2 (N_2 / N_1)$ , (N<sub>1</sub>: primer conteo celular; N<sub>2</sub>: conteo celular 48 h después). <sup>25</sup>

#### *Capacidad clonogénica*

La eficiencia de clonación de las células PASH-4 fue evaluada en cultivos de baja densidad (100 células/ caja de cultivo de 60 mm), inoculados y mantenidos por 15 días en MB a 37°C en una atmósfera humidificada de libre intercambio de gases, con cambio de MB cada tercer día. Para realizar el experimento se utilizaron células PASH-4 sometidas a subcultivo serial de cada dos subcultivos. Al cabo, las colonias se fijaron con formaldehído al 3.7% por 30 min a 4°C y se tiñeron con hematoxilina de Harris (Jalmek). El criterio utilizado para la cuantificación de colonias consistió en considerar a una colonia como un grupo independiente de células formado por más de 50 células.

### *Porcentaje de células senescentes*

Las células PASH-4 sometidas a subcultivo serial se analizaron cada cinco subcultivos para determinar la presencia de células senescentes. Se inocularon  $2.2 \times 10^3$  células/cm<sup>2</sup> en MB y se mantuvieron a 37°C en una atmósfera humidificada de libre intercambio de gases. Al cabo de tres días, algunas cajas de cultivo se usaron para determinar la densidad celular mediante recuentos en hematómetro y otras para identificar por microscopía en campo claro las células senescentes (color azul) que expresaron  $\beta$ -galactosidasa. Las células PASH-4 se evaluaron con Senescence Cells Histochemical Staining Kit (Sigma-Aldrich).

### *Cariotipo*

El análisis citogenético fue desarrollado en el 20<sup>o</sup> subcultivo. Cultivos de células PASH-4 en fase de crecimiento exponencial se trataron con colchicina 0.1  $\mu$ g/ml (Sigma-Aldrich) por 1 h. Después de ser cosechadas las células, se aplicó un tratamiento hipotónico con KCl al 0.4% por 13 min y se fijó usando una solución de metanol-ácido acético glacial 3:1. Los cromosomas se fijaron por goteo de la solución sobre cubreobjetos previamente limpios. El procedimiento de tinción de cromosomas se llevó a cabo incubando las muestras en solución Giemsa (1:20) (Sigma-Aldrich) por 5 min. Todos los cubreobjetos se escanearon y los cromosomas en metafase se analizaron visualmente. Se tomaron micrografías en un microscopio Zeiss de las preparaciones cromosómicas que reunieron las condiciones adecuadas para un análisis confiable y un ejemplo representativo fue analizado en el software KaryoType 2 (College of Life Sciences, Sichuan University).

### *Diferenciación de preadipocitos y cuantificación de Rojo Oleoso O*

La capacidad de diferenciación adiposa de las células PASH-4 se evaluó al inocularlas a una densidad de  $5.3 \times 10^3$  células/cm<sup>2</sup> y mantenerlas en MB hasta llegar a confluencia total. Posteriormente las células PASH-4 se expusieron a un medio de inducción adiposa (MDI) por 6 días. El MDI consiste en Medio Leibovitz L15 (GIBCO), 5% de suero fetal bovino (Hyclone), insulina 100 nM, biotina 33 µM, pantotenato de calcio 17 µM, cortisol 100 nM, Transferrina/triyodotironina 5 µg/ml/2 nM, dexametasona 100 nM, isobutil-metil-xantina 500 µM (Sigma-Aldrich), rosiglitazona 1 µM (Cayman Chemical), Penicilina 40 U/ml y Estreptomicina 40 µg/ml (Sigma-Aldrich). Al cabo, las células se mantuvieron en medio de mantenimiento (MM) por 15 días adicionales. El medio MM consiste en L15-Medium Leibovitz (GIBCO), 5% de suero fetal bovino, Insulina 100 nM, biotina 33 µM, pantotenato de calcio 17 µM, cortisol 100 nM, Transferrina/triyodotironina 5 µg/ml/2 nM, Penicilina 80 U/ml y Estreptomicina 80 µg/ml (Sigma-Aldrich). Al término, la diferenciación adiposa fue cuantificada por la acumulación lipídica intracelular de Rojo Oleoso O. <sup>4</sup> Para ello las monocapas celulares se fijaron con formaldehído al 3.7% por 30 min a 4°C y se incubaron toda la noche con Rojo Oleoso O, éste fue extraído con isopropanol al 100% y fue medido en un espectrofotómetro SmartSpec Plus (Bio-Rad) a 510 nm. <sup>31</sup>

