

**DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR,
FISIOLOGÍA E INMUNOLOGÍA**

Programa de Doctorado en Biomedicina



UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

***Matriz extracelular y fibrosis en el tejido adiposo en
obesidad y resistencia a insulina***

***Extracellular matrix and fibrosis in the adipose tissue in
obesity and insulin resistance***

**Directores: Prof. Dra. María del Mar Malagón Poyato y
Dra. Rocío Guzmán Ruiz**

Carmen Tercero Alcázar

Córdoba, 10 de Julio de 2023

TITULO: *Matriz extracelular y fibrosis en el tejido adiposo en obesidad y resistencia a insulina*

AUTOR: *Carmen Tercero Alcázar*

© Edita: UCOPress. 2023
Campus de Rabanales
Ctra. Nacional IV, Km. 396 A
14071 Córdoba

<https://www.uco.es/ucopress/index.php/es/>
ucopress@uco.es

**DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR,
FISIOLOGÍA E INMUNOLOGÍA**

Programa de Doctorado en Biomedicina



UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

***Matriz extracelular y fibrosis en el tejido adiposo en
obesidad y resistencia a insulina***

Memoria de Tesis Doctoral presentada por Carmen Tercero Alcázar,
Graduada en Biología y Máster en Investigación Biomédica Traslacional,
para optar al grado de Doctora en Biomedicina

Las Directoras,

Prof. Dra. María del Mar Malagón Poyato
Catedrática de Biología Celular
de la Universidad de Córdoba

Dra. Rocío Guzmán Ruiz
Investigadora Postdoctoral
de la Universidad de Córdoba

En Córdoba, a 10 de Julio de 2023



UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA



DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR, FISIOLOGÍA E INMUNOLOGÍA

D^a María del Mar Malagón Poyato (Catedrática de Biología Celular) y D^a Rocío Guzmán Ruiz (Investigadora Postdoctoral), ambas pertenecientes al Departamento de Biología Celular, Fisiología e Inmunología de la Universidad de Córdoba,

INFORMAN

Que D^a Carmen Tercero Alcázar Graduada en Biología y Máster en Investigación Biomédica Traslacional, ha realizado bajo nuestra dirección el trabajo titulado “Matriz extracelular y fibrosis en el tejido adiposo en obesidad y resistencia a insulina” y que, bajo nuestro juicio, reúne los méritos suficientes para optar al Grado de Doctora en Biomedicina.

Y para que conste, firmamos el presente documento en Córdoba, 10 de Julio de 2023.

Fdo.: Prof. Dra. María del Mar Malagón Poyato

Fdo.: Dra. Rocío Guzmán Ruiz



TÍTULO DE LA TESIS: Matriz extracelular y fibrosis en el tejido adiposo en obesidad y resistencia a insulina

DOCTORANDO/A: Carmen Tercero Alcázar

INFORME RAZONADO DE LAS DIRECTORAS DE LA TESIS

Durante su formación doctoral, Carmen Tercero Alcázar ha cumplido sobradamente los objetivos científicos y formativos planteados al comienzo de la misma. Durante el desarrollo de la presente Tesis Doctoral, la Doctoranda ha desarrollado y puesto a punto técnicas basadas en cultivos tridimensionales (3D) que han ampliado el campo de desarrollo de los trabajos del grupo y nuestro conocimiento sobre el tejido adiposo. Concretamente, su trabajo se ha centrado en el estudio de la fibrosis y la remodelación de la matriz extracelular del tejido adiposo en condiciones de obesidad y resistencia a insulina. Los resultados obtenidos en este trabajo le han permitido caracterizar por primera vez la implicación del proteoglicano de la matriz extracelular, lumican, en la fisiopatología del adipocito y en el desarrollo de resistencia a insulina. Entre los resultados del estudio, se han observado diferencias en el contenido de lumican entre los depósitos subcutáneo y omental del tejido adiposo, lo que ha permitido establecer nuevas diferencias entre estos dos principales depósitos grasos, y contribuir a ampliar el conocimiento de la biología del adipocito en condiciones normales y fisiopatológicas, como son la obesidad y la diabetes. Para obtener estos resultados, la doctoranda ha puesto a punto técnicas de cultivo tridimensional que permiten modular la composición de la matriz extracelular y mimetizar así las condiciones de fibrosis del tejido adiposo, recreando un modelo de resistencia a insulina. Este trabajo ha dado lugar a la publicación de un artículo científico en la revista *FASEB Journal* (2020) siendo la doctoranda la primera autora. Además de lumican, durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral se ha caracterizado el papel de otros componentes de la matriz extracelular, previamente descritos como claves en la fisiopatología del tejido adiposo, como colágeno VI. Los resultados mostraron la importancia de conocer no solo la composición de la matriz extracelular si no también la proporción entre sus componentes, para entender los mecanismos que subyacen en la aparición de fibrosis en el tejido adiposo en obesidad y resistencia a insulina. Estos últimos estudios han dado lugar a un artículo en el que la doctoranda figura como primera autora trabajo y que está en fase de revisión en la revista *Matrix Biology*.

Además, durante el desarrollo de su Tesis Doctoral, la doctoranda ha colaborado en otras líneas de investigación del grupo. Así ha participado en la caracterización, mediante estudios de proteómica, de los cambios que ocurren en dos procesos de modificación post-traduccionales de proteínas, acetilación y carbonilación, del tejido adiposo subcutáneo y omental de individuos delgados y de sujetos con obesidad con o sin resistencia a insulina. Estos trabajos han dado lugar a dos publicaciones recientes en las que la doctoranda participa como autora.

Por último, además de los artículos científicos, la doctoranda ha presentado los resultados derivados de su trabajo en diferentes congresos de ámbito nacional. Concretamente, ha presentado 16 comunicaciones a congresos, 11 tipo póster y 5 comunicaciones orales, recibiendo el premio a la Mejor Comunicación en varios de ellos. Además, ha ampliado su formación asistiendo a diversos cursos de formación. Por último, ha participado en tareas de divulgación científica y docencia, impartiendo un total de 7 créditos en el Grado de Biología, que le han permitido completar su capacidad formativa.

Por todo ello, se autoriza la presentación de la Tesis Doctoral.

Córdoba, 10 de Julio de 2023.

Fdo.: Prof. Dra. María del Mar Malagón Poyato

Fdo.: Dra. Rocío Guzmán Ruiz

Esta Tesis Doctoral ha sido realizada en el Departamento de Biología Celular, Fisiología e Inmunología de la Universidad de Córdoba y en el Instituto Maimónides de Investigación Biomédica de Córdoba (IMIBIC), bajo la dirección de las Dras. María del Mar Malagón Poyato y Rocío Guzmán Ruiz. Dicho trabajo ha sido subvencionado gracias a proyectos del Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades/FEDER (*PID2019-108403RB-I00*) y de la Consejería de Salud y Bienestar Social/Junta de Andalucía/FEDER (*JJAA/FEDER: PT18-RT-1761*). *CIBERobn (ISCIII)* y fondos propios del grupo BIO-139 de Endocrinología Celular y Molecular de investigación de la Universidad de Córdoba.

Lista de Abreviaturas

2D	Bidimensional
3D	Tridimensional
ACC	Acetil-CoA carboxilasa
ACLY	ATP citrato liasa
ACSL	Acil-CoA sintetasa
ADA	<i>American Diabetes Association</i>
AGPAT	Acil-glicerol-fosfato acil-transferasa
Aldolasa	Fructosa-bisfosfato aldolasa
ATGL	Adipo-triglicérido-lipasa
BiP	<i>Binding protein</i>
C/EBPs	<i>CCAAT/enhancer binding proteins</i>
CD36	Transportador de ácidos grasos libres CD36
CDK2	Quinasa dependiente de ciclina 2
COL-I	Colágeno tipo I
COL-IIIα1	Colágeno tipo III alfa 1
COL-Iα1	Colágeno tipo I alfa 1
COL-VI	Colágeno tipo VI
COL-VIα3	Colágeno tipo VI alfa 3
D0	Día 0
D10	Día 10
D3	Día 3
D6	Día 6
D9	Día 9
DAGs	Diglicéridos
DGAT	Diacilglicerol acil-transferasa
ECM	Matriz extracelular
ERK	<i>Extracellular Signal-regulated Kinases</i>
FABP_{pm}	Proteínas de unión a ácidos grasos libres de la membrana plasmática
FABPs	Proteínas de unión a ácidos grasos libres (<i>fatty acid binding protein</i>)
FAK	<i>Focal Adhesion Kinase</i>
FAS	Ácido graso sintetasa

LISTA DE ABREVIATURAS

FATP1	Transportadores de ácidos grasos libres
Fc	<i>Fold change</i>
FFAs	Ácidos grasos libres
GAPDH	Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa
GLUT4	Transportador de glucosa tipo 4
GPAT	Glicerol-3-fosfato acil-transferasa
GSK3	Glucógeno sintasa quinasa 3
GSS	Glutación sintetasa
HbA1c	Hemoglobina glicosilada
HDL	Lipoproteínas de alta densidad
HFD	Alta en grasa
HGHI	Alta glucosa y alta insulina
HOMA-IR	<i>Homeostasis Model Assessment</i>
HSL	Lipasa sensible a hormonas
ICC	Inmunocitoquímica
IHQ	Imunohistoquímica
IL	Interleuquina
IMC	Índice de masa corporal
IPA	<i>Ingenuity Pathway Analysis</i>
IR	Resistencia a insulina
IRS	Sustratos del receptor de insulina
KEA2	<i>Kinase Enrichment Analysis 2</i>
KO	<i>Knock out</i>
LATS1/2	<i>Large tumor suppressor kinase ½</i>
LDH	Enzima lactato deshidrogenasa
LDL	Lipoproteínas de baja densidad
LDs	Gotas lipídicas (<i>Lipid droplets</i>)
LOX	Lisil oxidasa
LRRNT	Dominio N-terminal de LRR
LRRs	Repeticiones en tándem ricas en leucina
LUM	Lumican

Lys	Lisina
MAGs	Monoglicéridos
MAPKs	Proteínas quinasas activadas por mitógenos
MGL	Lipasa de Monoglicéridos
MMPs	Metaloproteasas de matriz
MST-1	<i>Mammalian sterile 20-like kinase 1</i>
NG	Normogluemia
Ob-IR	Pacientes con resistencia a insulina
Ob-NG	Pacientes con obesidad y normogluemia
OM	Omental
PGs	Proteoglicanos
PI3K	Fosfatidilinositol-3-quinasa
Plin-1	Perilipina
PPARγ	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor gamma</i>
RE	Retículo endoplasmático
SC	Subcutáneo
SEM	Error estándar de la media
Ser	Serina
SLRPs	Pequeño proteoglicanos ricos en leucina
SREBP-1	Sterol Regulatory Element Binding Factor 1
SVF	Fracción de estroma vascular
T2D	Diabetes mellitus tipo 2
TAGs	Triglicéridos
TEAD1	<i>TEA domain transcription factor 1</i>
TGF-β	Factores de crecimiento profibróticos
Thr	Treonina
TNF-α	Factor de necrosis tumoral alfa
Tyr	Tirosina
YAP-1	<i>Yes-associated protein</i>
α-SMA	<i>Smooth muscle actin</i>

Índice

Resumen	1
Introducción	11
1.1.1. Características Generales y Funciones del Tejido Adiposo	14
1.1.2. Expansión del tejido adiposo	15
1.1.3. Regulación del metabolismo lipídico en los adipocitos	17
1.1.4. Disfunción del tejido adiposo en obesidad	21
1.2. Matriz extracelular	24
1.2.1. Composición y funciones	24
1.2.2. Interacciones célula-ECM	27
1.2.3. Matriz extracelular y Fibrosis	29
1.3. La Matriz Extracelular del Tejido Adiposo	30
Hipótesis y Objetivos	37
Materiales y Métodos	41
3.1. Material Biológico	43
3.1.1. Cohorte de estudio	43
3.1.2. Cultivo primario de adipocitos humanos	44
3.2. Cultivo de la línea celular 3T3-L1	45
3.2.1. Cultivo 2D de la línea celular 3T3-L1	45
3.2.2. Cultivo 3D de la línea celular 3T3-L1	46
3.3. Modelos in vitro de resistencia a insulina	47
3.3.1. Modelo de hiperglucemia e hiperinsulinemia	47
3.4. Análisis de las propiedades mecánicas de los cultivos 3D	48
3.4.1. Ensayo de compresión	48
3.4.2. Ensayo de fibrilogénesis	48
3.5. Estudios funcionales	49
3.5.1. Ensayo de viabilidad celular	49
3.5.2. Ensayo de citotoxicidad celular	50
3.5.3. Estudio de secreción de lumican en células 3T3-L1	50
3.5.4. Estudio de captación de glucosa en células 3T3-L1	50
3.5.6. Ensayo de bloqueo de receptor β1-integrina	51
3.6. Estudios de microscopía	51
3.6.1. Microscopía óptica	51
3.6.2. Microscopía confocal	52
3.6.3. Inmunocitoquímica de células 3T3-L1	52

3.6.4. Tinción de <i>Nile Red</i>	53
3.6.5. Análisis de imagen por microscopía confocal.....	53
3.6.6. Microscopía electrónica de barrido	54
3.7. Identificación de proteínas	54
3.7.1. Extracción de proteínas de tejido adiposo humano.....	54
3.7.2 Extracción de proteínas de cultivos celulares.....	55
3.7.3. Obtención de extracto proteico a partir del medio de cultivo.....	55
3.7.4. Obtención de extracto proteico a partir de células 3T3-L1 en cultivos 2D	55
3.7.5. Obtención de extracto proteico a partir de células 3T3-L1 en 3D.....	56
3.7.6. Cuantificación de proteínas: método de Bradford	56
3.7.7. Western blot: Electroforesis desnaturalizante, electrotransferencia e inmunodetección	56
3.8. Técnica de inmunohistoquímica	58
3.8.1. Tinción de Rojo Picrosirio	58
3.8.2. Tinción de lumican.....	59
3.9. Expresión génica	60
3.9.1. Extracción de ARN	60
3.9.1. Retrotranscripción	60
3.9.2. Diseño de primers para los estudios de PCR cuantitativa a tiempo real (RT-Qpcr) y validación por PCR convencional	61
3.9.3. PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR)	63
3.10. Docking proteína-proteína	63
3.10.1. Adquisición de las estructuras 3D de las proteínas de interés	63
3.10.2. Modelado de lumican.....	64
3.10.3. Estudio de <i>Docking</i> proteína – proteína	64
3.10.4. Visualizadores moleculares.....	64
3.11. Análisis Fosfoproteómico cuantitativo de adipocitos 3T3-L1 en cultivos 3D	65
3.11.1. Procesamiento inicial de la muestra	65
3.11.2. Digestión, ionización, y espectrometría de masa.....	65
3.11.3. Identificación de la secuencia fosfopeptídica.....	66
3.12. Análisis bioinformático	67
3.13. Análisis estadístico	68
Resultados	69
Capítulo 1. Caracterización de las señales extracelulares e intracelulares específicas de los depositos subcutáneo y omental del tejido adiposo que contribuyen a la insulinorresistencia en individuos con obesidad.	71
4.1. <i>Fibrosis y expansión del tejido adiposo en obesidad y resistencia a insulina</i>	71

<i>4.2. Caracterización funcional de lumican en adipocitos 3T3-L1</i>	79
<i>4.3. Respuesta de los adipocitos 3T3-L1 a cambios en lumican extracelular</i>	81
4.3.1. Diferenciación celular	81
4.3.2. Diferenciación y viabilidad de las células 3T3-L1 en cultivos 3D	83
<i>4.4. Caracterización ultraestructural de las matrices 3D</i>	86
<i>4.5. Efecto de lumican sobre la función de los adipocitos</i>	88
Capítulo 2. Contribución de los componentes de la matriz extracelular y de la fibrosis (lumican y colágeno VI) en la fisiopatología del tejido adiposo.	91
<i>4.6. Caracterización ultraestructural de matrices 3D en presencia de LUM y COL-VI</i>	91
<i>4.7. Predicción in silico de la interacción entre componentes de la matriz extracelular. Estudios de docking proteína-proteína</i>	96
<i>4.8. Respuesta de los adipocitos a Lumican y COL-VI en cultivos 3D</i>	100
4.8.1. Análisis de la diferenciación de los adipocitos 3T3-L1 en cultivos 3D	100
4.8.1. Estudios de señalización: Fosfoproteómica de adipocitos 3T3-L1 en cultivos 3D	104
<i>4.9. Efectos de los componentes de la matriz extracelular en la señalización de insulina y la captación de glucosa en adipocitos 3T3-L1</i>	112
<i>4.10. Regulación del metabolismo glucídico y lipídico en los adipocitos en matrices 3D</i> ..	115
<i>4.11. Implicación de los componentes de la matriz extracelular en procesos de mecanotransducción en adipocitos 3T3-L1</i>	118
<i>4.12. Señalización mediada por lumican y colágeno VI en adipocitos</i>	124
<i>Discusión</i>	129
Capítulo 1. Caracterización de las señales extracelulares e intracelulares específicas de los depositos subcutáneo y omental del tejido adiposo que contribuyen a la insulinorresistencia en individuos con obesidad.	131
<i>5.1. Regulación de la producción de lumican en respuesta a estímulos obesogénicos</i>	135
<i>5.2. Impacto de los cambios en la matriz extracelular sobre los adipocitos en condiciones de obesidad</i>	136
Capítulo 2. Contribución de los componentes de la matriz extracelular y de la fibrosis (lumican y colágeno VI) en la fisiopatología del tejido adiposo.	141
<i>5.3. Papel de Lumican y Colágeno VI en la fisiología de los adipocitos</i>	141
<i>Conclusiones</i>	149
<i>Bibliografía</i>	153

Índice de Figuras y **Tablas**

Figura 1. Componentes celulares y extracelulares del tejido adiposo.....	14
Figura 2. Proceso de diferenciación adipocitaria (adipogénesis).....	16
Figura 3. Regulación de las acciones de la insulina a nivel celular por la vía Akt.....	18
Figura 4. Mecanismo de activación de ERK y proliferación celular.....	19
Figura 5. Resumen de la regulación del metabolismo de lípidos en adipocitos.....	21
Figura 6. Expansión patológica del tejido adiposo	22
Figura 7. Señales y mecanismos regulados por la ECM en el microambiente que rodea al adipocito.	28
Figura 8. Tinción de colágeno VI (azul) y de macrófagos (marrón) en cortes histológicos de tejido adiposo humano de un individuo con obesidad e insulinoresistencia	32
Figura 9. Mecanismos de acción y vías de señalización activadas por lumican.	34
<i>Tabla 1. Anticuerpos primarios utilizados en el estudio.</i>	58
<i>Tabla 2. Composición de la Master Mix utilizada para la realización de la retrotranscripción.</i>	61
<i>Tabla 3. Secuencia de cebadores validados utilizados para la RT-qPCR. Fueron diseñados usando como genoma de referencia de Mus musculus.</i>	62
<i>Tabla 4. Programación del termociclador para la amplificación de ADNc por RT-qPCR.</i>	63
<i>Tabla 5. Parámetros antropométricos y bioquímicos de los sujetos incluidos en el estudio.</i>	72
Figura 10. Caracterización de la fibrosis tejido adiposo en obesidad y resistencia a insulina. 73	
Figura 11. Caracterización molecular de la fibrosis del tejido adiposo en obesidad y resistencia a insulina.	74
Figura 13. Efecto extra- e intracelular de la fibrosis del tejido adiposo en obesidad y resistencia a insulina.	78
Figura 14. Regulación de la producción de LUM durante el proceso de diferenciación de células 3T3-L1 en cultivos 2D.	80
Figura 15. Regulación de la producción de LUM en respuesta a altas concentraciones de glucosa e insulina de adipocitos 3T3-L1 en cultivos 2D.....	81
Figura 16. Proceso de diferenciación de adipocitos 3T3-L1.	82
Figura 17. Proceso de diferenciación de adipocitos 3T3-L1 en cultivos 3D.	83
Figura 18. Efecto de lumican en la adipogénesis de los adipocitos 3T3-L1 en cultivo tridimensional (3D).....	85
Figura 19. Viabilidad y citotoxicidad en adipocitos 3T3-L1 en cultivo tridimensional (3D celular).	86
Figura 20. Caracterización ultraestructural de los cultivos 3D.	87
Figura 21. Efecto de lumican sobre la mecánica de la estructura de las matrices de colágeno I.	88
Figura 23. Imágenes representativas de microscopía óptica (400 x) de adipocitos procedentes del tejido adiposo subcutáneo de un individuo con obesidad y normogluemia.....	90

Figura 24. Efecto de lumican y colágeno-VI sobre la fibrillogénesis de colágeno I.	92
<i>Tabla 6. Efecto de lumican, colágeno VI en la formación de fibrillas de colágeno I.</i>	92
Figura 25. Caracterización ultraestructural de las matrices tridimensionales (3D).....	94
Figura 26. Análisis de alineación de las fibrillas de colágeno I.....	95
Figura 27. Docking proteína-proteína.	97
Figura 28. Docking proteína-proteína.	99
Figura 29. Adipocitos 3T3-L1 en cultivos 3D.	100
Figura 31. Adipogénesis in vitro de adipocitos 3T3-L1 en cultivos 3D.	103
Figura 33. Analisis fosfoproteómico de adipocitos 3T3-L1 en matrices 3D.	106
Figura 34. Análisis de redes biológicas y rutas canónicas en adipocitos 3T3-L1 en cultivos 3D.	108
Figura 35. Ingenuity Pathways Analysis (IPA) en adipocitos 3T3-L1 en cultivos 3D.	110
Figura 36. Kinase Enrichment Analysis 2 (KEA2) en adipocitos 3T3-L1 en matrices 3D.	111
Figura 37. Análisis de la vía de señalización de la insulina en adipocitos 3T3-L1 diferenciados en matrices 3D.	113
Figura 38. Respuesta a la insulina de los adipocitos 3T3-L1 diferenciados en matrices 3D. ..	115
Figura 39. Regulación del metabolismo de glucosa en adipocitos 3T3-L1 diferenciados en matrices 3D.	116
Figura 40. Regulación del metabolismo de los lípidos en adipocitos 3T3-L1 en cultivos 3D.	118
Figura 41. Mecanotransducción en adipocitos 3T3-L1 diferenciados en matrices 3D.	121
Figura 42. Efectos de la mecanotransducción en adipocitos 3T3-L1 diferenciados en matrices 3D.	123
Figura 43. Rutas de señalización activadas por Lumican (LUM) a través de β -integrina en adipocitos 3T3-L1.....	125
Figura 44. Rutas de señalización activadas por colágeno VI a través de β -integrina en adipocitos 3T3-L1.....	126

Resumen

Introducción

El tejido adiposo representa uno de los órganos más importantes en la regulación de la homeostasis corporal. Así, por una parte, el tejido adiposo responde de una manera altamente eficaz a las demandas energéticas del organismo gracias a la extraordinaria capacidad que tienen sus componentes celulares para adaptarse a cambios en el ambiente (Ahmed, Sultana, & Greene, 2021). Además, constituye una fuente fundamental de una gran variedad de señales paracrinas y endocrinas, las adipoquinas, que regulan desde la homeostasis energética hasta la reproducción, la inmunidad o la inflamación (M. W. Lee, Lee, & Oh, 2019; Rodriguez, Ezquerro, Mendez-Gimenez, Becerril, & Fruhbeck, 2015). El tejido adiposo es el principal tejido que se ve afectado en condiciones de sobrenutrición. En estas condiciones, la homeostasis metabólica de todo el organismo depende de la capacidad del tejido adiposo para remodelar su estructura y acumular el exceso de calorías (Ahmed et al., 2021; Sun, Kusminski, & Scherer, 2011). De hecho, la obesidad, que se caracteriza por la disfunción del tejido adiposo y un estado de inflamación crónica de bajo grado, predispone al desarrollo de resistencia a insulina (IR) que, a su vez, aumenta el riesgo para el desarrollo de diabetes tipo 2 (T2D), enfermedad cardiovascular, esteatosis hepática, hipertensión o ciertos tipos de cáncer (Bluher, 2019). En obesidad, el tejido adiposo sufre importantes cambios moleculares que afectan tanto a sus componentes celulares, incluyendo los adipocitos maduros y las células que componen la fracción de estroma vascular (SVF), como a la matriz extracelular (ECM) (Mariman & Wang, 2010). De hecho, actualmente se acepta que el desarrollo de fibrosis en el tejido adiposo se asocia a la disfunción de dicho tejido y a la IR ligada a obesidad (Divoux & Clement, 2011; Pellegrinelli, Carobbio, & Vidal-Puig, 2016; Rutkowski, Stern, & Scherer, 2015). Sin embargo, se dispone aún de poca información tanto de los cambios precisos que ocurren en la ECM del tejido adiposo en obesidad como del impacto que tienen estos cambios en la respuesta disfuncional de los adipocitos y los mecanismos moleculares que subyacen en esta interrelación y que subyacen en el desarrollo de enfermedades metabólicas asociados a obesidad.