### *Aislamiento de RNA, síntesis de cDNA y PCR punto final*

Para el análisis de expresión de genes, RNA total de diferentes condiciones celulares fue aislado de los subcultivos 15 y 23. Condición proliferante (~80% de confluencia en MB), quiescente (confluencia total en MB), post-inducida (quiescente

con 5 a 6 días en MDI) y terminalmente diferenciada (células quiescentes mantenidas 6 días en MDI y 15 días adicionales en MM). Las células PASH-4 se lavaron con PBS y el RNA fue aislado usando TRIzol® (Invitrogen) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. El RNA fue cuantificado en un espectrómetro Epoch (BioTek) y su integridad fue evaluada por electroforesis en gel de agarosa al 1.5 % teñido con bromuro de etidio. El retrotranscrito fue sintetizado de 1 µg de RNA total en un volumen de reacción de 25 µl, conteniendo buffer RT 4 µl, dNTPs 0.5 mM, RNasin 25 U y M-MLV RT por 90 min a 42°C. El cDNA obtenido fue utilizado para desarrollar la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), en un volumen de reacción de 15 µl. Una reacción de PCR contiene 3 µl buffer de reacción, cDNA300 ng, dNTPs 200 µM, MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM, Go Taq Flexi DNA polymerase 1.25 U y primers específicos 0.2 µM indicados en la Tabla1 para cada gen. Todos los reactivos usados fueron de Promega. Se realizó electroforesis de los productos de amplificación en un gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio y analizados con el sistema Gel Doc XR + (Bio-Rad).

## 6. REFERENCIAS

1. Gregoire FM, Smas CM, Sul HS. Understanding adipocyte differentiation. *Physiol Rev* 1998; 78: 783-809.
2. Aragonès G, Ardid-Ruiz A, Ibars M, Suárez M, Blade C. Modulation of leptin resistance by food compounds. *Mol Nutr Food Res* 2016; 00: 1-15.
3. A. Catteau A, Caillon H, Barrière P, Denis MG, Masson D, Fréour T. Leptin and its potential interest in assisted reproduction cycles. *Hum Reprod Update* 2016; 22: 320-341.
4. Janderová L, McNeil M, Murrell AN, Mynatt RL, Smith SR. Human mesenchymal stem cells as an in vitro model for human adipogenesis. *Obes Res* 2003; 11: 65-74.
5. Balducci L, Blasi A, Saldarelli M, Soletti A, Pessina A, Bonomi A, Coccè V, Dossena M, Tosetti V, Valentina Ceserani V, et al. Immortalization of human adipose-derived stromal cells: production of cell lines with high growth rate, mesenchymal marker expression and capability to secrete high levels of angiogenic factors. *Stem Cell Res Ther* 2014; 5: 63.
6. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, Benhaim P, Lorenz HP, Hedrick MH. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng* 2001; 7: 211-228.
7. Wankhade UD, Shen M, Kolhe R, Fulzele S. Advances in adipose-derived stem cells isolation, characterization, and application in regenerative tissue engineering. *Stem Cells Int* 2016; 3206807.
8. Gokce A, Peak TC, Abdel-Mageed AB, Hellstrom WJ. Adipose tissue-derived stem cells for the treatment of erectile dysfunction. *Andrology* 2014; 2: 244-51.