La ECM del tejido adiposo es fundamental para mantener la homeostasis del tejido, así como para la formación y mantenimiento de la estructura del propio tejido (Divoux & Clement, 2011). Como en otros tejidos, la ECM del tejido adiposo contiene diversos tipos de colágeno, glicoproteínas de adhesión (fibronectina, laminina, etc), proteínas elásticas y proteoglicanos (PGs), (Humphrey, Dufresne, & Schwartz, 2014; Mouw, Ou, & Weaver, 2014; Theocharis & Karamanos, 2019), si bien la presencia y cantidad relativa de cada uno de estos componentes puede variar entre especies, tipo de depósito graso y fase de desarrollo (Mariman & Wang, 2010). Los componentes de la ECM son producidos por los adipocitos y células de la SVF, como fibroblastos y macrófagos (Mariman & Wang, 2010).

Durante el desarrollo de obesidad, el aumento de tamaño y número de adipocitos, junto con la infiltración de células inmunes y la neovascularización del tejido adiposo en expansión conllevan una profunda remodelación de la ECM, incluyendo tanto la degradación como la producción de nuevos componentes de la matriz (Baker et al., 2017; Divoux & Clement, 2011; Pellegrinelli et al., 2016; Rutkowski et al., 2015). Si el aporte de nutrientes y el estado inflamatorio persisten, se produce la disfunción del tejido adiposo que se caracteriza, entre otros procesos patológicos, por el desarrollo de fibrosis que limita la expansión del tejido (Pellegrinelli et al., 2016). Estudios pioneros de transcriptómica de tejido adiposo subcutáneo (SC) de individuos delgados vs. individuos con obesidad demostraron que la obesidad estaba asociada a un aumento significativo de genes y rutas intracelulares relacionadas con constituyentes de la ECM, además de demostrar la presencia de fibrosis en el tejido (Henegar et al., 2008). Posteriormente se demostró que, en comparación con individuos delgados, en los individuos con obesidad se producía un aumento tanto de la fibrosis total como de la pericelular en el tejido adiposo SC y el tejido adiposo omental (OM) (Khan et al., 2009; Vila et al., 2014). Respecto a la composición de la ECM en obesidad, diferentes estudios han mostrado aumentos fundamentalmente en isoformas de colágeno I (COL-I) (COL-I α 1) y colágeno VI (COL-VI) (COL-VI α 3) en el tejido adiposo (SC y/o OM) de individuos con obesidad (con o sin síndrome metabólico) respecto a individuos delgados o en animales obesos [ob/ob, o sometidos a dieta alta en grasa (HFD)] (Khan et al., 2009; Vila et al., 2014). No obstante, aún hay controversia con relación a los resultados obtenidos en los estudios que han

explorado el impacto de estos cambios en los componentes de la ECM del tejido adiposo. También se han encontrado datos contradictorios en cuanto a los cambios que ocurren cuando la obesidad concurre con enfermedades metabólicas. Así, se ha descrito una disminución de colágenos fibróticos, o la ausencia de cambios en ciertos tipos de colágeno, en pacientes con obesidad con y sin IR (Guglielmi et al., 2015). Esta discrepancia entre la expresión de colágenos y la presencia de fibrosis ha llevado a proponer que los cambios que ocurren en la ECM podrían afectar no solo a la cantidad de colágenos sino depender también de factores que aumentan la estabilidad y el entrecruzamiento del colágeno, evitando así su degradación (Guglielmi et al., 2015). En este contexto, se ha demostrado que en el tejido adiposo de personas con obesidad e IR existen niveles de expresión más elevados de proteínas de la ECM reguladoras de la formación de fibrillas (fibrillogénesis) o de la actividad de las MMPs y TGF- β (SPARC, osteopontina) y proteasas (MMP7) que en individuos con obesidad pero sin IR (Divoux & Clement, 2011; Lawler et al., 2016).

Notablemente, varios estudios han demostrado el aumento de la expresión del PG, lumican (LUM), en el tejido adiposo humano y murino en obesidad (Henegar et al., 2008; Vila et al., 2014) y, de hecho, la exposición de preadipocitos de individuos delgados a medio condicionado de macrófagos aumenta la expresión de LUM mientras que su expresión disminuye en animales ob/ob KO para COL-VI (i.e., metabólicamente saludables) (Divoux & Clement, 2011; Khan et al., 2009). A pesar de estas observaciones, aún no se ha determinado la función de LUM en el tejido adiposo, si bien se han descrito numerosas e importantes funciones de este PG en otros tejidos. Así, diversos estudios han demostrado que las interacciones moleculares del LUM con las fibrillas de colágeno influyen de manera fundamental en la arquitectura tisular del colágeno y las características biomecánicas de los tejidos (Stamov, Muller, Wegrowski, Brezillon, & Franz, 2013). En esta línea, nuestros estudios proteómicos previos de muestras pareadas de tejido adiposo SC y OM de individuos delgados vs. individuos con obesidad con distintos grados de sensibilidad a insulina nos han permitido observar cambios en la expresión de LUM y COL-VI en relación con la obesidad y la IR (Guzman-Ruiz et al., 2020).

En este contexto, el **objetivo** general de esta Tesis Doctoral se ha centrado en analizar la respuesta de los adipocitos a cambios en los componentes de la matriz extracelular, en particular de lumican y colágeno VI, que pueden definir o comprometer la función de estas células y la capacidad de expansión del tejido adiposo en condiciones de obesidad.

Materiales y métodos

Hemos empleado múltiples estrategias dirigidas al análisis del impacto de los cambios en la composición de la ECM sobre la funcionalidad de los adipocitos, para lo que también hemos generado y caracterizado un modelo *in vitro* de fibrosis y obesidad que emula las características de la ECM de los pacientes con obesidad.

Para caracterizar la composición de la matriz extracelular se utilizaron muestras de tejido adiposo SC y OM procedentes de pacientes con obesidad obtenidas durante cirugía bariátrica, que se acompañan de las evaluaciones clínicas, bioquímicas y fisiológicas de los mismos.

Para la preparación del modelo *in vitro* de fibrosis, pusimos a punto un sistema de cultivo 3D basado en hidrogeles de COL-I que fueron empleados para el cultivo y diferenciación de preadipocitos 3T3-L1. A partir de estos geles, se prepararon geles adicionales para testar el efecto de los componentes de la ECM en estudio, LUM y COL-VI. Las concentraciones de colágenos (3,6 mg/mL para COL-I; 36 mg/mL para COL-VI) se eligieron de acuerdo con estudios previos (Iyengar et al., 2005; Llacua, Hoek, de Haan, & de Vos, 2018), estableciéndose la concentración más alta que mantenía la viabilidad de los adipocitos 3T3-L1. Por su parte, la concentración de LUM se eligió sobre la base de los resultados publicados en ensayos con otros modelos celulares (10-30 ng/ml) (Karamanou, Franchi, Vynios, & Brezillon, 2020; Liu et al., 2013) y nuestros resultados de secreción obtenidos mediante ELISA. El análisis de la estructura de la matriz, ordenación y diámetro de las fibrillas y forma celular se llevó a cabo mediante microscopía electrónica de barrido y utilizando el *software ImageJ* para la cuantificación de imágenes.

Para los estudios de diferenciación celular, se analizaron los niveles de expresión de marcadores de diferenciación [C/EBP α , PPAR γ , SREBP-1, FABP4, adiponectina] por RT-qPCR y/o inmunoblotting cuantitativo, y la acumulación de lípidos, mediante la tinción de gotas lipídicas (*Nile Red*). Además, se determinó la 1) viabilidad celular (Alamar-blue), 2) respuesta a insulina: ratio pAkt/Akt (insulina 200 nM, 1 h) y efectores de la ruta de la insulina, 4) Formación, crecimiento y regulación de gotas lipídicas (Seipin, Cidea, Cidec, Plin-1), 5) lipogénesis (CD36, Acsl, Gpat-3, Agpat-3, Dgat-2), 6) lipogénesis *de novo* (Acly, Acc, Fasn), 4) Estrés del retículo endoplásmico (RE): BIP y 5) Estrés oxidativo: GSS mediante *western blot* y/o RT-qPCR.

También se estableció el fosfoproteoma de las células en los cultivos 3D mediante el uso de la técnica de etiquetado masivo en tándem (Tandem Mass Tag™,TMT) y nanoLC-MS. Con los datos generados, se realizó un análisis de anotación funcional mediante el uso de diferentes softwares para identificar los procesos biológicos, componentes celulares, funciones moleculares y vías de señalización. Estos estudios se complementaron con el análisis de varios mediadores identificados mediante la fosfoproteómica, incluyendo intermediarios celulares relacionados con fenómenos de mecanotransducción (MST-1, YAP/TAZ, TEAD-1, Lamina A, β -Integrina).

Resultados y discusión

En obesidad, la ECM del tejido adiposo sufre cambios en la cantidad y el tipo de componentes, lo que favorece el desarrollo de fibrosis, un proceso patogénico estrechamente relacionado con la disfunción de dicho tejido y el desarrollo de comorbilidades. La ECM es una estructura altamente dinámica y esencial para mantener la diferenciación, función y supervivencia celular. Está compuesta por múltiples moléculas, incluyendo varios tipos de colágeno y PGs, que son secretados por las células residentes en el tejido. Estudios proteómicos previos de nuestro laboratorio revelaron niveles alterados tanto de varios subtipos de colágenos como COL-I y COL-VI, como del PG LUM, en el tejido adiposo de individuos con obesidad y resistencia a insulina (Ob-IR) respecto a individuos con obesidad normoglucémicos (Ob-NG) (Guzman-Ruiz et al.,

2020), lo que sugería su posible implicación en el desarrollo de enfermedad metabólica en obesidad.

Concretamente, la transición de un fenotipo obeso metabólicamente sano (Ob-NG) a desfavorable (Ob-IR) conlleva un aumento del contenido de LUM en tejido adiposo SC, que se acompaña de un aumento de la fibrosis total del tejido, pero no de la pericelular, además de un aumento concomitante en el tamaño medio de los adipocitos. Adicionalmente, esta transición conlleva una disminución del contenido de β 1-integrina y del ratio pAkt/Akt en tejido adiposo SC. Por su parte, el tejido adiposo OM, que presenta igualmente una mayor fibrosis total en Ob-IR vs. Ob-NG, muestra un patrón opuesto en cuanto a su menor contenido en LUM, mayor fibrosis pericelular y limitación del crecimiento de los adipocitos, además de diferencias en su capacidad de fibrillogénesis en ensayos *in vitro*. Estos datos sugieren un papel para LUM en el tejido adiposo en obesidad e IR y apoyan la idea de que la presencia (o ausencia) de este PG podría ser importante para determinar la organización del colágeno de la ECM y, potencialmente, en los procesos de mecanotransducción.

Utilizando un sistema de cultivo 3D optimizado para adipocitos, demostramos que LUM tiene un efecto inhibitor dosis-dependiente de la adipogénesis, que se manifiesta principalmente por una reducción del tamaño de las gotas lipídicas en las células diferenciadas en hidrogeles de COL-I enriquecidos en este PG. En línea con estos resultados, observamos una disminución de la expresión de los reguladores adipogénicos C/EBP α , SREBP-1, PPAR- γ y marcadores adipogénicos (FABP4) en los adipocitos expuestos a LUM, lo que está también de acuerdo con su efecto inhibitor de la ruta "PPAR γ signalling" según los resultados de fosfoproteómica. Estos cambios se acompañaron también por niveles aumentados de marcadores de estrés de retículo endoplásmico (BIP) y de estrés oxidativo (GSS). Del mismo modo, LUM modificó tanto el grosor como el empaquetamiento de las fibrillas de COL-I en los hidrogeles 3D, lo que hemos demostrado que produce la activación de señales mecanotransductoras (YAP-1 y lamina-A) que mediarían la menor acumulación de lípidos y la disminución de la secreción de adiponectina observada en los adipocitos diferenciados en matrices 3D conteniendo LUM. Estos resultados, junto con nuestras observaciones que demuestran que los adipocitos liberan LUM en respuesta a condiciones de

hiperglucemia/hiperinsulinemia, apoyan el papel de este proteoglicano en la aparición de enfermedades metabólicas asociadas a la obesidad. Por su parte, en presencia de COL-VI, que también altera la organización de las fibrillas de COL-I en los hidrogeles 3D, los adipocitos muestran una mayor acumulación de lípidos, lo que se acompaña de aumentos en la expresión de factores adipogénicos así como del transportador de glucosa GLUT4 que, a diferencia de lo que sucede en condiciones control (COL-I solo), se acumula en la superficie celular aún en ausencia de insulina. Estos cambios se acompañan de un incremento de la captación de glucosa, que, según nuestros análisis bioquímicos, se metabolizaría para favorecer la síntesis y almacenamiento de triglicéridos (TAGs). Curiosamente, cuando las células se diferenciaron en geles 3D conteniendo una combinación de LUM y COL-VI, se obtuvo un fenotipo celular intermedio. En cualquier caso, las células mostraron una respuesta deficiente a la exposición con insulina tanto cuando se diferenciaron en presencia de LUM o COL-VI solos como en combinación, lo que pone de manifiesto que la resistencia a la insulina puede ocurrir independientemente del contenido lipídico de los adipocitos.

En conjunto, nuestros resultados revelan distintas vías de respuesta a los cambios en los componentes de la ECM asociados a la fibrosis del tejido adiposo en obesidad. Estas vías podrían contribuir a la disfunción de los adipocitos y al desarrollo de enfermedades metabólicas, lo que apoya su valor potencial como dianas terapéuticas.

Introducción

La obesidad, definida como un exceso de tejido adiposo, es una enfermedad compleja en cuyo desarrollo intervienen factores genéticos, biológicos y socioambientales, incluyendo los cambios en la dieta y la disminución de la actividad física (Ahmed et al., 2021). La obesidad representa un gran desafío para la salud porque aumenta significativamente el riesgo de desarrollar enfermedades como la diabetes tipo 2 (T2D), esteatosis hepática, hipertensión, enfermedades cardiovasculares, demencia, osteoartritis, apnea del sueño y varios tipos de cáncer, contribuyendo así a una disminución tanto de la calidad de vida como de la esperanza de vida (Bluher, 2019). La obesidad también se asocia con el desempleo, las desventajas sociales y la reducción de la productividad socioeconómica, lo que supone un grave problema de salud y económico a nivel mundial (Bluher, 2019). Un estudio reciente ha demostrado un aumento global en el índice de masa corporal (IMC) y un incremento en la prevalencia del 7,6% en hombres y 8,5% en mujeres en los últimos 25 años (Collaboration, 2016; Malik, Willet, & Hu, 2020). Según esta tendencia, se ha estimado que la prevalencia mundial de la obesidad llegará a alcanzar el 18% en hombres y superará el 21% en mujeres en el año 2025 (Collaboration, 2016; Malik et al., 2020).

A pesar de los avances en el campo, que permiten prever un auge de los tratamientos farmacológicos en el futuro próximo (Muller, Bluher, Tschop, & DiMarchi, 2022), la cirugía bariátrica sigue siendo la intervención más eficaz para la pérdida de peso, aunque no está exenta de complicaciones (Chang et al., 2014). Hasta ahora, las estrategias se han basado fundamentalmente en intervenciones de estilo de vida y comportamiento destinadas a reducir la ingesta calórica y aumentar el gasto energético si bien, en general, tienen una efectividad limitada debido a las complejas adaptaciones hormonales, metabólicas y neuroquímicas que ocurren en las personas con obesidad que dificultan la pérdida de peso y promueven la recuperación de éste (Bluher, 2019) y, en consecuencia, no han tenido éxito a largo plazo, tanto a nivel individual como poblacional. Existe por tanto un gran interés en descifrar los mecanismos moleculares y celulares que controlan la homeostasis del tejido adiposo en estado normal y patológico con el fin de diseñar terapias más eficaces.

1.1.1. Características Generales y Funciones del Tejido Adiposo

Actualmente se sabe que el tejido adiposo es uno de los órganos más importantes en la regulación de la homeostasis corporal. Por una parte, es el primer reservorio de energía del organismo, la cual se almacena en forma de lípidos neutros en el interior de las células que definen dicho tejido, los adipocitos. Además, este tejido constituye una fuente fundamental de una gran variedad de señales paracrinas y endocrinas, las adipoquinas, que regulan desde el metabolismo sistémico y la homeostasis energética hasta la reproducción, la inmunidad o la inflamación (M. W. Lee et al., 2019; Rodriguez et al., 2015). El tejido adiposo está compuesto principalmente por los adipocitos maduros y las células que componen la fracción de estroma vascular (SVF), que incluye los preadipocitos y células madre mesenquimales, células vasculares y células sanguíneas como monocitos, linfocitos, neutrófilos y otras células que participan en la respuesta inmune innata y adaptativa. Estos tipos celulares se encuentran inmersos en la red de proteínas que conforma la matriz extracelular (ECM) (Rodriguez et al., 2015; Sun et al., 2011; Sun, Tordjman, Clement, & Scherer, 2013) (Fig. 1).

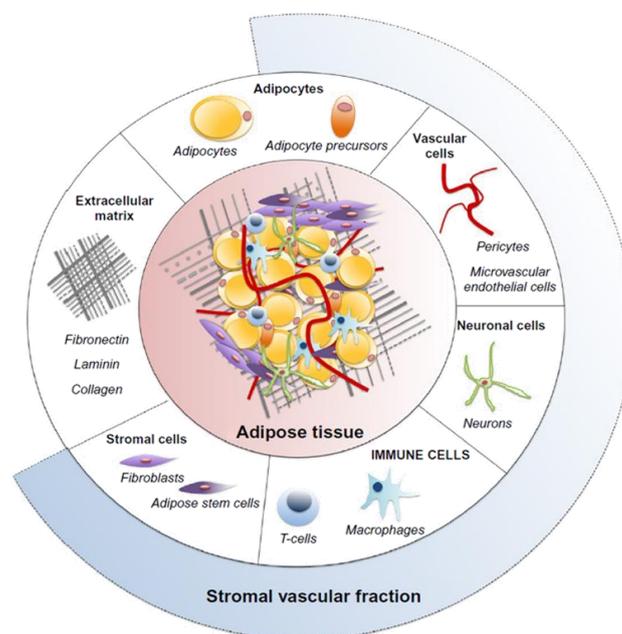


Figura 1. Componentes celulares y extracelulares del tejido adiposo. El tejido adiposo está compuesto por adipocitos maduros y la fracción vascular estromal (SVF). Esta fracción incluye fibroblastos, células sanguíneas, células nerviosas y vasculares, así como células madre mesenquimales y preadipocitos. Estas últimas células son responsables de la renovación de los adipocitos a través del proceso de adipogénesis. (Lago M E L., 2017).

El tejido adiposo es también complejo en cuanto a los tipos que lo conforman y a su distribución. El tejido adiposo blanco, en el que se centra esta Tesis Doctoral, se concentra principalmente en dos depósitos: el depósito subcutáneo (SC), que se localiza bajo la piel; y el depósito visceral u omental (OM), que se localiza alrededor de las vísceras (Y. Chen, Pan, & Pfeifer, 2017). Dichos depósitos, además de por su localización, se diferencian por su regulación, características celulares y moleculares y respuesta en condiciones de obesidad. Así, el depósito OM presenta una mayor sensibilidad a catecolaminas y glucocorticoides y, por tanto, mayor actividad lipolítica comparado con el depósito SC, mientras que este último se caracteriza por una mayor sensibilidad a insulina (Sebo & Rodeheffer, 2019). A nivel celular, nuestro grupo de investigación y otros autores han demostrado un comportamiento diferencial de los distintos tipos celulares presentes en ambos depósitos grasos. Así, se ha demostrado que los preadipocitos SC presentan una mayor capacidad de diferenciación y menor tasa de apoptosis que los del depósito OM (Sanchez-Ceinos et al., 2021; Tchkonja et al., 2005). Adicionalmente, el tejido adiposo OM produce más citoquinas proinflamatorias (Interleuquina-6 (IL-6), Factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α)) y quimioquinas que el SC (Dodson et al., 2014), el cual produce niveles más elevados de adipoquinas protectoras desde el punto de vista metabólico, como la adiponectina (Konigorski et al., 2019). Por tanto, es fundamental seguir investigando para tratar de comprender con la mayor exactitud las diferencias celulares y moleculares existentes entre los dos depósitos y su contribución diferencial al desarrollo de las enfermedades asociadas a la obesidad.

1.1.2. Expansión del tejido adiposo

Una de las características clave para el correcto funcionamiento del tejido adiposo es su capacidad de expansión, que es fundamental para el crecimiento del tejido en condiciones fisiológicas, así como para poder hacer frente al exceso de grasa en condiciones de sobrealimentación. El proceso de expansión del tejido adiposo puede ocurrir por hiperplasia y/o hipertrofia de los adipocitos, tanto en edades tempranas como en adultos (Arner, 2018). En particular, la diferenciación de los preadipocitos para generar nuevos adipocitos maduros, i.e., adipogénesis, se considera fundamental para

permitir una expansión saludable del tejido, de manera que se ha propuesto que la alteración de este proceso en obesidad contribuye de manera fundamental a la fisiopatología de la obesidad (Ghaben & Scherer, 2019).

Está bien establecido que la diferenciación de los preadipocitos en las primeras etapas de la adipogénesis se regula por estímulos hormonales que inciden en la expresión de los miembros de la familia CCAAT/*enhancer-binding proteins* (C/EBPs), C/EBP β y δ , que, a su vez, son los responsables de la activación de los factores de transcripción PPAR γ (*peroxisome proliferator-activated receptor gamma*) y C/EBP α (Ghaben & Scherer, 2019), lo que contribuye a la activación de una serie de efectores intracelulares que finalmente determinarán el fenotipo adipocitario (Belligoli et al., 2019). Además de estos factores, se ha establecido la influencia de hormonas, citoquinas, factores de crecimiento y nutrientes en el proceso de adipogénesis, algunos de los cuales también regulan la expresión de factores de transcripción relevantes en este proceso, como SREBP-1 (*sterol Regulatory Element Binding Factor 1*) (Ayala-Sumuano et al., 2011; Ghaben & Scherer, 2019) (Fig. 2). Estos factores, en conjunto, determinan la expresión de las proteínas que definen el fenotipo de los adipocitos maduros, como FABP4 (*fatty acid binding protein*), adiponectina o perilipina (Ghaben & Scherer, 2019), además de inducir la acumulación de gotas lipídicas (LDs) cuyo número y tamaño aumentan progresivamente hasta transformar a los preadipocitos en adipocitos maduros conteniendo una única LD de gran tamaño.

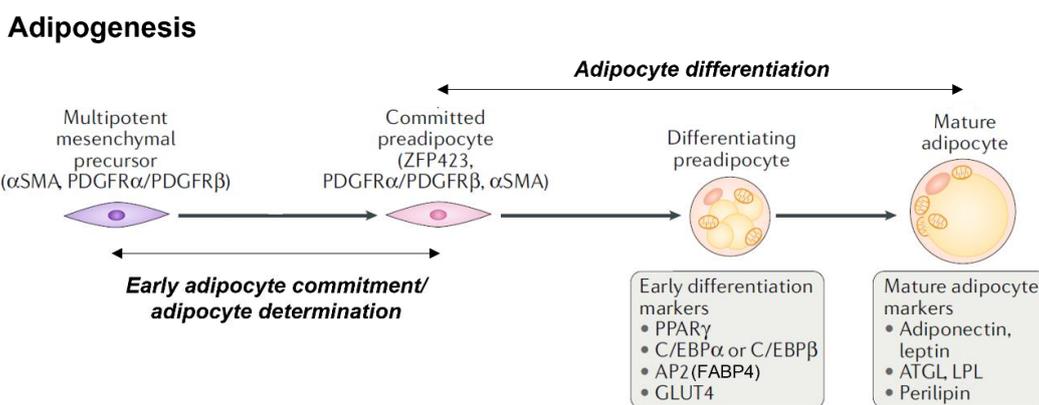


Figura 2. Proceso de diferenciación adipocitaria (adipogénesis). Los precursores mesenquimales pluripotentes dan origen a los preadipocitos, los cuales acumulan lípidos y se diferencian a adipocitos maduros. Este proceso está controlado por un conjunto de factores de transcripción que interactúan entre sí, como C/EBPs y PPAR γ ; los cuales coordinan la expresión de una variedad de proteínas, incluyendo marcadores adipogénicos como FABP4 y GLUT4, y adipoquinas como la adiponectina. (Ghaben & Scherer, 2019).

1.1.3. Regulación del metabolismo lipídico en los adipocitos

El almacenamiento y la utilización de la reserva energética contenida en las LDs de los adipocitos están sometidos a un complejo sistema de regulación multifactorial. De esta manera, la ingesta estimula el almacenamiento de ácidos grasos (lipogénesis) en los adipocitos, mientras que el ayuno induce la liberación de los mismos (lipólisis) (Festuccia, Blanchard, & Deshaies, 2011), con la insulina y las catecolaminas como reguladores endocrinos principales de estos procesos (Czech, 2017; Luo & Liu, 2016; Moseti, Regassa, & Kim, 2016; Mullins et al., 2014). Concretamente, la lipólisis consiste en la hidrólisis de los triglicéridos (TAG), diglicéridos (DAG) y monoglicéridos (MAG) en ácidos grasos libres (FFA). Este proceso requiere tres pasos consecutivos que involucran a tres enzimas diferentes: la adipo-triglicérido-lipasa (ATGL) que cataliza el paso inicial de la lipólisis, convirtiendo los TAG en DAG; la lipasa sensible a hormonas (HSL), que es principalmente responsable de la hidrólisis de los DAG en MAG; y la lipasa de MAG (MGL) que hidroliza los MAG (Lass, Zimmermann, Oberer, & Zechner, 2011).

Por su parte, la insulina es la hormona anabólica más importante, responsable de promover la síntesis y almacenamiento de carbohidratos, lípidos y proteínas e inhibir su degradación (Dimitriadis, Mitrou, Lambadiari, Maratou, & Raptis, 2011). Su función principal en la mayoría de los tejidos periféricos es incrementar la captación de glucosa, disminuyendo de esta manera la concentración de glucosa en sangre (Dimitriadis et al., 2011). En adipocitos, la insulina estimula tanto la captación de ácidos grasos como de glucosa, la cual es utilizada para la síntesis del glicerol necesario para la esterificación y almacenamiento de los ácidos grasos en forma de TAGs (Ducharme & Bickel, 2008; Kraemer, Farese, & Walther, 2013). Además, la insulina ejerce un potente efecto inhibitorio de la lipólisis, por lo que no sólo favorece el almacenamiento de lípidos, sino que también disminuye los niveles circulantes de ácidos grasos (Moseti et al., 2016).

La señalización de la insulina comienza cuando esta hormona se une a la subunidad α del receptor de insulina, lo que provoca un cambio conformacional en la subunidad β y su consecuente activación catalítica (Hubbard, 2013). Como resultado, varios residuos de tirosina (Tyr) en la región citosólica de la subunidad β se autofosforilan y son reconocidos por proteínas adaptadoras, incluyendo a los sustratos del receptor de

insulina (IRS), de los cuales el IRS-1 y el IRS-2 constituyen los principales sustratos e intermediarios más comunes en la etapa inicial de propagación de la señal de insulina (Hubbard, 2013). La mayoría de las acciones de la insulina se llevan a cabo mediante la activación de dos vías principales de señalización: la vía de la fosfatidilinositol-3-quinasa (PI3K)/Akt, responsable de la mayoría de sus acciones metabólicas (Fig. 3), y la vía de las quinasas activadas por mitógeno/Ras (Ras/MAPK), que regula procesos de expresión génica y los efectos mitogénicos asociados a la insulina (Ahmad, Serpell, Fong, & Wong, 2020). Concretamente, la activación de Akt por la insulina conduce a la fosforilación de múltiples sustratos (Hresko & Mueckler, 2005), incluyendo la proteína activadora de Rab GTPasas AS160 (Sano et al., 2007), que es esencial para la translocación del transportador de glucosa, GLUT4, a la membrana plasmática y la captación subsecuente de glucosa por los adipocitos (Moseti et al., 2016; Stockli, Fazakerley, & James, 2011). Además de su papel en la regulación de la captación de glucosa, Akt también está implicada en otros procesos metabólicos, como la síntesis de proteínas y la inhibición de la lipólisis en el tejido adiposo (Manning & Cantley, 2007).

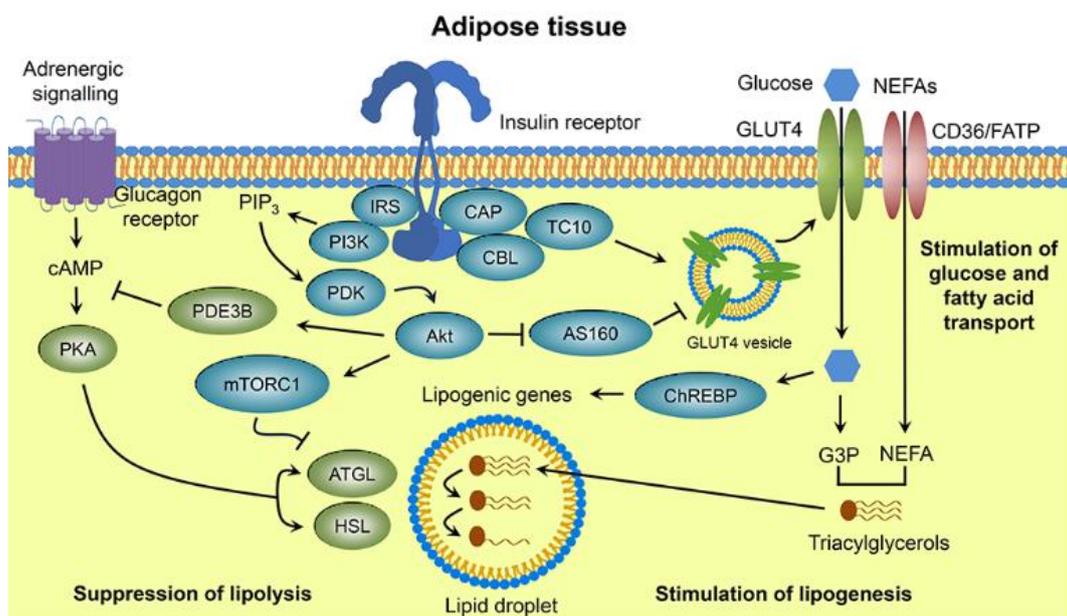


Figura 3. Regulación de las acciones de la insulina a nivel celular por la vía Akt. El esquema representa los mecanismos activados en respuesta a la unión de la insulina a su receptor y que están mediados por la vía de la Akt. Este proceso incluye la fosforilación de residuos de tirosina clave del receptor que afectan a su actividad, regulando la formación de complejos señalizadores down-stream, así como a su número y localización en la célula. Además, se representan otros puntos de regulación en la vía de señalización de la insulina, como la fosforilación de proteínas IRS que sirven como sitios de acoplamiento para PI3K, lo que conduce a la formación de PIP3 y a la activación de Akt dependiente de PDK, que afecta específicamente la señalización de PI3K/AKT y a la traslocación de GLUT-4. Imagen tomada de Batista et al. 2021. (Batista, Haider, & Kahn, 2021).

Por otra parte, como se ha mencionado, los efectos promotores de la insulina sobre el crecimiento son mediados a través de la activación de la vía Ras/MAPK (Taniguchi, Emanuelli, & Kahn, 2006). Así, la estimulación de los receptores tirosina quinasa, también provoca la activación de las MAPKs en un proceso que encadena una cascada de proteínas quinasas definidas secuencialmente como MAPKKK (representada por c-Raf-1), y MAPKK como MEK1 y MEK2. Las MEKs, finalmente fosforilan las MAPK p44 y p42, también conocidas como ERK1 (*Extracellular Signal-regulated Kinase 1*) y ERK2 respectivamente, aumentando así su actividad enzimática (Wen et al., 2022). En esta vía, la fosforilación de ERK1/2 inducida por insulina cataliza la fosforilación de factores de transcripción que regulan la expresión génica y promueven el crecimiento, la proliferación y la diferenciación celular (Boulton et al., 1991; Taniguchi et al., 2006).

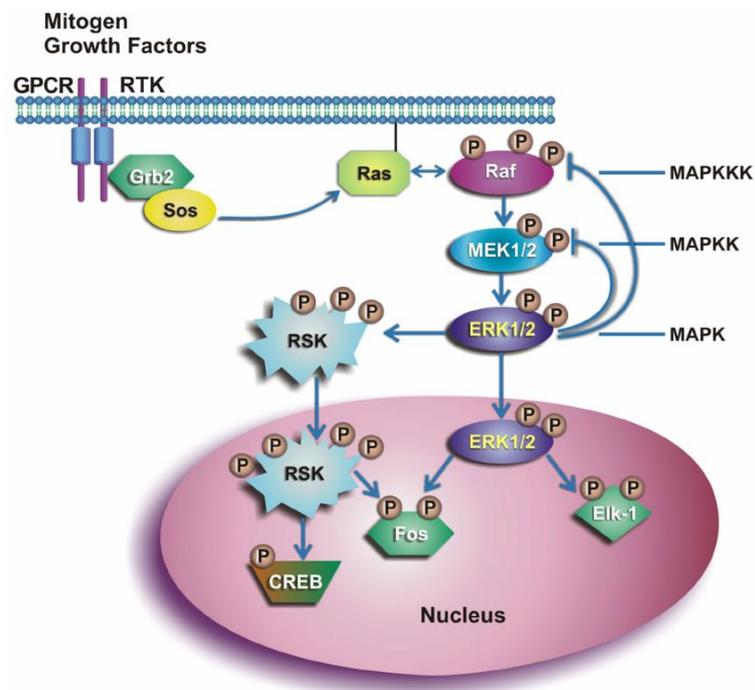


Figura 4. Mecanismo de activación de ERK y proliferación celular. La activación de los receptores tirosina quinasa (RTKs) o los receptores acoplados a proteínas G (GPCRs) por factores de crecimiento o mitógenos conduce al reclutamiento de la proteína adaptadora Grb2 (proteína ligada al receptor de factores de crecimiento) y el factor de intercambio de nucleótidos de guanina (SOS). SOS activa a Ras para reclutar y activar a Raf en la membrana plasmática mediante fosforilaciones en múltiples sitios. A continuación, MEK1/2 es fosforilado en dos residuos de Ser, y posteriormente fosforila a ERK1/2 en Thr y Tyr. ERK1/2 activada fosforila a RSK, y tanto RSK como ERK se traslocan al núcleo donde activan múltiples factores de transcripción, lo que finalmente resulta en la síntesis de proteínas efectoras que provocan cambios en la proliferación celular y la supervivencia. La fosforilación de ERK por MEK y posiblemente por Raf, puede inactivar la vía en esos pasos en particular, creando un bucle de retroalimentación negativa. (Mebratu & Tesfaigzi, 2009).

La activación de la cascada de señalización de la insulina también pone en marcha mecanismos que estimulan la entrada en los adipocitos de FFA, resultantes de la hidrólisis de quilomicrones circulantes por la lipoproteína lipasa anclada en las células endoteliales de los vasos que irrigan el tejido adiposo, y su conversión a TAGs, la principal forma de almacén de lípidos en los adipocitos (Kajimura, 2017; Luo & Liu, 2016). Concretamente, los adipocitos incorporan los FFA gracias a proteínas de la membrana plasmática como los transportadores de FFA (FATP1 y FATP4), translocasas de FFA (FAT/CD36) y proteínas de unión a FFA de la membrana plasmática (FABPpm) y citosólicas (FABP4, FABP5) (Fruhbeck, Mendez-Gimenez, Fernandez-Formoso, Fernandez, & Rodriguez, 2014; Lafontan, 2008). Una vez en el interior celular, los FFA son activados en el citosol por acil-CoA sintetasas (ACSL) y, mediante la acción de enzimas del retículo endoplasmático (RE) (GPAT (glicerol-3-fosfato acil-transferasa), AGPAT (acil-glicerol-fosfato acil-transferas), la fosfátido fosfatasa, lipin, y DGATs (diacilglicerol acil-transferasas)), son esterificados e incorporados en forma de TAGs para su almacenamiento en las LDs (Wilfling et al., 2013). Otra proteína fundamental en la biogénesis de las LDs es seipin (BSC12), que se localiza en las membranas del RE de las que emergen las LDs recién formadas (Walther, Kim, Arlt, Voth, & Farese, 2023). Después del ensamblaje de los TAGs y la formación inicial de las LDs, éstas se separan del RE en el lado citoplasmático (Nguyen & Olzmann, 2019) pero mantienen algunas proteínas transmembrana que permiten el almacenamiento de lípidos (Choudhary, Ojha, Golden, & Prinz, 2015). De hecho, en las LDs, los TAGs y otros lípidos neutros forman un núcleo hidrofóbico que está rodeado por una monocapa de fosfolípidos a la que se asocian múltiples proteínas (Gross & Silver, 2014; Kory, Farese, & Walther, 2016; Walther & Farese, 2012). Entre estas proteínas se encuentran enzimas relacionadas con la síntesis de lípidos (ACSL1, CCT α), lipasas (HSL, ATGL) o las perilipinas, que regulan el almacenamiento e hidrólisis de los TAGs (Kory et al., 2016; Walther & Farese, 2012) (Fig. 5). Las LDs también contienen proteínas de la familia Cide, como Cidea, Cideb y Fsp27/Cidec, que median la fusión y crecimiento de las LDs en los adipocitos y se localiza en los sitios de contacto entre LDs) (Gross & Silver, 2014; Lowe, O'Rahilly, & Rochford, 2011; Puri et al., 2008).

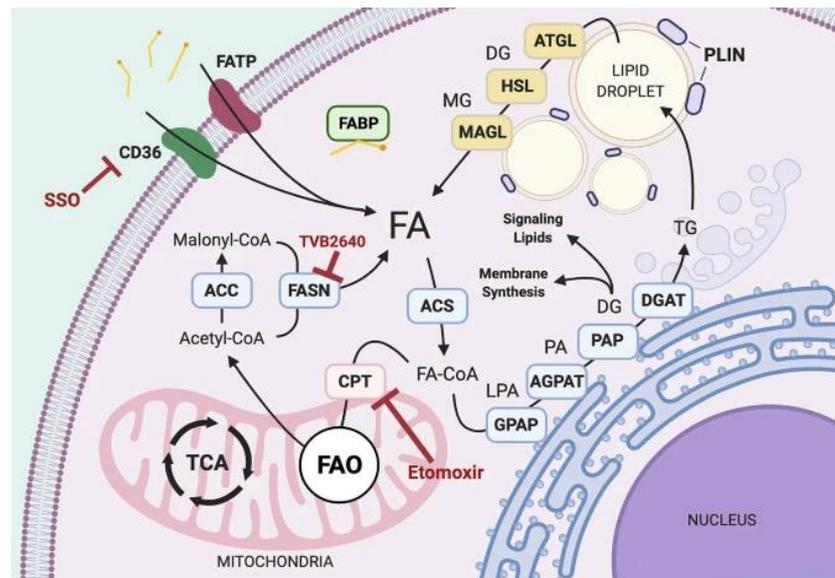


Figura 5. Resumen de la regulación del metabolismo de lípidos en adipocitos. Vías generales anabólicas y catabólicas para los ácidos grasos intracelulares. Acetil-CoA carboxilasa (ACC), Acetil-CoA sintasa (ACS), Glicerol-3-fosfato 1-aciltransferasa (AGPAT), ligasa de triglicéridos del tejido adiposo (ATGL), Cluster de diferenciación 36 (CD36), carnitina palmitoil transferasa 1/2 (CPT1/2), diacilglicerol (DA), Diacilglicerol aciltransferasa (DGAT), ácidos grasos (FA), proteína de unión a ácidos grasos (FABP), oxidación de ácidos grasos (FAO), sintasa de ácidos grasos (FASN), proteína de transporte de ácidos grasos (FATP), Glicerol-3-fosfato aciltransferasa (GPAT), lipasa sensible a hormonas (HSL), ácido lisofosfatídico (LPA), monoacilglicerol (MG), lipasa de monoacilglicerol (MGL), ácido fosfatídico (PA), fosfatasa de ácido fosfatídico (PAP), perilipina (PLIN), triacilglicerol (TG), ciclo del ácido tricarboxílico (TCA). (Ward, Anderson, & Sartorius, 2021).

1.1.4. Disfunción del tejido adiposo en obesidad

El tejido adiposo es el principal tejido que se ve afectado en condiciones de sobrenutrición (Ahmed et al., 2021; Sun et al., 2011). En estas condiciones, la homeostasis metabólica de todo el organismo depende de la capacidad del tejido adiposo para remodelar su estructura y acumular el exceso de calorías (Ahmed et al., 2021). Una expansión patológica del tejido adiposo se caracteriza por la hipertrofia y disfunción de los adipocitos, así como por la generación de inflamación local, lo que se traduce finalmente en el establecimiento de un estado de inflamación sistémica crónica de bajo grado (Kawai, Autieri, & Scalia, 2021) y predispone al desarrollo de resistencia a insulina (IR) (Fig. 6) que, a su vez, aumenta el riesgo para el desarrollo de T2D, enfermedad cardiovascular, esteatosis hepática, hipertensión o ciertos tipos de cáncer (Bluher, 2019; Rodriguez et al., 2015).

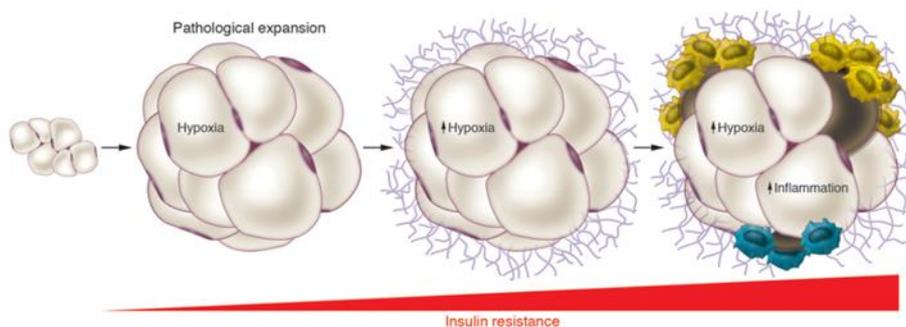


Figura 6. Expansión patológica del tejido adiposo consistente en el aumento del tamaño de los adipocitos con angiogénesis limitada, acumulación de macrófagos y fibrosis, dando lugar a un fenotipo inflamatorio que se asocia a insulinoresistencia (IR). (Sun et al., 2011).