9. Onesti MG, Carella S, Ceccarelli S, Marchese C, Scuderi N. The use of human adipose-derived stem cells in the treatment of physiological and pathological vulvar dystrophies. *Stem Cells Int* 2016; 2561461.
10. Jozefczuk J, Drews K, Adjaye J. Preparation of mouse embryonic fibroblast cells suitable for culturing human embryonic and induced pluripotent stem cells. *J Vis Exp* 2012; e3854 10.3791/3854.
11. Armani A, Mammi C, Marzolla V, Calanchini M, Antelmi A, Rosano G, Fabbri A, Caprio M. Cellular models for understanding adipogenesis, adipose dysfunction, and obesity. *J Cell Biochem* 2010; 110: 564–572.
12. Hayflick L. The limited *in vitro* lifetime of human diploid cell strains. *Exp cell Res* 1965; 37: 614-636.
13. Wabitsch M, Brenner RE, Melzner I, Braun M, MoÈller P, Heinze Ey, Debatin KM, Hauner H. Characterization of a human preadipocyte cell strain with high capacity for adipose differentiation. *Int J Obesity* 2001; 25: 8-15.
14. Freshney RI. *Culture of Animal Cells: A manual of basic technique and specialized applications*. 6th ed. Wiley-Blackwell, 2010, 163-282 p.
15. Green H, Kehinde O. An established pre-adipose cell line and its differentiation in culture II. Factors affecting the adipose conversion. *Cell* 1975; 5: 19-27.
16. Green H, Kehinde O. Spontaneous heritable changes leading to increased adipose conversion in 3T3 cells. *Cell* 1976; 7: 105-113.
17. Todaro GJ, Green H. Quantitative studies of the growth of mouse embryo cells in culture and their development into established lines. *J Cell Biol* 1963; 17: 299-313.

- 18.Green H, Meuth M. An established pre-adipose cell line and its differentiation in culture. *Cell* 1974; 3:127-133.
- 19.Lane MD, Tang QQ, Jiang MS. Role of the CCAAT enhancer binding proteins (C/EBPs) in adipocyte differentiation. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 266: 677-683.
- 20.Mikkelsen TS, Xu Z, Zhang X, Wang L, Gimble JM, Lander ES, Rosen ED. Comparative epigenomic analysis of murine and human adipogenesis. *Cell* 2010; 143: 156-169.
- 21.Cristancho AG, Lazar MA. Forming functional fat: a growing understanding of adipocyte differentiation. *Nature* 2011; 12: 722-734.
- 22.Wolbank S, Stadler G, Peterbauer A, Gillich A, Karbiener M, Streubel B, Wieser M, Katinger H, van Griensven M, Redl H, et al. Telomerase immortalized human amnion- and adipose-derived mesenchymal stem cells: Maintenance of differentiation and immunomodulatory characteristics. *Tissue Eng Part A* 2009; 15: 1843-1854.
- 23.Darimont C, Zbinden I, Avanti O, Leone-Vautravers P, Giusti V, Burckhardt P, Pfiefer AM, Macé K. Reconstitution of telomerase activity combined with HPV-E7 expression allow human preadipocytes to preserve their differentiation capacity after immortalization. *Cell Death Diff* 2003; 10: 1025-31.
- 24.Böcker W, Yin Z, Drosse I, Haasters F, Rossmann O, Wierer M, Popov C, Locher M, Mutschler W, Docheva D, et al. Introducing a single-cell-derived human mesenchymal stem cell line expressing hTERT after lentiviral gene transfer. *J Cell Mol Med* 2008; 12: 1347-59.