En obesidad, el tejido adiposo sufre importantes cambios moleculares que afectan tanto a sus componentes celulares como a la ECM (Crewe, An, & Scherer, 2017) (Rodríguez et al., 2015; Sun et al., 2011; Sun et al., 2013). Existen pruebas experimentales sólidas que asocian la IR ligada a obesidad con la fibrosis, hipoxia y con una mayor infiltración de macrófagos y otras células inmunes, como linfocitos B y linfocitos T en el mismo (Zmora, Bashiardes, Levy, & Elinav, 2017). Se ha propuesto que la hipertrofia de los adipocitos produce estrés mecánico así como estrés del retículo endoplásmico (RE), disfunción mitocondrial y estrés oxidativo y alteraciones de la autofagia, entre otros procesos, que contribuyen a la activación de rutas pro-inflamatorias en los adipocitos [c-Jun NH2-terminal kinase y nuclear factor κ B (NF- κ B)] (Díaz-Ruiz et al., 2015; Malagon et al., 2013; Rodríguez et al., 2015; Zmora et al., 2017). Esto provoca la liberación por parte de los adipocitos de citoquinas pro-inflamatorias (TNF- α , IL-6, PAI-1), quimioquinas (MCP-1, CCLs) y moléculas de adhesión (VCAM, ICAM) que favorecen la infiltración del tejido por macrófagos y el establecimiento de un ambiente pro-inflamatorio. De hecho, aunque los adipocitos maduros pueden liberar TNF α , los macrófagos son los principales responsables de su producción en el tejido adiposo, ocasionando un estado inflamatorio crónico de bajo grado que se encuentra asociado a obesidad (Boutens & Stienstra, 2016; Sun et al., 2013). Además, distintos estudios han demostrado que TNF α puede inhibir la señalización por insulina (Leguisamo et al., 2012) motivo por el cual contribuye al desarrollo de la IR asociada a obesidad.

A nivel de depósitos grasos, estudios comparativos de adipocitos maduros aislados de tejido adiposo SC y OM de individuos con obesidad con diferentes grados de sensibilidad a insulina [normoglucémicos (NG) vs. IR] han demostrado que la IR en obesidad se asocia a una activación ineficaz tanto de las defensas antioxidantes como de la maquinaria celular (del RE y citosólica) responsable del plegamiento de proteínas y al desequilibrio concomitante de la proteostasis (i.e., eliminación deficiente de proteínas oxidadas y/o mal plegadas debido a la disfunción del proteasoma) en los adipocitos de los dos depósitos (Diaz-Ruiz et al., 2015).

Aunque aún no se conocen con exactitud todos los procesos celulares alterados en el tejido adiposo en obesidad o en qué medida éstos contribuyen (como factores causales o como efectores) al desarrollo de enfermedad metabólica, se acepta que, una vez establecida la disfunción en el tejido adiposo, los adipocitos dejan de cumplir su función como almacenadores de lípidos, que se acumulan entonces en localizaciones ectópicas (Fruhbeck et al., 2014; Rodriguez et al., 2015; Rutkowski et al., 2015). Se ha propuesto que la acumulación de lípidos y el subsiguiente proceso de lipotoxicidad en tejidos como músculo, hígado o páncreas, junto con la alteración en el patrón de adipocinas secretado por el tejido adiposo (de antiinflamatorio a proinflamatorio), son responsables del desarrollo de la IR asociada a obesidad. En consecuencia, uno de los procesos clave a controlar en obesidad es la capacidad del tejido adiposo para almacenar lípidos lo que, a su vez, va a depender de su capacidad para aumentar de tamaño (i.e., expandirse) en relación con su entorno extracelular. Dada la composición de los tejidos en general, y del tejido adiposo en particular, la expansión celular va a depender de las características específicas, tanto en cuanto a su composición como a su organización, de la ECM que alberga a las células del tejido.

1.2. Matriz extracelular

1.2.1. Composición y funciones

La ECM es una compleja red tridimensional (3D) de proteínas entrecruzadas que constituye el microambiente que físicamente sostiene a las células y mantiene la estructura del tejido (Hynes & Naba, 2012; Theocharis, Manou, & Karamanos, 2019). Además, la ECM contribuye de manera fundamental a la regulación de la cantidad y la disponibilidad de factores de crecimiento, citocinas, quimiocinas y enzimas (Hynes & Naba, 2012). De esta manera, al modular las señales para la supervivencia celular, proliferación, diferenciación y movilidad, la ECM controla la actividad y el fenotipo de las células (Karamanos, Theocharis, Neill, & Iozzo, 2019; Shao, Taha, Clauser, Gao, & Naba, 2020). En resumen, la ECM proporciona señales mecánicas y bioquímicas que actúan sobre las células a través de efectores de la matriz, así como mediante la unión directa a componentes de la ECM a receptores de la superficie celular como las integrinas (Hynes & Naba, 2012; Theocharis et al., 2019), contribuyendo a la regulación de la homeostasis celular y tisular en virtud de la interacción dinámica existente entre ésta y las células (Divoux & Clement, 2011; Mouw et al., 2014).

La ECM está constituida por varios tipos de colágenos, glicoproteínas de adhesión (fibronectina, laminina, etc), proteínas elásticas y proteoglicanos (PGs), que son producidos primariamente por los fibroblastos residentes en los tejidos (Humphrey et al., 2014; Mouw et al., 2014; Theocharis & Karamanos, 2019; Theocharis, Skandalis, Gialeli, & Karamanos, 2016). No obstante, se ha demostrado que otros tipos celulares, como los macrófagos presentes en el tejido, son capaces de modular la formación y arquitectura de la ECM. El principal efecto de los macrófagos sobre la ECM es la secreción de metaloproteinasas y la eliminación de restos como parte del proceso de remodelación del tejido. En humanos, la expresión de la metaloelastasa de macrófagos MMP12 está relacionada con la aparición de resistencia a insulina en el tejido adiposo, de manera paralela a la expresión de TNF α y el aumento de macrófagos M2 (J. T. Lee et al., 2014). Los macrófagos también contribuyen de manera directa a la homeostasis de la ECM mediante la secreción de componentes de la matriz como ciertos colágenos, en particular colágeno VI (COL-VI) (Schnoor et al., 2008). En este sentido, ratones ob/ob

knock out para COL-VI parecen tener una menor infiltración de macrófagos en el tejido adiposo en respuesta a dieta alta en grasa (HFD), aun cuando se produce hipertrofia de los adipocitos (Khan et al., 2009). Por otro lado, los macrófagos, mediante la liberación de moléculas señalizadoras como TGF- β , PDGF, VEGF e IGF-1, pueden regular de manera indirecta la respuesta de otras células, como los fibroblastos y preadipocitos, para que proliferen y liberen componentes de la ECM (Braga, Agudelo, & Camara, 2015). En este sentido, se ha observado que el medio condicionado de macrófagos del tejido adiposo estimula la expresión de α -SMA (*smooth muscle actin*) en fibroblastos para inducir su diferenciación a miofibroblastos productores de colágeno (Martinez-Santibanez, Cho, & Lumeng, 2014). Finalmente, es importante destacar que los tipos celulares especializados de los tejidos también pueden producir componentes de la ECM bajo ciertas circunstancias. Por ejemplo, los preadipocitos pueden producir ECM para facilitar la expansión del tejido (Xiong et al., 2022).

Además de las moléculas citadas anteriormente, que constituyen el núcleo principal de la ECM, existen una gran cantidad de enzimas que modifican la ECM, como los factores de crecimiento que se unen a la ECM y otras proteínas asociadas a la matriz que interactúan con ella (Hynes & Naba, 2012; Naba et al., 2016). El conjunto de componentes de la ECM y proteínas asociadas se conoce como "matrisoma" (Naba et al., 2012). Hace ya una década, se lanzó el "proyecto matrisoma", que tiene como objetivo caracterizar y predecir los genes que codifican el matrisoma mediante análisis bioinformáticos de la ECM de distintos tejidos y tumores (Naba et al., 2012; X. Shao et al., 2020). La base de datos del matrisoma (MatrisomeDB) recopila información acerca de todos los componentes del matrisoma humano y de ratón identificados a partir de herramientas tanto *in silico* como experimentales, y donde se incluyen una gran cantidad de datos proteómicos de la ECM (Naba et al., 2016; X. Shao et al., 2020). Así, se ha establecido que cualquier tejido contiene más de 150 proteínas de la matriz y sus proteínas asociadas y, además, que la composición y estructura de la ECM son específicas de tejido y altamente dinámicas en caso de lesiones y/o enfermedades (X. Shao et al., 2020; Theocharis et al., 2019). Los colágenos son componentes principales de la ECM. Hasta la fecha, se han identificado 42 genes diferentes de colágeno que codifican para 28 tipos diferentes de colágeno (Karsdal et al., 2020). Existen varias

familias de colágenos que incluyen los colágenos fibrilares y no fibrilares. Los principales colágenos fibrilares son colágeno I (COL-I), II, III, y V y son los más abundantes en los tejidos, proporcionando rigidez y fuerza a éstos (Humphrey et al., 2014). Por su parte, los colágenos no fibrilares incluyen el colágeno IV, que se ensambla formando una red de tetrámeros y hexámeros para constituir, junto con la laminina, las membranas basales. Se ha demostrado que este colágeno se asocia a la membrana basal en muchos tejidos, donde actúa como una malla de anclaje (Bonnans, Chou, & Werb, 2014). Por su parte, el COL-VI se organiza en tetrámeros que se agregan formando filamentos para constituir una red independiente de microfibrillas que interactúan con otros componentes de la ECM como COL-I y fibronectina (Karsdal et al., 2020).

Por su parte, los PGs constituyen la base de la estructura tridimensional de la matriz que rodea a las células (Bonnans et al., 2014; Mouw et al., 2014). Los PGs proporcionan hidratación a la ECM, permiten la unión de citoquinas y factores de crecimiento y confieren integridad proporcionando el entrelazado de las proteínas presentes en la matriz (Bonnans et al., 2014; Mouw et al., 2014). Entre los PGs se incluye la familia de PGs de bajo peso molecular ricos en leucina (*small leucine-rich proteoglycans*; SLRPs), que se unen a otros componentes de la ECM, como colágenos, glicoproteínas y componentes de la membrana celular, y confieren el marco estructural a los tejidos (Karsdal et al., 2020; Mouw et al., 2014). Los SLRPs intervienen en la formación de las fibrillas de colágeno y contribuyen a definir las interacciones célula-matriz y las funciones celulares, participando en la reparación tisular, el crecimiento tumoral y la proliferación, migración y adhesión de las células, modulando además la actividad de factores de crecimiento y citoquinas (Karsdal et al., 2020; Mouw et al., 2014). Adicionalmente, en la homeostasis de la ECM intervienen distintos tipos de enzimas, como las metaloproteasas de matriz (MMPs), que participan en su remodelado, así como en la liberación de moléculas con actividad biológica, incluyendo factores de crecimiento (Bonnans et al., 2014).

1.2.2. Interacciones célula-ECM

En cuanto a la influencia de la ECM sobre la función celular, los puntos de contacto de las células con la matriz y los contactos célula-célula contienen complejos proteicos, formados por receptores y proteínas sensoras, capaces de detectar fluctuaciones en las fuerzas de tensión en el tejido como rigidez o extensión (Humphrey et al., 2014; Iskratsch, Wolfenson, & Sheetz, 2014; Kai, Laklai, & Weaver, 2016; Sun et al., 2013) (Fig. 7). Dichos cambios se traducen en modificaciones de la composición y la dinámica de dichos complejos que, a su vez, median la transformación de las señales físicas en señales bioquímicas, constituyendo así las bases de la mecanotransducción (Humphrey et al., 2014; Iskratsch et al., 2014; Ringer, Colo, Fassler, & Grashoff, 2017). Los receptores básicos en los contactos focales, las integrinas, interactúan directamente con los componentes de la matriz, incluyendo el colágeno I (fundamentalmente vía integrina $\alpha 1\beta 1$), y median la mecano-señalización desde el exterior al interior (*outside-in*) y viceversa (*inside-out*) (Iskratsch et al., 2014). En respuesta a tensiones en la ECM, las integrinas interactúan con moléculas señalizadoras (FAK, Src) y conectan, vía proteínas de unión (talina, vinculina, alfa-actinina, ILK, etc) con elementos del citoesqueleto de actina, desencadenando el proceso de mecanoregulación conducente al depósito, reorganización o eliminación de la ECM y a la regulación de la proliferación, migración, diferenciación o muerte celular (Humphrey et al., 2014; Sun, Li, & Scherer, 2023). Las rutas de señalización activadas por integrinas incluyen las mediadas por las quinasas asociadas a proteínas Rho (ROCK) y MAP quinasas (MAPKs), y los coactivadores transcripcionales YAP/TAZ (*Yes-associated protein*), que se translocan desde el citoplasma al núcleo, donde interactúan principalmente con el factor de transcripción TEAD1 (*TEA domain transcription factor 1*) (Rausch & Hansen, 2020), y de esta manera, traducen los cambios de rigidez de la ECM y del citoesqueleto en respuestas transcripcionales (Humphrey et al., 2014; Iskratsch et al., 2014; Kai et al., 2016; Sun et al., 2023). La localización celular de YAP/TAZ está regulada principalmente por la ruta Hippo, que mediante la acción de una cascada de serina/treonina quinasas, incluyendo MST1/2 (*sterile 20-like kinase 1*), conduce a la fosforilación de LATS1/2 (*Large tumor suppressor kinase 1/2*) que, a su vez, se activa y fosforila a los coactivadores transcripcionales YAP/TAZ (Rausch & Hansen, 2020).

INTRODUCCIÓN

Dependiendo tanto del residuo como del estado de fosforilación, estas modificaciones postraduccionales promueven la retención citoplasmática y la unión de YAP/TAZ a la proteína 14-3-3 o la degradación de YAP/TAZ por parte del proteasoma (Hansen, Moroishi, & Guan, 2015; Meng, Moroishi, & Guan, 2016). Además, la regulación de YAP/TAZ por parte de LATS1/2 puede ocurrir de manera independiente a la ruta Hippo (MST1/2) a través de la familia de las MAP4K quinasas (Meng et al., 2016), que fosforilan directamente e inhiben la traslocación de YAP al núcleo (Meng et al., 2016; Rausch & Hansen, 2020).

Las integrinas también regulan la activación de la señalización de factores de crecimiento; así, por ejemplo, ILK, tras activarse por integrinas ($\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 3$), recluta proteínas señalizadoras y adaptadores de la ruta de señalización de la insulina, como PI3K/Akt (Williams, Kang, & Wasserman, 2015).

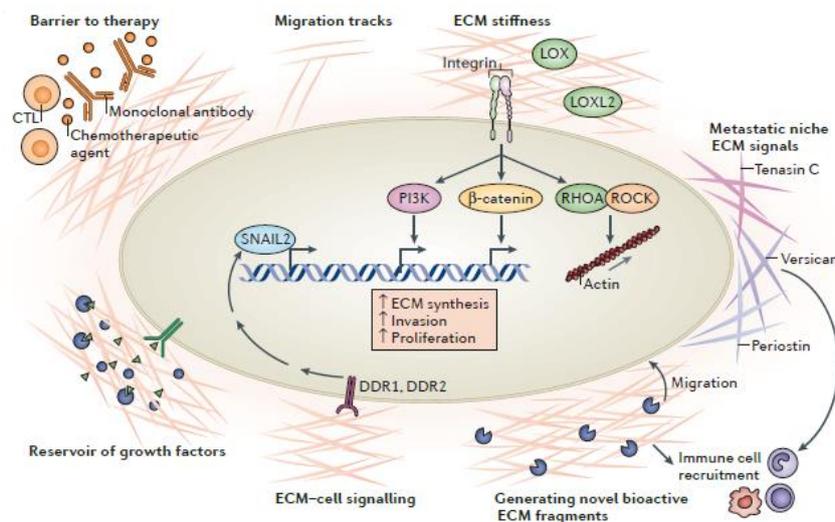


Figura 7. Señales y mecanismos regulados por la ECM en el microambiente que rodea al adipocito. Las principales funciones de la ECM incluyen ser barrera para fármacos y anticuerpos, migración celular, activación de la señalización de integrinas, reservorio de señales y factores de crecimiento, activación de receptores célula-ECM o regulación de la transcripción. (Bonnans et al., 2014).

1.2.3. Matriz extracelular y Fibrosis

La pérdida de la homeostasis y la desregulación del remodelado de la ECM provoca el desarrollo de fibrosis, caracterizada por un desequilibrio en la producción, depósito y acumulación de los componentes de la ECM (Kai et al., 2016; Wernig et al., 2017). La fibrosis altera profundamente la actividad celular y función de los órganos (Kai et al., 2016). Se caracteriza por una infiltración de células inmunes, vasculares y mesenquimales en respuesta a la producción de citoquinas (IL4, IL-13, IL-6) y factores de crecimiento profibróticos (TGF- β) que inducen la acumulación de fibroblastos activados y miofibroblastos en los focos de fibrosis en los tejidos (Kai et al., 2016; Wernig et al., 2017). En este contexto, el equilibrio de la ECM se ve afectado no solo por el depósito de nuevos componentes de la matriz, si no también por las alteraciones que ocurren en la degradación de sus componentes que, en conjunto, interfieren en el remodelado normal de la matriz (Kai et al., 2016; Mori, Ludwig, Garcia-Martin, Brandao, & Kahn, 2019; Sun et al., 2023).

Los tipos de colágeno habitualmente más abundantes en los depósitos fibróticos son los colágenos fibrilares, en particular COL-I, que contribuye de manera fundamental a las propiedades mecánicas de la ECM (Divoux & Clement, 2011; Sun et al., 2023). Además de colágenos, la fibrosis conlleva la acumulación de otras proteínas de la ECM como fibronectina, y enzimas como lisil oxidasa (LOX) o transglutaminasas que, mediante su acción entrecruzadora (*crosslinking*) del colágeno, aumentan la rigidez de la ECM (Kai et al., 2016). Por su parte, se ha relacionado a algunos SLRPs, como lumican (LUM) o fibromodulina, con el desarrollo de fibrosis (Nastase, Iozzo, & Schaefer, 2014). En conjunto, el aumento de la rigidez de la ECM en los tejidos fibróticos provoca la alteración de la mecanotransducción celular. Así, la fibrosis provoca el agrupamiento de integrinas en la superficie celular y la activación de la vía FAK/Src, y puede además promover la señalización por PI3K o ERK, potenciando las señales mediadas por factores de crecimiento (Kai et al., 2016). Otros mecanismos asociados al desarrollo de fibrosis incluyen la activación y/o aumento de la expresión mediada por integrinas de factores de crecimiento, como TGF- β o de colágenos vía YAP/TAZ (Kai et al., 2016; Karsdal et al., 2020).

1.3. La Matriz Extracelular del Tejido Adiposo

La ECM del tejido adiposo es fundamental para mantener la integridad del tejido, así como para el desarrollo de la adipogénesis y la formación del propio tejido (Divoux & Clement, 2011; Sun et al., 2023). El tejido adiposo contiene diversos tipos de colágeno, aunque la presencia y cantidad relativa de cada uno de ellos puede variar entre especies, tipo de depósito graso y fase de desarrollo (Mariman & Wang, 2010). Los colágenos son producidos principalmente por los adipocitos y las células de la SVF (Mariman & Wang, 2010). Concretamente, los preadipocitos expresan y producen COL-I, III y fibronectina, constituyendo una red fibrilar (Mariman & Wang, 2010; Pellegrinelli et al., 2016). Durante la adipogénesis, se produce una acumulación de colágenos I-VI y laminina sobre la superficie de los preadipocitos y una disminución de la fibronectina, así como una reordenación de la organización de los colágenos V y VI, de manera que la red fibrilar es finalmente sustituida por una gruesa lámina basal (Divoux & Clement, 2011; Mariman & Wang, 2010; Sun et al., 2023). Se considera que los colágenos I, IV y VI son los predominantes en el tejido adiposo, aunque hay variaciones regionales, de forma que el tejido adiposo OM está enriquecido en COL-IV, y el SC, en COL-I (Pellegrinelli et al., 2016). Por su parte, el COL-VI, que interacciona con colágeno IV, PGs y proteínas de la ECM, así como con las integrinas $\alpha 1\beta 1$ y $\alpha 2\beta 1$, parece ser más específico de tejido adiposo (Mariman & Wang, 2010; Sun et al., 2013).

Durante el desarrollo de obesidad, el aumento de tamaño y número de adipocitos, junto con la infiltración de células inmunes y la neovascularización del tejido adiposo en expansión conllevan una profunda remodelación de la ECM, incluyendo tanto la degradación como la nueva producción de componentes de la matriz (Baker et al., 2017; Divoux & Clement, 2011; Pellegrinelli et al., 2016; Rutkowski et al., 2015). Si el aporte de nutrientes y el estado inflamatorio persisten, se produce la disfunción del tejido adiposo que se caracteriza, entre otros procesos patológicos, por el desarrollo de fibrosis, que limita la expansión del tejido (Pellegrinelli et al., 2016). Estudios pioneros de transcriptómica de tejido adiposo SC de individuos delgados vs. individuos con obesidad demostraron que la obesidad estaba asociada a un aumento significativo de genes y rutas intracelulares relacionadas con constituyentes de la ECM, además de

constatar la presencia de fibrosis en el tejido (Henegar et al., 2008). Posteriormente se demostró que, en relación con individuos delgados, en las personas con obesidad se producía un aumento tanto de la fibrosis total como de la pericelular, que rodea a los adipocitos, en tejido adiposo OM y SC (Divoux & Clement, 2011). En conjunto, se considera que la disrupción de la homeostasis de la ECM característica de la fibrosis en obesidad, que se asocia a la inducción de hipoxia por la expansión del tejido adiposo y a su infiltración por células inmunes e inflamación, contribuye a la disfunción metabólica del tejido adiposo asociada a la IR (Divoux & Clement, 2011; Pellegrinelli et al., 2016; Rutkowski et al., 2015). En el tejido adiposo, como en el resto de tejidos, se desconoce el orden en el que suceden estos procesos patogénicos aunque se ha establecido una relación entre inflamación y fibrosis, si bien en algunos casos se puede desarrollar fibrosis en ausencia de inflamación (Datta, Podolsky, & Atabai, 2018).

Respecto a la composición de la ECM en obesidad, diferentes estudios han mostrado aumentos fundamentalmente en los tipos COL-I y VI en tejido adiposo (OM y/o SC) de individuos con obesidad (con o sin síndrome metabólico) respecto a individuos delgados o en animales obesos (ob/ob, o sometidos a HFD) (Lawler et al., 2016; Pellegrinelli et al., 2014). Así, se ha visto que la eliminación de la metaloproteasa que degrada el COL-I (MT1-MMP/MMP14) provocaba un aumento de la fibrosis pericelular y la aparición de complicaciones metabólicas (Chun et al., 2006). En el caso particular del COL-VI, Khan *et al.* (2009) mostraron que animales obesos (ob/ob) *knock out* (KO) para este colágeno aumentaban de peso en respuesta a HFD sin inflamación y manteniendo la sensibilidad a insulina (Khan et al., 2009). Sin embargo, estos resultados aún están en controversia ya que en otro trabajo se mostró que los ratones transgénicos que sobreexpresan el dominio C5 de la cadena $\alpha 3$ de COL-VI se caracterizaban por una mayor deposición de los colágenos fibróticos e inflamación en el tejido adiposo, así como por resistencia sistémica a la insulina en respuesta a HFD (Sun et al., 2014). Es importante destacar que los animales deficientes en la cadena $\alpha 3$ de COL-VI bajo una dieta normal mostraron una disminución en el tamaño de los adipocitos, así como una menor acumulación de grasa debido a una menor diferenciación (adipogénesis) y a un aumento en la actividad lipolítica de los adipocitos (Oh et al., 2021). Adicionalmente, la influencia de las alteraciones de la ECM sobre la disfunción del tejido adiposo en

INTRODUCCIÓN

obesidad se ha visto reforzada en un estudio que demuestra que el cultivo de adipocitos procedentes de individuos con obesidad pero sin patologías metabólicas en ECM extraídas a partir de tejido adiposo de individuos con obesidad y T2D provoca en éstos una disminución de la captación de glucosa (Baker et al., 2017). Por su parte, la combinación opuesta (adipocitos de pacientes con obesidad y T2D cultivados en ECM de tejido adiposo procedente de personas con obesidad sin T2D) recupera parcialmente los niveles de la captación de glucosa por parte de los adipocitos de estos pacientes (Baker et al., 2017).

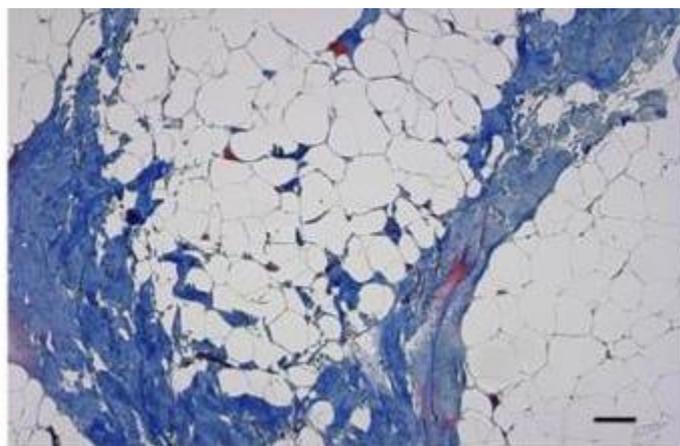


Figura 8. Tinción de colágeno VI (azul) y de macrófagos (marron) en cortes histológicos de tejido adiposo humano de un individuo con obesidad e insulinoresistencia.(Spencer et al., 2010).

Es importante resaltar que, aunque actualmente se acepta que la fibrosis del tejido adiposo es un proceso patogénico fundamental en obesidad, existen discrepancias entre los diferentes estudios en cuanto a los cambios concretos que afectan a los componentes de la ECM en obesidad. Así, incluso se ha descrito que en obesidad y T2D se produce una disminución de colágenos fibróticos o la ausencia de cambios en ciertos tipos de colágenos en personas con obesidad y con o sin IR (Guglielmi et al., 2015). La discrepancia existente entre la expresión de colágenos y fibrosis ha llevado a proponer que el aumento de la ECM podría depender de los factores que aumentan la estabilidad y entrecruzamiento del colágeno, lo que puede prevenir su degradación (Crewe et al., 2017; Guglielmi et al., 2015). Así, en obesidad e IR, el tejido adiposo muestra niveles de expresión más elevados de proteínas de la ECM reguladoras de la fibrilogénesis, de la actividad de las MMPs y de otros factores reguladores como TGF- β (SPARC,

osteopontina) y proteasas (MMP7) (Divoux & Clement, 2011; Lawler et al., 2016). Notablemente, varios estudios han demostrado el aumento de la expresión del PG, LUM, en el tejido adiposo humano y murino en obesidad (Henegar et al., 2008; Vila et al., 2014). De hecho, la exposición de preadipocitos de individuos delgados a medio condicionado de macrófagos aumenta la expresión de LUM mientras que su expresión disminuye en animales ob/ob KO para COL-VI (i.e., metabólicamente saludables) (Divoux & Clement, 2011; Khan et al., 2009). Adicionalmente, se ha descrito que los ratones KO para LUM muestran un aumento en la acumulación de grasa, inflamación del tejido adiposo e IR en respuesta a HFD (Wolff et al., 2019). A pesar de estas observaciones, aún no se ha determinado la función del LUM en el tejido adiposo, para el que se han descrito numerosas e importantes funciones en otros tejidos. Así, diversos estudios han demostrado que las interacciones moleculares del LUM con las fibrillas de colágeno influyen de manera fundamental en la arquitectura tisular del colágeno y las características biomecánicas de los tejidos (Chakravarti et al., 1998; Stamov et al., 2013). Curiosamente, se ha mostrado que la adición de bajas concentraciones de LUM recombinante a matrices de COL-I estabiliza las fibrillas de nueva formación; de hecho, la incubación de COL-I con concentraciones crecientes de LUM disminuye el diámetro de las fibrillas y aumenta el espaciado entre éstas, mientras que, a altas concentraciones, LUM inhibe la fibrilogénesis (Stamov et al., 2013). Más aún, se ha visto que, mediante su interacción con integrinas ($\alpha 2\beta 1$) y activación de FAK, LUM regula el *turnover* de las adhesiones focales, la reorganización del citoesqueleto y la expresión de MMPs, jugando así un papel en cáncer (Brezillon, Pietraszek, Maquart, & Wegrowski, 2013). LUM también interacciona con TGF- β , modulando la unión de este factor a sus receptores y, con ello, la expresión de integrinas y la adhesión celular (Brezillon et al., 2013) (Fig. 9). Por otra parte, se ha mostrado que la expresión y secreción de LUM por fibroblastos aumenta en respuesta a estrés mecánico o al tratamiento con TNF- α (Pilling, Vakil, Cox, & Gomer, 2015). Curiosamente, el LUM secretado por fibroblastos en respuesta a TNF- α induce la diferenciación de monocitos a fibrocitos productores de colágeno (Pilling et al., 2015). Otras funciones del LUM en relación con el sistema inmune incluye la inducción de secreción de IL-1 β y TNF- α por macrófagos (Engebretsen et al., 2013).

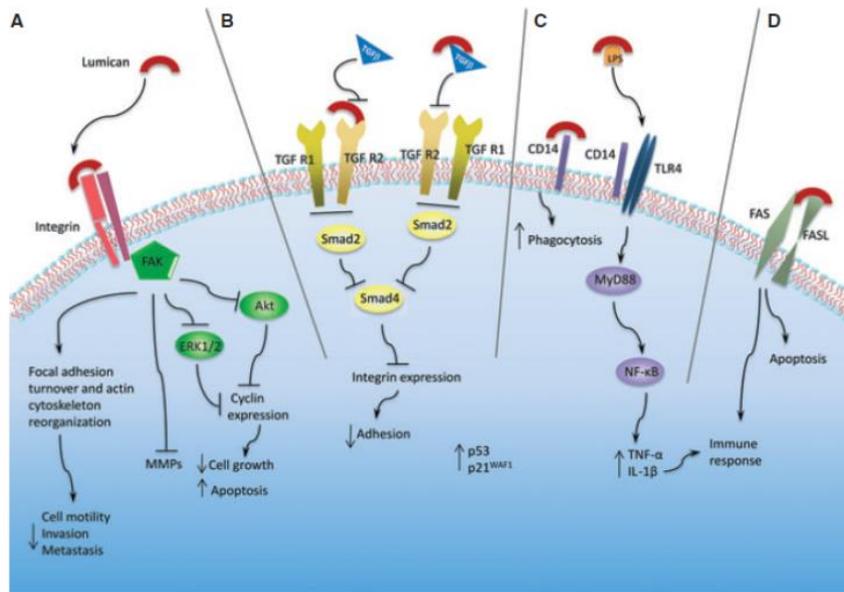


Figura 9. Mecanismos de acción y vías de señalización activadas por lumican. (A) Interacción con integrinas y activación de vías de señalización a través de quinasas de adhesión focal (FAK). (B) Interacción con TGF-β y regulación de la vía Smad, regulando la expresión de integrina. (C) Interacción con CD14 en macrófagos favoreciendo la fagocitosis y con receptores tipo Toll (TLR), regulando la respuesta inmune. (D) Interacción con el ligando de Fas, mediando la apoptosis y la respuesta inmune. (Brezillon et al., 2013).

En conjunto, la información disponible hasta ahora sobre los componentes de la ECM del tejido adiposo sugiere que LUM y COL-VI podrían desempeñar un papel importante en la adaptación de dicho tejido en el desarrollo de obesidad, tanto a nivel extracelular, mediando la organización de la matriz extracelular, como a nivel intracelular actuando como posibles señales mediadoras del ambiente extracelular. Estudios previos del grupo de investigación donde se ha llevado a cabo esta Tesis Doctoral (“Metabolismo y diferenciación adipocitaria, síndrome metabólico” del Instituto Maimónides de Investigación Biomédica de Córdoba, IMIBIC), de proteómica comparativa de muestras pareadas de tejido adiposo SC y OM de individuos delgados vs. individuos con obesidad y distintos grados de sensibilidad a insulina (NG, IR y T2D) nos permitieron observar cambios en la expresión de LUM y COL-VI en relación con la obesidad e IR (Guzman-Ruiz et al., 2020).

En este contexto, a pesar del conocimiento adquirido a partir de modelos animales, el uso de modelos *in vitro* permite el control de las condiciones experimentales y la caracterización de estímulos individuales (o combinados) específicos para identificar su influencia en las células (Lin, Chun, & Kang, 2016). Concretamente, los cultivos

celulares 3D que incluyen componentes de la ECM, proporcionan un microambiente bioquímico y biomecánico mucho más realista, que puede imitar la estructura de los tejidos y permite analizar respuestas e interacciones célula-matriz complejas, en comparación con los cultivos celulares 2D convencionales (Hynes & Naba, 2012; Naba et al., 2016). Así, el uso de sistemas de cultivo 3D ha contribuido a una mejor comprensión de la biología de la ECM (Eiraku et al., 2011), además de ofrecer una amplia gama de aplicaciones en la investigación básica, incluyendo desde el estudio del mecanismo de acción de fármacos a la regeneración de tejidos (Rossi, Manfrin, & Lutolf, 2018). Utilizando información de otros campos, como el de la bioingeniería, se han desarrollado herramientas 3D más sofisticadas y que proporcionan una arquitectura y funcionalidad similar a los órganos *in vivo*, como es el caso de los organoides que se desarrollan a partir de células madre o progenitores específicos del órgano (Clevers, 2016; Rossi et al., 2018). Sin embargo, a pesar de los avances, la información disponible sobre el comportamiento celular y los mecanismos moleculares regulados en un microambiente 3D sigue siendo aún muy limitada (Shen et al., 2021).

Con el fin de comprender mejor el impacto de los cambios inducidos por la obesidad en la ECM del tejido adiposo, en esta Tesis Doctoral nos planteamos como objetivo principal analizar los mecanismos que median los efectos de LUM y COL-VI así como la interacción entre estos dos componentes de la ECM, y su efecto en la diferenciación y función de los adipocitos. Para ello, se ha realizado la puesta a punto y caracterización de un sistema de cultivo de adipocitos en matrices 3D que mimetiza el ambiente fibrótico del tejido adiposo en obesidad e IR, y permite analizar, de manera individual y combinada, el efecto de estos componentes de la ECM.

Hipótesis y Objetivos

La aparición de fibrosis en el tejido adiposo se asocia con cambios en la composición y organización de la matriz extracelular que rodea a las células que componen dicho tejido y que repercuten en el desarrollo de enfermedad metabólica en los pacientes con obesidad. Sin embargo, aún no se conocen con exactitud las modificaciones, desde estructurales a moleculares y celulares, que afectan a la matriz extracelular del tejido adiposo en obesidad y su impacto sobre las células maduras de dicho tejido, los adipocitos. Por tanto, es esencial desentrañar los procesos que definen los cambios en la matriz extracelular asociados a la fibrosis del tejido adiposo con el fin de identificar posibles dianas terapéuticas para la prevención y tratamiento de las enfermedades metabólicas asociadas a obesidad.

En la presente Tesis Doctoral se plantea como objetivo principal el análisis de la respuesta de los adipocitos a cambios en los componentes de la matriz extracelular, en particular de lumican y colágeno VI, que pueden definir o comprometer la función de estas células y la capacidad de expansión del tejido adiposo en condiciones de obesidad. Para alcanzar este objetivo, se plantean los siguientes objetivos específicos:

- 1) Optimización de un sistema de cultivo 3D de adipocitos mimético de la matriz extracelular del tejido adiposo.
- 2) Caracterizar el efecto del proteoglicano lumican en la reorganización de la matriz extracelular y su impacto sobre la fisiopatología de los adipocitos.
- 3) Analizar la influencia de colágeno VI sobre la diferenciación y función de los adipocitos y su interacción con otros componentes extracelulares implicados en la fibrosis del tejido adiposo en condiciones de obesidad (colágeno I, lumican).

Materiales y
Métodos

3.1. Material Biológico

Para abordar los objetivos planteados en esta Tesis Doctoral, se han utilizado muestras de tejido adiposo humano, cultivos celulares primarios de preadipocitos y adipocitos humanos aislados a partir de dichas muestras. También se ha utilizado como modelo *in vitro*, la línea celular de fibroblastos embrionarios de ratón 3T3-L1, con capacidad para diferenciarse a adipocitos maduros.

3.1.1. Cohorte de estudio

Se obtuvieron muestras pareadas de tejido adiposo subcutáneo (SC) y omental (OM) de individuos con obesidad mórbida (índice de masa corporal (IMC) > 45 kg/m²). Los sujetos fueron reclutados en la Unidad de Endocrinología y Nutrición del Hospital Clínico Virgen de la Victoria (Málaga, España) y la Unidad de Lípidos y Arterioesclerosis del Hospital Universitario Reina Sofía (Córdoba, España). Las biopsias fueron obtenidas durante procedimientos de cirugía bariátrica, siempre de la misma localización anatómica, el tejido adiposo OM se obtuvo del epiplón mayor y el tejido adiposo SC se obtuvo del área abdominal.

Se evaluó el historial médico, el examen físico y la comorbilidad en todos los sujetos antes de ser incluidos en el estudio. Se consideraron los siguientes criterios de inclusión: hombres y mujeres caucásicos entre 18-65 años, sin patologías subyacentes en la exploración física y pruebas realizadas. Los criterios de exclusión fueron: la presencia de diabetes mellitus tipo 2 (T2D) en tratamiento con insulina, embarazo o lactancia, algún tipo de enfermedad sistémica grave no relacionada con la obesidad (enfermedades infecciosas, cáncer, nefropatía o hepatopatía grave), así como enfermedad cardiovascular mayor en los 6 meses previos a la inclusión en el estudio y/o enfermedad inflamatoria aguda o crónica. Los sujetos fueron clasificados en dos grupos según el grado de resistencia a insulina que se estimó según los criterios determinados por la ADA (*American Diabetes Association*) [Normogluemia (NG): Glucosa plasmática en ayunas < 100 mg/dL, hemoglobina glicosilada (HbA1c) < 5,7 %; e Insulinorresistencia (IR): Glucosa plasmática en ayunas: (100-126 mg/dL, HbA1c: 5.7%-6.4%) (American Diabetes, 2019; ElSayed et al., 2023).

Se obtuvo el consentimiento informado de todos los individuos que participaron en el estudio. Los protocolos de estudio fueron aprobados por los Comités de Ética e Investigación de los correspondientes hospitales siguiendo todos ellos la Declaración de Helsinki y el protocolo de buenas prácticas clínicas.

3.1.2. Cultivo primario de adipocitos humanos

Las biopsias de tejido adiposo se sometieron a un proceso de dispersión enzimático-mecánico. Para ello, las muestras se lavaron en tampón Dulbecco (D-PBS; Sigma-Aldrich; Madrid, España) y se dispersaron mecánicamente en DMEM/F-12 (Lonza; Basilea, Suiza) con ayuda de un bisturí. Posteriormente, se añadió una solución de colagenasa tipo V (400 unidades/mL) (Sigma-Aldrich) y la mezcla se incubó durante 30 min a 37°C, en agitación. El tejido no digerido se eliminó pasando la solución por un filtro celular (BDFalcon; Glendale, AZ) de 100 µm de poro, y se centrifugó a 600 x g durante 10 min. El pellet resultante, se resuspendió en DMEM/F-12, se filtró a través de un filtro celular de 40 µm de poro (BDFalcon) y se centrifugó a 400 x g, durante 5 min. El nuevo pellet, que contenía la fracción de estroma vascular (SVF), se resuspendió en 500 µL de tampón de lisis de eritrocitos (*RBC Lysis Solution*, Purigene, MN, EE.UU.), se incubó durante 3 min a temperatura ambiente y se centrifugó a 400 x g durante 10 minutos. Las células de la SVF se sembraron en medio de proliferación de preadipocitos [DMEM/F-12 suplementado con biotina 8 mM, ácido d-pantotenato 18 mM, ascorbato 100 mM y penicilina-estreptomina al 1% (v/v) (Sigma)] suplementado con 10% (v/v) de suero de ternero recién nacido (NCS) (ThermoFisher Scientific; Madrid, España), bajo condiciones controladas de humedad y temperatura (5% de CO₂ y 37 °C). Se realizaron 2-3 subcultivos de mantenimiento para purificar el cultivo (Sanchez-Ceinos et al., 2021) mediante el uso de una solución comercial de 0,5 g/L de tripsina y 0,2 g/L de EDTA (Sigma-Aldrich). El medio fue reemplazado cada 2 días por medio fresco de proliferación de preadipocitos hasta alcanzar el 80% confluencia. Posteriormente, los preadipocitos primarios se diferenciaron a adipocitos maduros tras la administración del medio de diferenciación [medio de proliferación de preadipocitos con 3 % de NCS (v/v) y glucosa 17,5 mM] suplementado con 10 µg/mL de insulina, 0,1 µM dexametasona, 1 µM de rosiglitazona e IBMX 0,5 mM (Sigma), durante 3 días. Posteriormente, el medio se retiró

y se reemplazó por medio de diferenciación, suplementado con insulina 10 µg/mL y dexametasona 0,1 µM. Pasados 3 días (día 6), el medio de diferenciación se refrescó y se mantuvo hasta el día 10 de diferenciación.

3.2. Cultivo de la línea celular 3T3-L1

Para este estudio se ha utilizado la línea celular 3T3-L1 procedente de fibroblastos embrionarios de ratón ATCC (American Type Culture Collection).

3.2.1. Cultivo 2D de la línea celular 3T3-L1

Los fibroblastos 3T3-L1 fueron cultivados en botellas de 150 cm² (densidad de 2.000 cél/cm²) en medio de mantenimiento *Dulbecco's Modified Eagle Medium* [DMEM, Gibco] con 4.5 g/L de glucosa y suplementado con 10% (v/v) de suero de ternero recién nacido (NCS) (ThermoFisher Scientific), 2% glutamina (ThermoFisher Scientific; Madrid, España), 1% (v/v) Gentamicina-Estreptomicina (ThermoFisher Scientific; Madrid, España) bajo condiciones controladas de humedad y temperatura (5% de CO₂ y 37 °C). Los cultivos de mantenimiento se realizaron 2 veces a la semana mediante el uso de una solución comercial de 0,5 g/l de tripsina y 0,2 g/l de EDTA (Sigma-Aldrich). El medio fue reemplazado cada 2 días por medio fresco y el cultivo se mantuvo hasta alcanzar el 70-80% confluencia. Las células obtenidas se sometieron a un *test* de viabilidad celular con azul tripán y posteriormente se sembraron en placas de 12 pocillos (2.000 cél/cm²) con medio de mantenimiento hasta alcanzar el 100% de confluencia.

Posteriormente, los fibroblastos se diferenciaron a adipocitos mediante la administración de un cóctel hormonal. Para ello, las células se incubaron con medio de diferenciación 1 [día 0; DMEM con 4.5 g/L de glucosa suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS) Sigma-Aldrich), 0.01 mg/mL de insulina (ThermoFisher Scientific; Madrid, España), 41 mM IBMX (3-Isobutyl-1-methylxanthine) (ThermoFisher Scientific; Madrid, España) y 600 µM Dexametasona (ThermoFisher Scientific; Madrid, España). Pasados 3 días, el medio fue reemplazado por medio de diferenciación 2 [día 3; DMEM

con 4.5 g/L de glucosa suplementado con 10% de FBS y 0.01 mg/mL de insulina], que se mantuvo nuevamente durante 3 días. A partir de ese momento (día 6), los cultivos celulares se mantuvieron con DMEM con 4.5 g/L de glucosa suplementado con 10% de FBS (medio de diferenciación 3), hasta alcanzar el día 9 de diferenciación.

3.2.2. Cultivo 3D de la línea celular 3T3-L1

Para llevar a cabo los cultivos 3D, se puso a punto un modelo de hidrogel basado en solución de colágeno tipo I (COL-I). Para ello, se preparó una solución de COL-I (3,6 mg/mL) a partir de una solución *stock* de 5 mg/mL (3D Culture collagen (Rat tail), Cultex) previamente neutralizada en una solución de tampón HEPES (0,24 g/L) a un pH óptimo de 7.4. Las células 3T3-L1 fueron añadidas a la solución de COL-I a una densidad de 10^5 células/mL solas o en combinación de otros componentes de la matriz extracelular con el fin de poder obtener diferentes modelos *in vitro* de matriz extracelular modulables. Concretamente, a la solución de COL-I se añadió lumican (LUM) a 10 ó 30 ng/mL (Recombinant Human Lumican, RD Systems), y/o colágeno VI (COL-VI) a 36 µg/mL (Corning) (Iyengar et al., 2005; Llacua et al., 2018) con el fin de obtener las posteriores condiciones experimentales de estudio:

- i) Colágeno-I 3.6 mg/mL (COL-I)
- ii) COL-I + Lumican 10 ng/mL
- iii) COL-I + Lumican 30 ng/mL (LUM)
- iv) COL-I + Colágeno-VI 36 µg/mL (COL-VI)
- v) COL-I + LUM + COL-VI (LUM+COL-VI)

Inmediatamente tras la preparación de las distintas soluciones de matrices en hielo, se añadió un volumen final de 200 µL de las correspondientes mezclas por pocillo en placas de 24 pocillos, que se repartió para cubrir el fondo del pocillo de forma homogénea. Las placas se incubaron a 37°C, durante 2 horas para la gelificación de la matriz de colágeno. Pasado este tiempo, se añadió 1 mL de medio de mantenimiento/pocillo. A continuación, los fibroblastos se diferenciaron a adipocitos

siguiendo el protocolo descrito en el apartado anterior, hasta el día 10, cambiando el 50% del medio de diferenciación cada 72 h.