25. Suga H, Shigeura T, Matsumoto D, Inoue K, Kato H, Aoi N, Murase S, Sato K, Gonda K, Koshima I, et al. Rapid expansion of human adipose-derived stromal cells preserving multipotency. *Cytotherapy* 2007; 9: 738-745.
26. Cordeiro-Spinetti E, de Mello W, Trindade LS, Taub DD, Taichman RS, Balduino A. Human bone marrow mesenchymal progenitors: perspectives on an optimized invitro manipulation. *Front Cell Dev Biol* 2014; 2: 1-8.
27. Arriazu E, de Galarreta MR, Cubero FJ, Varela-Rey M, Pérez MP, Leung TM, Lopategi A, Benedicto A, Abraham-Enachescu I, Nieto N. Extracellular Matrix and Liver Disease. *Antioxid Redox Signal* 2014; 21: 1078-1097.
28. Pazolli E, Stewart SA. Senescence: the good the bad and the dysfunctional. *Curr Opin Genet Dev* 2008; 18: 42-47.
29. Wang Y, Huso DL, Harrington J, Kellner J, Jeong DK, Turney J. Outgrowth of a transformed cell population derived from normal human BM mesenchymal stem cell culture. *Cytotherapy* 2005; 7: 509-19.
30. Bonab MM, Alimoghaddam K, Talebian F, Ghaffari SH, Ghavamzadeh A, Nikbin B. Aging of mesenchymal stem cell in vitro. *BMC Cell Biology* 2006; 7: 14.
31. Yamamoto Y, Gesta S, Lee KY, Tran TT, Saadatirad P, Kahn CR. Adipose depots possess unique developmental gene signatures. *Obesity* 2010; 18: 872-878.
32. Mori S, Kiuchi S, Ouchi A, Hase T, Murase T. Characteristic expression of extracellular matrix in subcutaneous adipose tissue development and adipogenesis; comparison with visceral adipose tissue. *Int J Biol Sci* 2014; 10: 825-833.

33. Lee MJ, Wu Y, Fried SK. Adipose Tissue Heterogeneity: Implication of depot differences in adipose tissue for Obesity Complications. *Mol Aspects Med* 2013; 34: 1-11.
34. Xu C, Jiang J, Sottile V, McWhir J, Lebkowski J, Carpentera MK. Immortalized fibroblast-like cells derived from human embryonic stem cells support undifferentiated cell growth. *Stem Cells* 2004; 22: 972-980.
35. Ramirez-Zacarias JL, Castro-Mufiozledo F, Kuri-Harcuch W. Quantitation of adipose conversion and triglycerides by staining intracytoplasmic lipids with Oil red O. *Histochemistry* 1992; 97: 493-497
36. Okamoto T, Aoyama T, Nakayama T, Nakamata T, Hosaka T, Nishijo K, Nakamura T, Kiyono T, Toguchida J. Clonal heterogeneity in differentiation potential of immortalized human mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 295: 354-361.
37. Herrera-Herrera MI, Zapata-Bustos R, Salazar-Olivo LA. Simplified culture techniques for growth and differentiation of murine and human pre-adipocytes for translational applications. *Cytotherapy* 2009; 11: 52-60.
38. Hugo ER, Brandebourg TD, Comstock CE, Gersin KS, Sussman JJ, Ben Jonathan N. LS14: a novel human adipocyte cell line that produces prolactin. *Endocrinology* 2006; 147: 306-13.
39. Cowherd RM, Lyle RE, McGehee RE. Molecular regulation of adipocyte differentiation. *Sem Cell Dev Biol* 1999; 10: 3-10.
40. Church C, Brown M, Rodeheffer MS. Conditional immortalization of primary adipocyte precursor cells. *Adipocyte* 2014; 0: 1-9.

## PIES DE FIGURA

**Figura 1.** Duplicaciones acumulativas de la cepa PASH-4 en subcultivos sucesivos.

Preadipocitos humanos subcutáneos PASH-4 en su 13<sup>o</sup> subcultivo se sometieron a subcultivo serial inoculando  $3.3 \times 10^3$  células/cm<sup>2</sup> en MB, cosechando de manera regular las células al cuarto día de cultivo y reinoculando nuevos cultivos a la densidad celular inicial. Los cultivos se mantuvieron a 37°C en una atmósfera humidificada de libre intercambio de gases.

**Figura 2.** Capacidad de proliferación de las células PASH-4 de distintos subcultivos.

Células PASH-4 en su 17<sup>o</sup> ( ) y 26<sup>o</sup> ( ) subcultivos seriales se inocularon a una densidad de  $5.3 \times 10^3$  células/cm<sup>2</sup> y se mantuvieron a 37°C en una atmósfera humidificada de libre intercambio de gases con cambio de medio de cultivo MB cada tercer día. En los días señalados la densidad celular se determinó mediante recuento celular en hematómetro.

**Figura 3.** Eficiencia de clonación de las células PASH-4 a lo largo de subcultivos sucesivos.

Células PASH-4 del subcultivo señalado se inocularon a una densidad de 100 células/ caja de cultivo de 60 mm y se mantuvieron por 15 días a 37°C en una atmósfera humidificada de libre intercambio de gases, con cambio de MB cada cinco días. Al cabo, las colonias se fijaron con formaldehído al 3.7% y se tiñeron con hematoxilina de Harris para su cuantificación.

**Figura 4.** Senescencia de las células PASH-4 de distintos subcultivos.

Células PASH-4 de los subcultivos señalados se inocularon a una densidad de  $2.2 \times 10^3$  células/cm<sup>2</sup> y se incubaron a 37°C en una atmósfera humidificada de libre intercambio de gases. Al tercer día, algunas de las cajas se usaron para determinar

la densidad celular mediante recuentos en hematómetro y otras se usaron para determinar la expresión de  $\beta$ -galactosidasa.

**Figura 5.** Cariograma de las células PASH-4 en su 20<sup>o</sup> subcultivo. Cultivos de células PASH-4 en fase de crecimiento exponencial se trataron con colchicina 0.1  $\mu$ g/ml por 1 h. Después los cromosomas se fijaron con una solución de metanol-ácido acético glacial 3:1 y se tiñeron con solución Giemsa. El análisis se realizó usando el software KaryoType 2 (College of Life Sciences, Sichuan University). A: microfotografía representativa, B: cariograma.

**Figura 6.** Adipogénesis *in vitro* de las células PASH-4. Células PASH-4 en los subcultivos 15<sup>o</sup> y 23<sup>o</sup> se fotografiaron en diferentes condiciones. Condición proliferante (~80% de confluencia en MB), quiescente (confluencia total en MB), post-inducida (quiescente con 6 días en MDI) y terminalmente diferenciada (TD; células quiescentes mantenidas por 6 días en MDI y por 15 días adicionales en MM). Todos los cultivos se incubaron a 37°C en una atmósfera humidificada de libre intercambio de gases.

**Figura 7.** Retención de la capacidad adipogénica de las células PASH-4. Cultivos de células PASH-4 en su 16<sup>o</sup>, 20<sup>o</sup> y 23<sup>o</sup> subcultivo se mantuvieron en MB hasta llegar a confluencia, se indujeron por 6 días en MDI y mantuvieron por 15 días adicionales en MM. Al término, los cultivos se fijaron con formaldehído al 3.7% y teñidos con Rojo Oleoso O. La acumulación lipídica intracelular fue cuantificada al extraer el colorante de las monocapas celulares con isopropanol al 100% y medir la absorbancia en espectrofotómetro SmartSpec Plus (Bio-Rad) a 510 nm.

**Figura 8.** Expresión de marcadores adipogénicos en células PASH-4. El RNA total de células PASH-4 de los subcultivos 15<sup>o</sup> y 23<sup>o</sup> se obtuvo en condición proliferante, quiescente, post-inducida y terminalmente diferenciada (TD). Este se analizó por RT-PCR usando oligonucleótidos específicos de mRNAs de los genes C/EBP- $\beta$  y C/EBP- $\delta$ , GAPDH como control positivo y RT (-) como control negativo.

Tabla 1. Secuencias de los oligonucleótidos

<b>RNA<sub>m</sub></b>	<b>Secuencias</b>	<b>Tamaño del amplicón (pb)</b>
<b>C/EBP<math>\beta</math></b>	Fw. CCGTGGACAAGCACAGCGACGAGTA	206
	Rv. CAGCTGCTTGAACAAGTTCCGCAG	
<b>C/EBP<math>\delta</math></b>	Fw. CGAGCGCAACAACATCGCCGTG	218
	Rv. GTTACCGGCAGTCTGCTGTCC	
<b>GAPDH</b>	Fw. GAAGGTGGTGAAGCAGGCGT	216
	Rv. ATGTGGGCCATGAGGTCCACCA	