3.3. Modelos in vitro de resistencia a insulina

3.3.1. Modelo de hiperglucemia e hiperinsulinemia

La línea celular 3T3-L1 se expuso a un ambiente de alta glucosa (4,5 g/L) y alta insulina (100nm) (HGHI) durante 24 h, para simular las condiciones de hiperglucemia e hiperinsulinemia asociada a la obesidad, con el fin de recrear un modelo resistencia a insulina in vitro, en las principales células del tejido adiposo, preadipocitos y adipocitos maduros.

Los experimentos se realizaron en cultivos convencionales (2D), se sembraron 2 placas de 12 pocillos, una de ellas se utilizó para el estudio de fibroblastos (día 0 de diferenciación) y otra, para células diferenciadas a adipocitos (día 9 de diferenciación). Se retiró el medio de mantenimiento y se añadió 1 ml de medio de pre-tratamiento [DMEM con 1 g/L de glucosa y suplementado con 0,5% de seroalbúmina bovina (BSA), 2% glutamina, 1% antibiótico-antimicótico] durante 2h para conseguir un estado de quiescencia en las células. Pasado este tiempo, se retiró el medio de pre-tratamiento y se añadieron 500 µl de medio de tratamiento que consistía en medio de pre-tratamiento enriquecido en alta glucosa y alta insulina [DMEM (4,5 g/L de glucosa), Glutamina 2%, Antibiótico-antimicótico 1%, Insulina 100 nM]. Para el control se utilizó medio de pre-tratamiento. Las células se incubaron durante 24h a una temperatura de 37 °C y con una concentración de CO₂ del 5%. Después se procedió a la recogida del medio de cultivo y del extracto proteico para su posterior procesamiento y cuantificación de proteína.

3.4. Análisis de las propiedades mecánicas de los cultivos 3D

3.4.1. Ensayo de compresión

Se llevó a cabo un ensayo de compresión en hidrogeles del COL-I en ausencia o presencia de LUM con el fin de determinar si la presencia de LUM podría modular el comportamiento de los diferentes hidrogeles formados.

Para ello, se utiliza un émbolo o probeta que comprime el gel a una carga de compresión continua de 10N hasta su rotura. Se fijan además las condiciones de altura (9 mm) y velocidad (10 mm/min) del émbolo constantes. El ensayo se llevó a cabo utilizando el equipo twin column Zwick/ Roell PrssoLine Z005 testing device (Roell, Alemania), disponible en la Escuela de Ingeniería de la Universidad de Galway (Irlanda). Para el estudio, se realizaron 2 medidas independientes incluyendo en cada media n=6 geles/ condición. Se registró la fuerza máxima (en Newton, N) ejercida para la rotura del gel en cada condición. Los datos se representaron como la media + ESM de las diferentes medidas.

3.4.2. Ensayo de fibrilogénesis

Realizamos un ensayo de fibrilogénesis *in vitro* (Neame, Kay, McQuillan, Beales, & Hassell, 2000) para monitorizar la formación de fibras de COL-I en condiciones basales o en condiciones experimentales modulando diversos componentes de la ECM:

- i) en presencia de extracto proteico de tejido adiposo SC y OM de pacientes con obesidad y normogluemia (Ob-NG) o con resistencia a insulina (Ob-IR).
- ii) en presencia del proteoglicano LUM y/o COL-VI.

En el caso del extracto proteico procedente de tejido adiposo humano, se añadieron 100 μ L/pocillo de la solución de COL-I (1 mg/mL) y se mezclaron con 100 μ L de extracto proteico (1 mg/mL) de cada grupo Ob-NG y OB-IR (SC y OM), en una placa de 96 pocillos.

En el caso de los hidrogeles, las muestras se prepararon en las mismas condiciones que para los cultivos 3D (ver sección 3.2.2) 100 μ L de cada condición se cargaron en placas de 96 pocillos.

Posteriormente, se monitorizó la turbidez de las diferentes soluciones midiendo la absorbancia (340 nm) durante 2h a 37 °C, con medidas cada 10 min, en un espectrofotómetro (FlexStation3, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EE.UU.). Se determinaron los siguientes parámetros: turbidez máxima, medido como el valor máximo de la absorbancia obtenida para cada mezcla, y que se corresponde con un mayor grosor de las fibras formadas (Abs. Max u.a); velocidad de formación de las fibras, medido como la pendiente de la curva que se obtiene tras la cinética monitorizada (Abs (u.a)/tiempo (min)). En el caso de las muestras humanas, se utilizaron un total de n=5 sujetos/condición; en el caso de los hidrogeles, se realizaron dos medidas independientes con un total de n=5-6 geles/condición.

3.5. Estudios funcionales

3.5.1. Ensayo de viabilidad celular

La viabilidad celular en los cultivos 3D de adipocitos 3T3-L1 fue evaluada mediante el ensayo *AlamarBlue* (Thermo Fisher Scientific) siguiendo las instrucciones del fabricante. Para ello, se retiró el medio de cultivo y se añadió una solución de PBS con 5% del reactivo AlamarBlue Cell Viability Reagent (Thermo Fisher Scientific), que se mantuvo en el cultivo durante 3 h, bajo condiciones controladas de humedad y temperatura (5% de CO₂ y 37 °C). Pasado el tiempo, se recogieron 100 μ L de medio de cultivo y se midió la fluorescencia (Exc/Em 560/590 nm) en un espectrofotómetro (FlexStation3, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EE.UU.). La fluorescencia fue directamente proporcional a la viabilidad celular, que se representó en % respecto al control.

3.5.2. Ensayo de citotoxicidad celular

Del mismo modo, también se determinó la citotoxicidad celular de los adipocitos diferenciados *in vitro* en las diferentes condiciones testadas en el cultivo 3D.

Para ello, se evaluó la liberación de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) al medio de cultivo utilizando el kit comercial *LDH assay kit* (Abcam) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se recogió el medio de cultivo de la placa y se centrifugó previamente 5 min, 600 x *g* para eliminar células flotantes. En una placa de 96 pocillos se incubaron 50 μ L de medio de cultivo de cada condición a testar con 50 μ L del reactivo LDH y se mantuvieron durante 30 min, bajo condiciones controladas de humedad y temperatura (5% de CO₂ y 37 °C). Pasado el tiempo, se midió la absorbancia a 450 nm. La absorbancia obtenida fue directamente proporcional a la citotoxicidad celular, que se representó en % respecto al control.

3.5.3. Estudio de secreción de lumican en células 3T3-L1

El contenido de LUM en los medios de cultivo y en los extractos celulares fue medido durante el proceso de diferenciación de las células 3T3-L1, y después de la exposición a condiciones de hiperglucemia e hiperinsulinemia en fibroblastos y adipocitos 3T3-L1 mediante el ensayo de inmunoadsorción ligado a enzima (ELISA) utilizando un *kit* comercial *Mouse Lumican ELISA Kit* (Abcam, Cambridge, Reino Unido) siguiendo las instrucciones del fabricante.

3.5.4. Estudio de captación de glucosa en células 3T3-L1

La media de captación de glucosa tras la estimulación con insulina (200 nM; 1 h) se realizó en adipocitos 3T3-L1 diferenciados (D10) en los cultivos 3D mediante el Kit comercial *Glucose Uptake-Glo™* (Promega) siguiendo las instrucciones del fabricante. Una vez diferenciadas (ver sección 3.2.1), las células en cultivo se lavaron tres veces con tampón PBS, y se añadió finalmente 500 μ l del mismo tampón a cada pocillo durante 2h. A continuación, las células se incubaron en PBS conteniendo 200 nM de Insulina y 1mM

de2-Deoxy-D-glucose (2DG), durante 1h a 37⁰C. Tras este tiempo, se paró y neutralizó la reacción añadiendo los tampones proporcionados por el kit comercial (*stop Buffer* y *neutralization Buffer*) y se incubaron durante 30 min a 25⁰C con 2DG6P *detection reagent*. Pasado ese tiempo, la luminiscencia se midió a 578 nm usando un espectrofotómetro (FlexStation3, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EE. UU.). Los datos se expresaron como incremento de cambio (*fold change*) de captación de glucosa en respuesta a insulina, respecto al control.

3.5.6. Ensayo de bloqueo de receptor β 1-integrina

Para analizar la respuesta de los adipocitos 3T3-L1 vía receptor β 1-integrina, se llevó a cabo un ensayo de bloqueo del receptor β 1-integrina.

En primer lugar, se retiró el medio de mantenimiento y se añadió 1 mL de medio de pre-tratamiento. Pasadas 2 h, las células fueron incubadas con el anticuerpo bloqueante de β 1-integrina (5 μ g/mL) (Anticuerpo Monoclonal CD29, Invitrogen), o con un isotipo IgG como control negativo (5 μ g/mL) (Armenian Hamster IgG Isotype Control, Invitrogen), durante 1h a 37⁰C. Posteriormente, las células fueron tratadas con LUM (30 ng/ml) y/o con COL-VI (36 μ g/mL) durante 15 minutos en presencia del control negativo y del anticuerpo β 1-integrina. Finalmente, el extracto proteico fue recogido para su posterior análisis por inmunoblotting (ver sección 3.7.7).

3.6. Estudios de microscopía

3.6.1. Microscopía óptica

Se llevaron a cabo estudios de microscopía óptica con el fin de analizar diferencias morfológicas entre las células diferenciadas en cultivos 3D y el grado de diferenciación. Concretamente, al final de los experimentos, las células en cultivo se observaron con un microscopio óptico invertido (modelo Motic[®] AE31 Inverted) y se tomaron imágenes a 400 x aumentos.

Se evaluó la morfología de las células en los diferentes hidrogeles analizando la forma de las células: alargada típica de la morfología de fibroblasto vs. célula redondeada con la presencia de gotas lipídicas reflectantes, característica del adipocito diferenciado.

3.6.2. Microscopía confocal

También se realizaron estudios de microscopía confocal en adipocitos 3T3-L1 para estudios de localización y traslocación de proteínas, así como estudios de diferenciación analizando el contenido lipídico. Se utilizaron células 3T3-L1 diferenciados hasta día 10 en hidrogeles de COL-I (3,6 mg/mL) en ausencia o presencia de LUM y/o COL-VI, sembrados sobre cubreobjetos (10^5 /mL)). Al final de la diferenciación, las células se fijaron con paraformaldehído al 4% (p/v) durante 15 min, a temperatura ambiente. Posteriormente, se lavaron 3 veces en PBS (0,01 M, pH 7,4) y las células se procesaron para inmunocitoquímica (ICC) o para tinción *Nile Red*.

3.6.3. Inmunocitoquímica de células 3T3-L1

Para llevar a cabo la ICC, las células, previamente fijadas, se incubaron con el anticuerpo primario diluido en tampón de anticuerpo [PBS conteniendo saponina al 0,3% (v/v) y BSA al 0,5% (m/v)] durante toda la noche a 4 °C. En la tabla 1 se indican los diferentes anticuerpos primarios utilizados para los estudios de ICC. El exceso de anticuerpo primario no unido fue eliminado mediante tres lavados con tampón PBS y las células fueron incubadas con el anticuerpo secundario apropiado conjugado con el fluorocromo Alexa 488 ó 594 (Molecular Probes, Eugene, OR, EE.UU.) a temperatura ambiente durante 2 h. Pasado el tiempo, las células se lavaron 3 veces con tampón PBS 1x frío para eliminar el exceso de anticuerpo no unido. Los núcleos de las células se tiñeron con 1 µg/mL DAPI (Sigma Aldrich, San Luis, MO, EE.UU.) en PBS durante 5 min a 37°C y se montaron los cubreobjetos utilizando el medio de montaje (20 µl/muestra) DAKO (Dako North America, CA) y DAPI (1µg/mL) (Sigma) para marcar los núcleos. Finalmente, las preparaciones se guardaron a 4°C, en oscuridad, hasta su visualización en el microscopio confocal para su posterior análisis.

3.6.4. Tinción de *Nile Red*

Para evaluar la presencia de lípidos neutros, componente principal de la gota lipídica de los adipocitos, se usó la tinción *Nile Red* (Sigma). Para ello, las células previamente fijadas, se lavaron 3 veces con PBS y se incubaron con la solución de *Nile Red* (1 mg/mL metanol) diluido 1/1000 en tampón PBS durante 15 min. Pasado, el tiempo, se realizaron nuevamente 3 lavados en PB y se montaron las preparaciones añadiendo a cada pocillo 20 μ l de medio de montaje DAKO (Dako North America, CA) y DAPI (1 μ g/mL) (Sigma). Por último, las preparaciones se guardaron a 4°C, en oscuridad, hasta su visualización en el microscopio confocal para su posterior análisis.

3.6.5. Análisis de imagen por microscopía confocal

Las imágenes obtenidas de cada ensayo se obtuvieron con un microscopio confocal espectral LSM 710 (Carl Zeiss, Oberkochen, Alemania), disponible en la Unidad de Microscopía Óptica Avanzada del Instituto Maimónides de Investigación Biomédica de Córdoba (IMIBIC).

Para la visualización de las diferentes proteínas incluidas en los estudios de localización celular, las muestras incubadas con el anticuerpo secundario conjugado con el fluorocromo Alexa 594 se excitaron a una $\lambda = 594$ nm y se recogió la emisión a una $\lambda = 600-700$ nm; con Alexa 488, se excitaron a una $\lambda = 488$ nm y se recogió la emisión a una $\lambda = 500-550$ nm. Para la visualización de los núcleos marcados con DAPI, las muestras se excitaron a una $\lambda = 305$ nm y se recogió su emisión a una $\lambda = 350-460$ nm. Los análisis cuantitativos se llevaron a cabo tomando entre 5-10 planos focales por cada canal, basándose en el tamaño celular y la localización de la señal fluorescente. Además, se eligieron entre 10-15 campos microscópicos al azar de cada una de las preparaciones adquiriendo imágenes que fueron procesadas con el programa *ImageJ* (v1.50b, NIH).

Para la visualización de las muestras teñidas con *Nile Red*, se usó una excitación de $\lambda = 594$ nm y se recogió la emisión entre 600-700 nm. Las imágenes correspondientes se analizaron midiendo contenido lipídico total, medido por área de tinción teñida; tamaño de gotas lipídicas/adipocito y número de gotas lipídicas/adipocito.

3.6.6. Microscopía electrónica de barrido

Con el fin de determinar la organización de las fibras de colágeno en los cultivos, se procedió a la puesta a punto y aplicación de un protocolo de preparación de los mismos para su observación mediante microscopía electrónica de barrido. Concretamente, las células 3T3-L1 fueron cultivadas en hidrogeles de COL-I y diferenciadas a adipocitos maduros hasta el día 10 de diferenciación. Tras retirar el medio de cultivo y realizar un lavado de las muestras en PBS (0,01 M, pH 7,4), éstas se fijaron con glutaraldehído al 2% (m/v) diluido en tampón PBS, durante 48 h a 4°C. A continuación, el proceso de deshidratación y “*sputtering*” (recubrimiento de la muestra con oro) se realizó en el Servicio de Microscopía Electrónica del Servicio Central de Apoyo a la Investigación (SCAI) de la Universidad de Córdoba (UCO). Las preparaciones fueron examinadas mediante microscopía electrónica de barrido utilizando un equipo JEOL JSM 7800F. Finalmente, se analizó el grosor de las fibras y el espacio que queda entre ellas, así como su orientación con el complemento DiameterJ, del software *ImageJ*.

3.7. Identificación de proteínas

3.7.1. Extracción de proteínas de tejido adiposo humano

Se realizaron estudios de proteínas en muestras de tejido adiposo humano mediante *western blot*. Para ello, se tomaron 50 mg de tejido adiposo/200 µL de tampón de lisis convencional (BLC) [0.5 M Tris-HCl, pH 7.4, 5 M NaCl, 0.5 M EDTA, 5% Na-Deoxicolato, 4% SDS, Tx-1000, H₂O destilada, suplementado con los inhibidores de proteasas (1 µL/mL PMSF 100 nM + 1 µL/mL CLAP)]. Las muestras se homogenizaron con un homogeneizador de teflón en eppendorf, en frío y se realizaron dos series de sonicación (2 pulsos de 20 s/pulso) separadas por periodos en hielo (10 y 15 min) para favorecer la solubilización de las proteínas. Posteriormente, las muestras se centrifugaron 2 veces a 9.000 x g durante 15 min a 4°C, recogiendo la fase intermedia, que contenía las proteínas citosólicas y evitando coger la fase lipídica que queda por encima de esta. La cuantificación de proteínas se llevó a cabo mediante el método de cuantificación Bradford (ver sección 3.7.6).

3.7.2 Extracción de proteínas de cultivos celulares

La extracción de proteína en los cultivos celulares se recogió tanto el medio de cultivo como los extractos celulares en los cultivos 2D y 3D en los diferentes días de diferenciación (días 0, 3, 6, 9, y 10).

3.7.3. Obtención de extracto proteico a partir del medio de cultivo

El medio de cultivo de cada día correspondiente (500 μ L) se centrifugó a 13.500 x g durante 5 min a 4 °C y el sobrenadante, libre de células, se congeló a -20 °C hasta su uso. Para concentrar proteínas secretadas al medio de cultivo, se realizó una precipitación con acetona-metanol. Para ello, se añadieron 4 volúmenes de acetona fría por cada volumen de muestra, se agitó con vórtex y se dejó a -20 °C durante toda la noche. Posteriormente, se centrifugó a 1.000 x g durante 5 min a 4 °C y el *pellet* formado (contenido de proteína), se lavó con 100 μ L de metanol frío. Finalmente, se eliminó el metanol y se dejó secar el *pellet* durante 5 min, que se resuspendió a continuación en tampón de lisis BLC y se cuantificó el contenido de proteína por el método de Bradford.

3.7.4. Obtención de extracto proteico a partir de células 3T3-L1 en cultivos 2D

Para la obtención de los extractos proteicos a partir de las células en cultivos 2D (cultivos en monocapa), se realizaron 3 lavados con PBS frío y se añadieron 150 μ L/pocillo de tampón SDS-DTT (Tris-HCl 62.5 mM, pH 7.6, SDS 2%, Glicerol 20%, DTT 100 mM) previamente calentado a 65 °C. Con una pipeta de punta azul, se realizó un movimiento en espiral sobre el fondo de la placa, consiguiendo levantar las células del fondo y obteniendo un agregado del extracto proteico que se recogió, se sónico (3 pulsos, 3 s, A = 30) y se congeló a -20 °C hasta su uso.

3.7.5. Obtención de extracto proteico a partir de células 3T3-L1 en 3D

Para la lisis celular a partir de cultivos 3D, se eliminó el sobrenadante y se realizaron 3 lavados con PBS 1X frío, y se añadió 150 μ L de BLC 2X. Las células se sonicaron (3 pulsos, 3 s,) y el extracto celular se centrifugó a 13.500 x g, 10 min. El sobrenadante (fracción citosólica) se recogió y se cuantificó el contenido de proteínas por el método de Bradford.

3.7.6. Cuantificación de proteínas: método de Bradford

Para las muestras recogidas en tampón BLC, se determinó la concentración de proteína final mediante el método de Bradford (Bradford, 1976).

Para ello, se usó como estándar la proteína seroalbúmina bovina (BSA), y se preparó una curva patrón con BSA, a concentraciones comprendidas entre 0-1.5 mg/mL. Tanto la muestra como la curva patrón se cargaron en una placa de 96 pocillos añadiendo 5 μ L de muestra/estándar y 200 μ L de solución de Bradford (Bio-Rad) por pocillo. La mezcla se incubó 15 min, en oscuridad, 25 °C, y se midió la absorbancia a 595 nm en un espectrofotómetro (FlexStation3, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EE. UU.). Posteriormente, las muestras fueron ajustadas a 1 mg/mL de proteína con tampón de lisis BLC y el extracto proteico (20 μ g) se mezcló con tampón LB (Loading Buffer: 30% glicerol, 0.3% azul de bromofenol) más 0.05 μ L/mL de β -Mercaptoetanol y 0.2 μ L/mL de DTT 1M) y se congelaron a -20 °C hasta su uso.

3.7.7. Western blot: Electroforesis desnaturizante, electrotransferencia e inmunodetección

La detección de proteínas en los medios de cultivo y extractos celulares, así como en extracto de tejido adiposo humano fue realizada mediante *western blot*.

Las muestras, una vez preparadas y ajustadas, se calentaron a 95 °C durante 5 min y se cargaron (20-30 µg) en geles de acrilamida al 10%, que se introdujeron en una cubeta de electroforesis con tampón de migración (Tris 25 mM, Glicina 190 mM, 01% SDS, pH 8.3) y se realizó la electroforesis a 80-120 V durante 1,5 h.

Posteriormente, se realizó la transferencia de proteínas a una membrana de nitrocelulosa para lo que éstos se pusieron en contacto en un montaje en “sandwich” y se introdujo en la cubeta con tampón de transferencia (Tris 25 mM, Glicina 190 mM, 20% de metanol) a 300 mA durante 60 min. La transferencia se realizó en agitación y hielo. Tras la transferencia, las membranas se tiñeron con 0.1% (p/v) rojo Ponceau en 1% de ácido acético durante 5 min en agitación. La imagen se escaneó para utilizar posteriormente la intensidad de tinción como control de carga. Finalmente, las membranas se bloquearon con leche al 5% diluida en TTBS [TBS (Tris 0.004 M, NaCl 0.3 M, pH 7.4) + 0.05% Tween 20] durante 1 h en agitación, para evitar uniones inespecíficas del anticuerpo.

Las membranas se incubaron con los anticuerpos primarios (tabla 1) durante toda la noche a 4 °C en agitación, tras lo cual se sometieron a 3 lavados con TTBS durante 10 min en agitación. La incubación con anticuerpos secundarios se realizó a temperatura ambiente durante 1 h en agitación.

El revelado de las membranas se realizó con el equipo *ChemiDoc Touch Imaging System* que detecto la señal fluorescente del fluoróforo conjugado con los anticuerpos secundarios correspondientes (StarBright Blue 520 y StarBright Blue 700 (Bio-Rad)), obteniendo una imagen que posteriormente fue cuantificada con el *software ImageJ*.

<i>Anticuerpo</i>	<i>Casa comercial</i>	<i>Referencia</i>	<i>Especie hospedadora</i>	<i>Dilución</i>
<i>Adiponectin</i>	Novus Biologicals	NBP2- 22450	<i>Mouse</i>	1/1000
<i>MST-1</i>	Cell Signaling	#3682	<i>Rabbit</i>	1/750
<i>YAP-1</i>	Abcam	ab205270	<i>Rabbit</i>	1/750
<i>TAZ</i>	Abcam	ab224239	<i>Rabbit</i>	1/1000
<i>IRS</i>	Santa Cruz	Sc-7200	<i>Rabbit</i>	1/1000
<i>AS160</i>	Millipore	07-741	<i>Rabbit</i>	1/1000
<i>GLUT-4</i>	Invitrogen	MA5-17176	<i>Mouse</i>	1/250
<i>p-AKT</i>	Cell Signaling	#4060	<i>Rabbit</i>	1/1000
<i>AKT</i>	Cell Signaling	#9272	<i>Rabbit</i>	1/1000
<i>Aldolase</i>	Novus Biological	NB600-915	<i>Goat</i>	1/750
<i>p-FAK</i>	Thermo Scientific	700255	<i>Rabbit</i>	1/1000
<i>FAK</i>	Thermo Scientific	39-6500	<i>Mouse</i>	1/500
<i>P-ERK</i>	Cell Signaling	#4377	<i>Rabbit</i>	1/1000
<i>ERK</i>	Santa Cruz	Sc-154	<i>Rabbit</i>	1/750
<i>β1-integrin</i>	Santa Cruz	sc-6622	<i>Goat</i>	1/500
<i>Lumican</i>	Abcam	ab70191	<i>Mouse</i>	1/100

Tabla 1. *Anticuerpos primarios utilizados en el estudio.*

3.8. Técnica de inmunohistoquímica

3.8.1. Tinción de Rojo Picrosirio

Se seleccionaron cortes de muestras pareadas de tejido adiposo de ambos grupos de pacientes (6 cortes/grupo) que fueron teñidos con Rojo Picrosirio, una tinción específica para las fibras de colágeno (Henegar et al., 2008). En primer lugar, se procedió al desparafinado de los cortes por inmersión en 2 baños de xileno para eliminar totalmente la parafina de las secciones. Posteriormente, fueron rehidratados sumergiéndolas en una serie descendente de alcoholes (100-90-80-70), finalizando con su inmersión en agua. Una vez rehidratados, se procedió a la tinción de los cortes con Rojo Picrosirio durante una hora a temperatura ambiente. Tras sumergir los cortes en una serie ascendente de alcoholes (70-80-90-100) y finalizando con su inmersión en

Xileno, se procedió al montaje de las muestras añadiendo a cada preparación una gota del medio de montaje EUKITT (PanReac Applichem).

3.8.2. Tinción de lumican

Para cuantificar la cantidad de LUM, después del proceso de desparafinado y rehidratación (descrito anteriormente), los cortes histológicos se incubaron con peróxido de hidrogeno al 3% durante 10 min, después se realizaron dos lavados con agua destilada durante 5 min y otro lavado con PBS 1X durante 5 min. La solución de bloqueo (PBS 1X; 0.1% Tritón; 1% BSA) se aplicó durante 30 min, a continuación, se incubó con el anticuerpo primario (anti-LUMICAN mouse, 1:50 en solución PBS; 0.1% Tritón; 1% BSA) durante toda la noche a 4 °C. Tras realizar 3 lavados con PBS durante 5 min, se incubó con el anticuerpo secundario (anti-mouse biotín, 1:100, en solución de PBS; 0.1% Tritón; 1% BSA) a temperatura ambiente durante 1 hora. Pasado el tiempo, las preparaciones se incubaron con el reactivo ABC (ThermoFisher) a entre 45 min y 1 hora. Tras 3 lavados con PBS durante 5 min se reveló con Diaminobencidina (DAB) (Agilent), que en presencia de agua oxigenada generó un sustrato que reaccionó con la enzima peroxidasa conjugada con el anticuerpo secundario, dando como resultado un producto que precipitó y formó una señal visible de color marrón oscuro de forma permanente.

La observación y fotografía de las secciones de tejido adiposo se realizó con un microscopio modelo DM 5000 B que incorpora una cámara DC 500 (Leica, Alemania) utilizando el software Leica IM 50 *Image manager*, ubicados en el Servicio de Microscopia de la Universidad de Córdoba (Servicio Central de Apoyo a la Investigación, SCAI).

En las imágenes digitales obtenidas se cuantificó la cantidad de colágeno y de LUM presente en tejido adiposo SC y tejido adiposo OM en los 2 grupos de estudio mediante la cuantificación del área total teñida en la imagen con el programa de procesamiento de imagen digital *ImageJ*. En el caso de la tinción de rojo picrosirio, se analizó la presencia de fibrosis total, evaluando el área de la imagen teñida en imágenes obtenidas a 20x. También se analizó la presencia de fibrosis pericelular, evaluando el área

teñida alrededor de los adipocitos, en imágenes obtenidas a 40x. En el caso del contenido de LUM, se evaluó el área teñida en imágenes obtenidas a 20x.

3.9. Expresión génica

3.9.1. Extracción de ARN

Para la extracción de ARN a partir de las muestras recogidas en Trizol (ThermoFisher), se añadieron 200 μ L de cloroformo/pocillo. Las muestras fueron centrifugadas a 12.000 x *g* durante 15 minutos, a 4°C. Se recogieron aproximadamente 500 μ L de la fase acuosa y se mezclaron con 500 μ L de isopropanol en una proporción 1:1 para la precipitación del ARN. Tras una incubación de 10 minutos a temperatura ambiente, las muestras se centrifugaron a 12.000 x *g* durante 10 minutos, a 4°C. El pellet obtenido se lavó con 1 mL de etanol al 75% (v/v) y se centrifugó a 7.500 *g* durante 5 minutos, a 4°C. Finalmente, el pellet se reconstituyó en 11 μ L de H₂O libre de nucleasas (Promega). La concentración y pureza del ARN obtenido se cuantificó en un espectrofotómetro NanoDrop 2000 (DENOVIX DS11) mediante la determinación de la absorbancia a 260 nm y de la proporción 260/280 nm, respectivamente.

3.9.1. Retrotranscripción

Para la retrotranscripción de ARN a ADN copia (ADNc), se utilizó el kit comercial *RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit* (Thermo Fisher Scientific) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se ajustaron las muestras a 1 μ g de ARN y se añadió 1 μ L de *Random hexamer primer* y H₂O *RNAse free* hasta un volumen final de 12 μ L. Esta mezcla se incubó durante 5 minutos a 65°C y se preparó la *Máster mix* según la composición y los volúmenes indicados en la tabla 2. La mezcla de reacción se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente, seguida de 1 hora a 42°C, temperatura a la que las enzimas llevan a cabo la reacción de retrotranscripción. Finalmente, la reacción se paró incubando las muestras durante 5 minutos a 70°C para la desnaturalización de las enzimas y obtener así el ADNc, que se guardó a -80°C hasta su uso.

	Volumen/reacción
5x Reaction buffer	4 μ L
Ribolock RNase inhibitor (200 U/ μ L)	1 μ L
10 mM dNTP mix	2 μ L
RevertAid M-MuLV RT (200 U/ μ L)	1 μ L

Tabla 2. Composición de la Master Mix utilizada para la realización de la retrotranscripción.

3.9.2. Diseño de primers para los estudios de PCR cuantitativa a tiempo real (RT-Qpcr) y validación por PCR convencional

Todos los cebadores utilizados para la amplificación del ADNc (tabla 3) fueron diseñados para su hibridación entre dos exones para evitar la amplificación de ADN genómico, en lugar de ADN transcrito. Las secuencias completas de los genes diana se obtuvieron de la base de datos *PubMed Nucleotide* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide>). Para el diseño de cebadores se utilizó la herramienta informática *Primer3* mediante la cual se seleccionaron las parejas de cebadores que cumplieran las siguientes características:

- Generación de un producto de amplificación entre 80-200 pb.
- Tamaño de cebador entre 18 y 23 pb.
- Temperatura de *melting* entre 60 y 61^o C.
- Contenido en GC entre el 45 y 55%.
- Complementariedad máxima entre *primers* igual a 4.
- Complementariedad máxima con el extremo 3' igual a 0.

Gen	Left	Right
Srebp-1	5'-GTGGACAAGAACAGCAACGA-3'	5'-TCACTGGTCAACTCCAGCAC-3'
C/ebpa	5'-GTGGACAAGAACAGCAACGA-3'	5'-TCACTGGTCAACTCCAGCAC-3'
Ppary	5'-ACAGGAAAGACAACGGACAAA-3'	5'-AGGCTCCATAAAGTCACCAAAG-3'
Fabp4	5'-AAGAAGTGGGAGTGGGCTTT-3'	5'-CTGTCGTCTGCGGTGATTT-3'
Seipin	5'-CGTGATCGGGTACTGATGTATG-3'	5'-CACTGAGCGTGAAGAAGTGG-3'
Cidea	5'-ATGGGATTGCAGACTAAGAAGGG-3'	5'-TAACCAGGCCAGTTGTGATG-3'
Cidec	5'-TCCCAGAAGCCAACTAAGAAGA-3'	5'-TAACCAGGCCAGTTGTGATG-3'
Plin-1	5'-AAGCATCGAGAAGGTGGTAGAG	5'-GTGTGTCGAGAAAGAGTGTGG
Tead1	5'-CAAACCTCAGGACGGGAAAGA-3'	5'-GCTTGTTGTGGATGGCAGTAG-3'
Lamin A	5'-CGCAAGACCCTTGATTCTGT-3'	5'-ACAAGTCCCCCTCTTCTTG-3'
Insulin Receptor	5'-GTTCAAGACCAGACCCGAAG-3'	5'-TCCAGACCATAGACACGGAAG-3'
Glut-4	5'-GAGAAACGGAAGTTGGAGAGAG-3'	5'-TTGATGCCTGAGAGCTGTTG-3'
Gapdh	5'-CTCCTGGAAGATGGTGTATGG-3'	5'-GTGGCAAAGTGGAGATTGTTG-3'
Cd36	5'-CCTCTGACATTTGCAGGTCTATC-3'	5'-CAATGGTTGTCTGGATTCTGG-3'
Acs1	5'-AGCAGTTCATCGGCCTCTT-3'	5'-GTTTGGCTTTTTCTGGCTTG-3'
Gpat	5'-TTATCACCAGGACGGAAGG-3'	5'-TCTCTTTGAAAACCCCGATG-3'
Agpat	5'-CCTCATCCTGACGTTCTTGG-3'	5'-CGGATCAGGTTATGGGTGTT-3'
Dgat-2	5'-AGCTATCCAGACAACCTGACCTAC-3'	5'-CAAGAACTCGTCGTAGCAGAAA-3'
Acs1	5'-AGCAGTTCATCGGCCTCTT-3'	5'-GTTTGGCTTTTTCTGGCTTG-3'
Acly	5'-CACCTCCAAGAAGCCAAATC-3'	5'-CCAATGAAGCCCATACTCCTT-3'
Acc	5'-TCCGCACTGACTGTAACCAC-3'	5'-ATTTCCATAGCCGACTTCCA-3'
Fasn	5'-CCGTCACTTCCAGTTAGAGCA-3'	5'-GAGGCGTAGTAGACAGTGCAGA-3'
β-Integrin	5'-ATGCAGGTTGCGGTTTGT-3'	5'-CAATACCACCAAGTTCCCATC-3'
Hprt	5'-TGGATACAGGCCAGACTTTGTT-3'	5'-TTGCGCTCATCTTAGGCTTT-3'

Tabla 3. Secuencia de cebadores validados utilizados para la RT-qPCR. Fueron diseñados usando como genoma de referencia de *Mus musculus*.

Los cebadores fueron validados previamente en las bases de datos *Primer Blast* y *Blast Nucleotide*, así como por PCR convencional para evitar amplificaciones inespecíficas.

3.9.3. PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR)

Los niveles de expresión de los genes de interés fueron cuantificados mediante RT-qPCR haciendo uso del termociclador *LightCycler® 480 System* (Roche), disponible en el Servicio de Genómica del IMIBIC, y el kit comercial *GoTaq® qPCR Master Mix* (Promega, EE.UU.) siguiendo las indicaciones del fabricante.

Las condiciones de la reacción de PCR se muestran en la tabla 4. Todas las medidas de expresión fueron estandarizadas a la expresión de el gen de referencia HPRT. El ADNc se utilizó en una dilución 1:5 para el estudio de genes diana y de referencia. El cálculo de la expresión relativa de los todos los genes se realizó según el modelo matemático $2^{(-\Delta\Delta CT)}$ ($\Delta\Delta CT$).

	Nº ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo (seg)
Activación	1	95	120
Desnaturalización	40	95	15
Unión/Extensión		60	60
Disociación	1	60-95	

Tabla 4. Programación del termociclador para la amplificación de ADNc por RT-qPCR.

3.10. Docking proteína-proteína

3.10.1. Adquisición de las estructuras 3D de las proteínas de interés

Se llevó a cabo la búsqueda de las estructuras disponibles de las proteínas de interés: COL-I, LUM y COL-VI en la base de datos *RCSB Protein Data Bank* (<https://www.rcsb.org>). Se seleccionaron para el posterior estudio de *docking* proteína-proteína, las diferentes estructuras de COL-I (PDB ID: 1K6F), COL-VI $\alpha 3$ dominio N2 (PDB ID: 6SNK) y COL-VI $\alpha 3$ dominio N5 (PDB ID: 4IGI). Para la molécula de LUM, no se obtuvieron resultados positivos por lo que se pasó a realizar el modelado de su estructura tridimensional.

3.10.2. Modelado de lumican

La predicción de la estructura tridimensional de LUM (B99990003) se llevó a cabo utilizando el software *Modeller* 10.1 (<https://currentprotocols.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/cpbi.3>). Para ello, la secuencia del gen y de la proteína de LUM fue obtenida a partir de NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/>; GenBank ID: EAW97449.1) y de la base de datos *UniProt* (<https://www.uniprot.org>; P51884 LUM_HUMAN), respectivamente. Se realizó un modelado comparativo por homología (*NCBI BLAST protein*) utilizando fibromodulina (5MX0_A) con un 46.54% de identidad de secuencia y 2.2 Å de resolución (*RCSB Protein Data Bank* (<https://www.rcsb.org/>)). De los modelos generados por *Modeller*, se seleccionó el que tenía menor valor de DOPE (energía proteica optimizada discreta).

3.10.3. Estudio de *Docking* proteína – proteína

Para determinar la estructura de los complejos macromoleculares formados entre COL-I, LUM y COL-VI se realizó un estudio de *docking* proteína – proteína utilizando el software *ClusPro* 2.0, (<http://cluspro.bu.edu>) (Kozakov et al., 2017). Se llevaron a cabo representaciones tridimensionales para los complejos macromoleculares de COL-I/LUM, COL-I/COL-VI y LUM/COL-VI, así como de COL-I/LUM/COL-VI. Se eligieron los complejos macromoleculares que obtuvieron menor energía en la función de puntuación (*Model score*).

3.10.4. Visualizadores moleculares

Los enlaces de hidrógeno entre las diferentes proteínas se generaron usando *LIGPLOT* versión 1.4.5 (Laskowski & Swindells, 2011), y la visualización interactiva de las interacciones entre las proteínas de interés se realizó usando *UCSF Chimera* 1.15 (Huang, Meng, Morris, Pettersen, & Ferrin, 2014).

3.11. Análisis Fosfoproteómico cuantitativo de adipocitos 3T3-L1 en cultivos 3D

3.11.1. Procesamiento inicial de la muestra

Para llevar a cabo en análisis fosfoproteómico en cultivos 3D de adipocitos 3T3-L1, se llevó a cabo en primer lugar un proceso de eliminación de la matriz de COL-I que contenían o no LUM y/o COL-VI en la que están embebidas las células. Para ello, tras un lavado con PBS, se añadieron Colagenasa tipo I (0,1 mg/mL) (de Clostridium histolyticum, Sigma-Aldrich, Madrid, España) por pocillo, se incubó 30 min a 37°C y posteriormente se centrifugó a 13.500 x g, 10 min. El pellet formado (fracción celular) se solubilizó en tampón de solubilización (0,1 M Tris, 4,44 % SDS) durante 30 min, a 37°C. A continuación, las células se centrifugaron (10 min, 13500 x g) y el pellet seco (fracción celular) se lisó con tampón de lisis celular (0,05 M Tris, 2,22 % SDS) y se sonicó (10 x 1s, 40% de amplitud, Sonic Vibracell™) en hielo. El lisado celular se incubó durante 5 min en un termomezclador (95°C, 300 x g) y se sonicaron (5 x 1s, 40 % de amplitud). Finalmente, el lisado celular se centrifugó (20 min a 20.000 g, 13°C) para eliminar el material insoluble. El contenido de proteínas se cuantificó utilizando el ensayo de proteínas Micro BCA (Pierce™ Micro BCA™ Thermo Fisher).

El estudio fosfoproteómico fue realizado en el Servicio de Proteómica de la Universidad de Autónoma de Barcelona (CSIC/UAB Proteomics Laboratory),

3.11.2. Digestión, ionización, y espectrometría de masa

El extracto proteico fue digerido utilizando el kit de digestión de proteínas FASP (Abcam, Cambridge, Reino Unido). Los péptidos se marcaron mediante etiquetado masivo en tándem (Tandem Mass Tag™,TMT), se fraccionaron mediante cromatografía de intercambio catiónico fuerte (SCX) y se enriquecieron en fosfopéptidos con columnas de dióxido de titanio (TiO₂). A continuación, las fracciones enriquecidas en fosfopéptidos se analizaron mediante nanoLC-MS utilizando el sistema LTQ-Orbitrap XL equipado con una fuente de iones microESI (Thermo Fisher). Se cargó 20 µL de cada muestra en el sistema cromatográfico (Agilent Technologies) con una fase estacionaria C18 (tubo de 15

cm de largo y una columna con 100 μm de d.i.) (Nikkyo Technos Co., Tokio, Japón). La separación se realizó a 0,4 $\mu\text{l}/\text{min}$ en un gradiente de acetonitrilo de 3 a 35 % durante 150 min (disolvente A: ácido fórmico al 0,1 %, disolvente B: acetonitrilo y ácido fórmico al 0,1 %). El sistema de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) estaba compuesto por una Nano-bomba capilar Agilent serie 1200, una bomba binaria, un micro inyector termostaticado y una válvula de micro interruptor. El LTQ XL Orbitrap se hizo funcionar en el modo de iones positivos con un voltaje de pulverización de 1,8 kV. El análisis espectrométrico se realizó en un modo dependiente de datos, adquiriendo un escaneo completo de Orbitrap seguido de un escaneo de 10 MS/MS de las 5 señales más intensas detectadas en el escaneo de MS (5 en modo CID y 5 en modo HCD). El MS completo (rango 400-1800) fue adquirido en el Orbitrap con una resolución de 60.000.

3.11.3. Identificación de la secuencia fosfopeptídica

La identificación de las proteínas fosforiladas se realizó utilizando la base de datos *Proteome Discoverer v1.4* y la base de datos *SwissProt Mus musculus*. La cuantificación de las proteínas se realizó en base a la intensidad de los iones indicadores derivados del marcaje con TMT, y solo se consideraron péptidos únicos. La probabilidad de localización para cada sitio de fosforilación se calculó utilizando la herramienta *ptmRS mode* acoplada a *Proteome Discoverer*. La intensidad de TMT del ion "reporter" se normalizó usando la abundancia total de cada etiqueta TMT para minimizar el error debido a la diferente carga de proteína en cada canal. El análisis estadístico para determinar las proteínas y los péptidos con distinto grado de fosforilación se realizó utilizando el software *DanteR* (<http://omics.pnl.gov/software/danter>). Las diferencias entre los grupos experimentales se analizaron empleando un análisis de varianza de una vía (*one way ANOVA*) y se consideraron estadísticamente significativas a partir de un nivel de confianza superior al 95% ($P < 0,05$).

3.12. Análisis bioinformático

Se realizó un análisis de anotación funcional utilizando la Base de Datos para Anotación, Visualización y Descubrimiento Integrado (DAVID, versión 6.8) identificando los procesos biológicos, componentes celulares y funciones moleculares en *Gene Ontology*. El análisis de anotación funcional se realizó por separado para las proteínas fosforiladas y desfosforiladas obtenidas del estudio fosfoproteómico.

Este análisis de anotaciones se complementó con un estudio de integración molecular, mediante la herramienta Cytoscape (versión 3.8.2) (<https://www.cytoscape.org>) que permitió analizar redes de interacción molecular y vías biológicas integrando estas anotaciones con los perfiles de expresión proteica.

Se utilizó el software *Ingenuity Pathway Analysis* (IPA) (v2020; Ingenuity Systems, QIAGEN) para identificar las vías canónicas de señalización diferencialmente reguladas en las distintas condiciones de estudio (LUM, COLVI, LUM+COLVI) a partir de los datos obtenidos en el análisis fosfoproteómico (Valores de fosforilación con *fold change* ≥ 1.5 o ≤ 0.5). En primer lugar, utilizamos las funciones “*Core Analysis*” y “*expression of phosphoproteomic analysis*” para la identificación de las rutas canónicas, y se calculó un valor de Z que se consideró significativo cuando tiene un valor mayor a 2 (Z-score > 2) para la activación y menor a 2 (Z-score < 2) para la inhibición de las vías de señalización.

Las 10 rutas que fueron identificadas con un valor estadístico significativamente mayor en los distintos hidrogeles (LUM, COLVI, LUM+COLVI) se ordenaron por $-\log_2$ (p valor) y el “*Fold enrichment*” (número de proteínas diferencialmente fosforiladas que se identificaron en el estudio fosfoproteómico / número total de proteínas que componen la ruta de señalización), en comparación con la condición control (COL-I).

Se utilizó la base de datos *Kinase Enrichment Analysis 2* (KEA2) (<http://www.maayanlab.net/KEA2>) para predecir la actividad de las quinasas y su potencial capacidad para fosforilar las proteínas que aparecían significativamente fosforiladas en el estudio fosfoproteómico. El p valor fue corregido por el método Benjamini-Hochberg; considerando diferencias significativas p valor corregido $> 0,05$.

3.13. Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos obtenidos se realizó haciendo uso del software estadístico *GraphPad Prism7* (La Jolla, CA, USA). En los estudios en los que se compararon únicamente dos grupos experimentales, se utilizó una prueba *t-Student* para datos paramétricos o la prueba de *Mann-Whitney* para datos no paramétricos. En estudios con más de dos grupos experimentales, se utilizó el análisis de varianza de una vía (*one way ANOVA*) seguido de la prueba de comparación de rangos múltiples de *Tukey* para datos paramétricos y *Kruskal- Wallis* seguido de la prueba de comparación de rangos múltiples de *Dunn's* para datos no paramétricos. Las diferencias entre los grupos experimentales se consideraron estadísticamente significativas a partir de un nivel de confianza superior al 95% ($P < 0,05$). Los valores que se muestran en los histogramas y en los diagramas de caja representan el % de la frecuencia muestral en intervalos y la distribución por cuartiles, respectivamente. En el resto de las gráficas, los valores representan la media \pm SEM (error estándar de la media).

Resultados

Capítulo 1. Caracterización de las señales extracelulares e intracelulares específicas de los depósitos subcutáneo y omental del tejido adiposo que contribuyen a la insulinoresistencia en individuos con obesidad.

4.1. Fibrosis y expansión del tejido adiposo en obesidad y resistencia a insulina

En este estudio analizamos la presencia de fibrosis en el tejido adiposo subcutáneo (SC) y omental (OM) de sujetos con obesidad mórbida atendiendo a su grado de sensibilidad a insulina: normogluceemia (Ob-NG) e insulino-resistencia (Ob-IR).

En la tabla 5 se muestran los parámetros bioquímicos y antropométricos de los pacientes incluidos en el estudio. En ella se puede observar cómo los sujetos mostraron diferencias estadísticamente significativas en los niveles de glucosa, insulina y el índice HOMA-IR (*Homeostasis Model Assessment*), confirmando la correcta clasificación de estos sujetos en Ob-NG y Ob-IR. No se observaron diferencias en cuanto a su edad ni a los parámetros del metabolismo lipídico medidos (colesterol, LDL (Lipoproteínas de baja densidad) o HDL (lipoproteínas de alta densidad)). Tampoco se observaron diferencias en parámetros antropométricos como el peso o el perímetro de circunferencia, indicando que no hay diferencias en cuanto a la distribución de la grasa corporal entre los sujetos.

RESULTADOS

	Ob-NG (n=12)	Ob-IR (n=16)	T test
Género <i>(hombres/mujeres)</i>	8/4	8/8	
Edad (años)	36 ± 1.9	39 ± 2.8	ns
Peso (kg)	155.9 ± 11.6	152.0 ± 6.1	ns
IMC (Kg/m²)	53.9 ± 3.1	52.8 ± 2.1	ns
Perímetro <i>circunferencia (cm)</i>	146.2 ± 8.8	152.9 ± 6.1	ns
Presión sistólica <i>(mm/Hg)</i>	124.7 ± 3.2	128.9 ± 4.2	ns
Presión diastólica <i>(mm/Hg)</i>	76.4 ± 4.7	77.3 ± 4.0	ns
Colesterol (mg/dl)	187.3 ± 14.4	194.8 ± 10.6	ns
LDL (mg/dl)	123.8 ± 12.1	120.0 ± 9.7	ns
HDL (mg/dl)	36.8 ± 2.1	36.7 ± 1.1	ns
Triglicéridos (mg/dl)	107.7 ± 13.0	171.9 ± 13.7	<0.05
Glucosa (mg/dl)	87.1 ± 3.0	106.9 ± 2.7	<0.001
Insulina (mU/L)	16.7 ± 1.5	27.8 ± 2.8	<0.001
HbA1c (%) <i>[mmol/mol]</i>	5.7(38.4) ± 0.1(0.7)	6.4(46.0) ± 0.1(0.1)	<0.01
HOMA-IR	3.6 ± 0.4	7.3 ± 0.8	<0.001

Tabla 5. Parámetros antropométricos y bioquímicos de los sujetos incluidos en el estudio.

Para el estudio de la fibrosis, se utilizaron cortes histológicos de muestras pareadas de ambos depósitos y se usó la tinción de rojo picosirio, un método específico para teñir colágeno fibrilar (Henegar et al., 2008). La cuantificación de la tinción de colágeno mostró que la resistencia a insulina (IR) induce un mayor grado de fibrosis en el tejido adiposo SC y OM de individuos con obesidad que las condiciones de normoglucemia (NG) (Fig. 10). Concretamente, observamos un aumento del 37% y 41% de fibrosis total en los depósitos SC y OM de individuos Ob-IR, respectivamente, en comparación con sujetos Ob-NG (Fig. 10A y C). Además, se profundizó en la localización y la distribución del colágeno fibrilar, demostrando que, en condiciones de IR, se produce un aumento significativo de la fibrosis pericelular (colágeno que rodea a los adipocitos) en el tejido adiposo OM de estos sujetos (Fig. 10B). Sin embargo, no se observaron

cambios significativos en la cuantificación de la fibrosis pericelular del depósito SC en Ob-IR vs. Ob-NG, a pesar de presentar los primeros un mayor grado de fibrosis total (Fig. 10D).

A continuación, se llevó a cabo un análisis del tamaño celular de los adipocitos, tanto medio como por su frecuencia de distribución entre el tamaño máximo y mínimo (40-149 μm), en los distintos depósitos de grasa SC y OM y en sujetos Ob-NG y Ob-IR. Como se muestra en la figura 10, los adipocitos del tejido adiposo SC presentan un tamaño mayor y una predominancia de células en rangos de diámetro superiores (Fig. 1G y H) en sujetos Ob-IR que en Ob-NG. Sin embargo, no se observaron diferencias en estos parámetros para los adipocitos del depósito OM entre las condiciones de estudio (Fig. 10E y F).

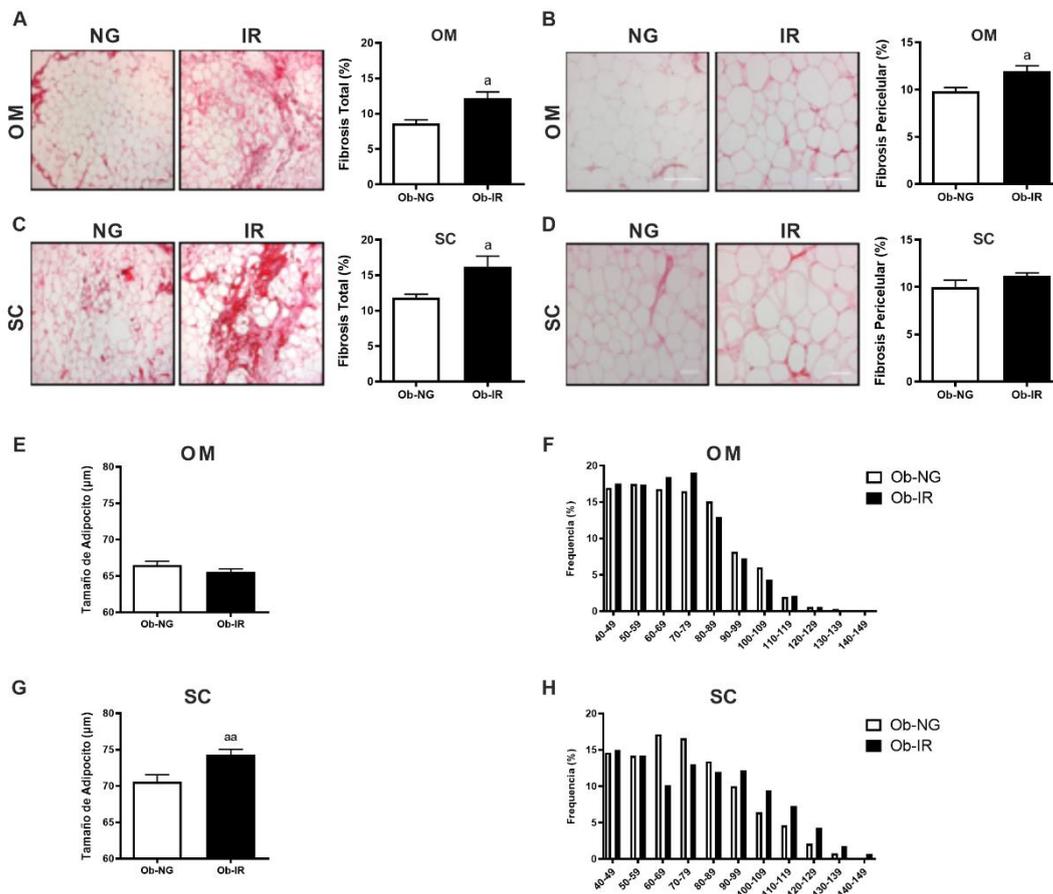


Figura 10. Caracterización de la fibrosis tejido adiposo en obesidad y resistencia a insulina. (A-D) Distribución y cuantificación de colágenos fibrilares en cortes histológicos de tejido adiposo omental (OM) y subcutáneo (SC) de individuos con obesidad y normoglucemia (NG) y con resistencia a insulina (IR). (A) Fibrosis total y (B) fibrosis pericelular. Los paneles de la derecha muestran imágenes representativas de los

cortes histológicos de tejido adiposo teñidos con rojo picrosirio. Las gráficas de la izquierda muestran la cuantificación de la fibrosis total (100x) y pericelular (200x) en los cortes histológicos como el % del área total teñida con rojo picrosirio. n=4-6 individuos/grupo (5 campos microscópicos/individuo/grupo). Tamaño medio de los adipocitos y la distribución de frecuencias del tamaño de los adipocitos en el tejido adiposo (**E y F**) OM y (**G y H**) SC, respectivamente, de sujetos con obesidad NG e IR. n=4-6 individuos/grupo (200 células/grupo). Los datos representan la media \pm SEM y el % de cada intervalo de frecuencias. Las diferencias estadísticas se evaluaron mediante el análisis t de Student para los datos paramétricos y mediante la prueba U de Mann-Whitney para los datos no paramétricos. ^ap<0,05 vs. Ob-NG; ^{aa}p<0,01 vs. Ob-NG. Ob-NG, individuos con obesidad y normoglucemia; Ob-IR individuos con obesidad y resistencia a insulina.

Con el fin de caracterizar a nivel molecular la fibrosis observada en el tejido adiposo en obesidad y resistencia a insulina, se analizó la expresión génica de colágeno I alfa 1 (COL-I α 1), colágeno III alfa 1 (COL-III α 1), y colágeno VI alfa 3 (COL-VI α 3), cuya expresión génica ya se ha demostrado estar aumentada en el tejido adiposo de humanos y ratones con obesidad respecto a sus controles delgados (Divoux et al., 2010; Kovacova et al., 2012). Estos análisis mostraron un aumento de la expresión de COL-III α 1 en el depósito OM de sujetos Ob-IR con respecto a Ob-NG (Fig. 11B). Por su parte, en el depósito SC de sujetos Ob-IR, se observó un nivel significativamente menor de expresión de COL-VI α 3 que en sujetos Ob-NG (Fig. 11F).

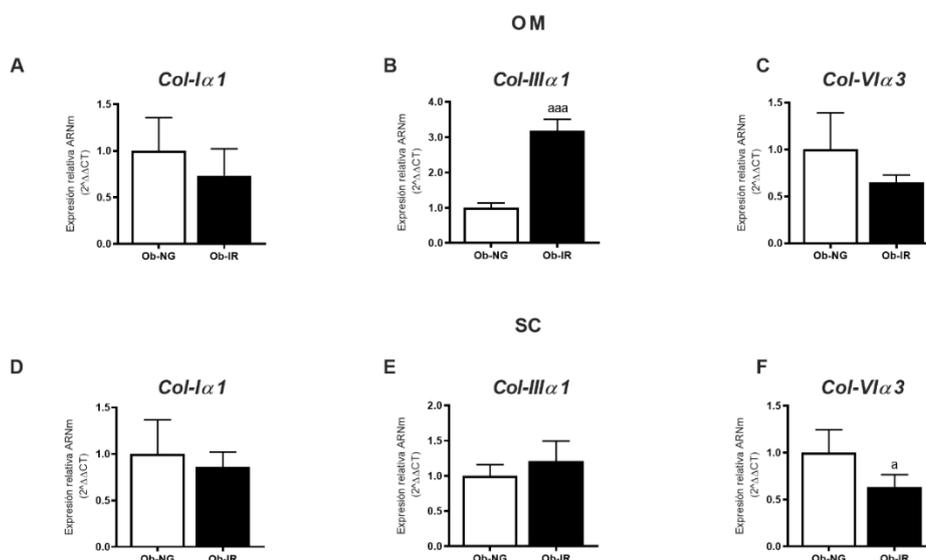


Figura 11. Caracterización molecular de la fibrosis del tejido adiposo en obesidad y resistencia a insulina. Expresión génica de: (A) colágeno I alfa 1 (Col-I α 1), (B) colágeno III alfa 1 (ColIII- α 1) y (C) colágeno VI alfa

3 (Col-VI α 3) en muestras de tejido adiposo OM y de **(D)** colágeno I alfa 1 (Col-I α 1), **(E)** colágeno III alfa 1 (ColIII-I α 1) y **(F)** colágeno VI alfa 3 (Col-VI α 3) en muestras de tejido adiposo SC de individuos con obesidad NG (Ob-NG) e IR (Ob-IR). Los datos representan la media \pm SEM. n=4-8 individuos/grupo. Las diferencias estadísticas se evaluaron mediante el análisis t de Student para los datos paramétricos y mediante la prueba U de Mann-Whitney para los datos no paramétricos. ^ap<0,05 vs.Ob-NG; ^{aaa}p<0,001 vs. Ob-NG.

Además de colágenos, la fibrosis se ha relacionado con la acumulación de otras proteínas de la matriz extracelular (ECM) como fibronectina, laminina y proteoglicanos (PGs) (Kai et al., 2016). En un estudio realizado previamente en nuestro laboratorio, se llevó a cabo un análisis de proteómica cuantitativa (2D-DIGE) de muestras de tejido adiposo SC y OM de individuos delgados y con obesidad con diferentes grados de sensibilidad a la insulina (Ob-NG y Ob-IR). Entre las proteínas identificadas, se detectó lumican (LUM), un pequeño proteoglicano rico en leucina (SLRP) que se ha propuesto que regula la fibrillogénesis (Neame et al., 2000; Nikitovic, Katonis, Tsatsakis, Karamanos, & Tzanakakis, 2008), y cuya expresión se encontró desregulada tras el análisis de muestras pareadas de tejido adiposo SC y OM de individuos con obesidad y distintos grados de sensibilidad a insulina vs. delgados (Guzman-Ruiz et al., 2020). Por ello, nos planteamos profundizar en el estudio de LUM en el tejido adiposo de individuos con obesidad y su implicación en el desarrollo de enfermedad metabólica.

En primer lugar, se analizaron los niveles de LUM mediante inmunohistoquímica usando cortes histológicos de tejido adiposo de individuos Ob-NG y Ob-IR. Este estudio mostró únicamente un aumento de los niveles tisulares de LUM en el depósito SC de Ob-IR vs. Ob-NG (Fig. 12A). Estos datos diferían de lo observado en el estudio proteómico, en el que no se identificó dicha proteína como alterada en este depósito SC, presumiblemente debido a diferencias entre las técnicas utilizadas (ver Discusión) (Guzman-Ruiz et al., 2020). A continuación, se cuantificó la señal de LUM que se localizaba alrededor de los adipocitos (LUM pericelular) (Fig. 12B) y se observó un incremento significativo de la cantidad de este proteoglicano (PG) en este depósito SC en sujetos Ob-IR vs Ob-NG, aunque en estas mismas muestras no se observara un aumento de fibrosis pericelular (Fig. 10D). Por el contrario, en el depósito OM, los niveles tisulares de LUM fueron cuantitativamente menores en sujetos Ob-IR vs Ob-NG, en línea

con los datos obtenidos en el análisis proteómico (Guzman-Ruiz et al., 2020). No se observaron diferencias en el contenido pericelular de LUM en estos individuos respecto a la condición Ob-NG, que sí mostraban niveles mayores de fibrosis pericelular (Fig. 10B).

A continuación, y sobre la base de los resultados obtenidos, se profundizó en el estudio de LUM analizando la cantidad de este PG mediante la técnica de *western blot* en muestras de tejido adiposo SC de individuos Ob-NG y Ob-IR. Así, se detectaron dos bandas inmunorreactivas para el anticuerpo utilizado, correspondientes, según su peso molecular, al *core* proteico (37 kDa-LUM) y a la proteína glicosilada (50 kDa-LUM) (Fig. 12C-E). En ambos casos, se observó un aumento del contenido de LUM en individuos Ob-IR respecto a Ob-NG, aunque dicho aumento solo llegó a ser significativo para la isoforma 37 kDa-LUM (Fig. 12E). Finalmente, se analizó el contenido de LUM en los distintos componentes celulares del tejido adiposo: la fracción de estroma vascular (SVF), que incluye a los preadipocitos, entre otros tipos celulares, y los adipocitos maduros. Nuestros estudios muestran que las dos fracciones, SVF y adipocitos maduros, son capaces de producir LUM, aunque parece observarse una mayor producción de LUM por parte de los adipocitos maduros (Fig. 12F), lo que estaría en consonancia con el análisis de la localización de este PG en el tejido adiposo SC (Fig. 12B). Adicionalmente, este estudio reveló la presencia de una banda inmunorreactiva de 150 kDa, correspondiente a una forma más glicosilada de LUM, tanto en la SVF como en los adipocitos maduros (Fig. 12F).

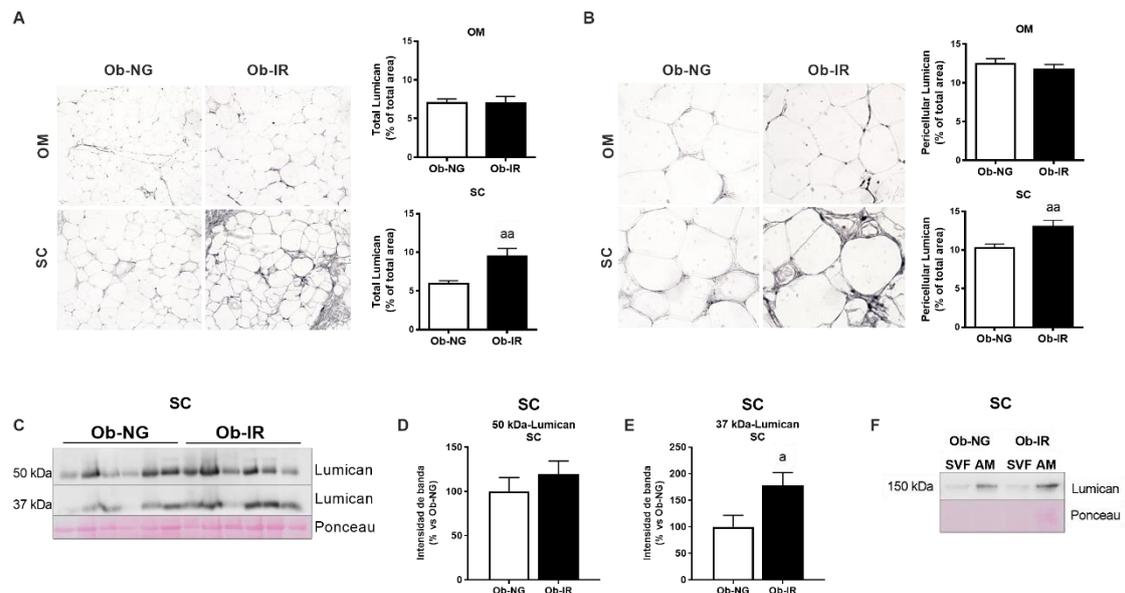


Figura 12. Caracterización de lumican en el tejido adiposo en obesidad y resistencia a insulina. (A) Contenido de lumican (LUM) total y **(B)** pericelular en el tejido adiposo OM y SC de individuos Ob-NG y Ob-IR. Los paneles de la izquierda muestran imágenes representativas de cortes histológicos de tejido adiposo inmunoteñidos con LUM (100x en A y 200x en B). Las gráficas de la derecha muestran la cuantificación de LUM total y pericelular en los cortes histológicos como el % del área total con inmunoseñal de LUM. n=15-20 individuos/grupo (5 campos microscópicos/individuo/grupo). **(C)** Inmunoblots representativos de LUM y cuantificación de **(D)** 50 kDa-LUM y **(E)** 37 kDa-LUM en muestras de tejido adiposo SC de individuos Ob-NG y Ob-IR y. n=6 individuos/grupo. Los datos representan la media \pm SEM. Las diferencias estadísticas se evaluaron mediante el análisis t de Student para los datos paramétricos y mediante la prueba U de Mann-Whitney para los datos no paramétricos. ^ap<0,05 vs. Ob-NG; ^{aa}p<0,01 vs. Ob-NG. **(F)** Inmunoblots representativo de LUM en la fracción de estroma vascular (SVF) y de adipocitos maduros (AM) del tejido adiposo SC de individuos Ob-NG y Ob-IR.

Atendiendo a las diferencias observadas en los estudios anteriores tanto en el contenido y tipos de colágeno como en el contenido de LUM, presentes en el tejido adiposo en obesidad y resistencia a insulina, se estudió la capacidad de los extractos proteicos obtenidos de tejido adiposo SC y OM de Ob-NG y Ob-IR para inducir la formación de fibrillas de colágeno (fibrillogénesis) *in vitro*. Para ello, se utilizó colágeno I (COL-I) comercial (1 mg/mL, 37 °C), que fue incubado con 1 mg/mL de extracto proteico de los diferentes grupos de estudio. El ensayo de fibrillogénesis (Fig. 13A y B) fue monitorizado durante 1 h, y la formación de fibrillas se determinó evaluando la turbidez de la solución por espectrofotometría (340 nm). Los resultados mostraron que tanto la

RESULTADOS

pendiente ($0,006 \pm 0,003$ vs $0,028 \pm 0,01$, $p < 0,05$) como el valor máximo de turbidez ($0,097 \pm 0,003$ vs $0,223 \pm 0,05$, $p < 0,05$) fueron superiores cuando COL-I se incubó con los extractos proteicos de tejido adiposo SC de individuos Ob-IR en comparación con Ob-NG, mientras que no se observaron diferencias para el tejido adiposo OM entre los dos grupos de pacientes.

Los componentes de la ECM no solo tienen función sobre la organización y arquitectura de la ECM, sino que también pueden actuar como moléculas señalizadoras ya que, tanto los colágenos como LUM, interactúan directamente con integrinas (fundamentalmente $\beta 1$ -integrina) (Brezillon et al., 2013; Iskratsch et al., 2014). Entre otras, destaca la ruta de Akt, que es también una de las rutas de traducción esenciales de la insulina (Cignarelli et al., 2019; Petersen & Shulman, 2018). Por ello, a continuación, se evaluó en el mismo grupo de individuos y mediante *western blot*, el contenido de β -integrina (forma $\beta 1$) y la activación de Akt (medida como ratio de pAkt/Akt). Así, en relación con la β -integrina, observamos que la expresión de este receptor era superior en el depósito OM de individuos Ob-IR vs. Ob-NG, mientras que se observó la tendencia opuesta en el tejido adiposo SC (Fig. 13C). Del mismo modo, los individuos Ob-IR mostraron una menor fosforilación de Akt (menor ratio pAkt/Akt) que los individuos Ob-NG en el depósito SC, mientras que no se observaron diferencias significativas en el depósito OM (Fig. 13D).

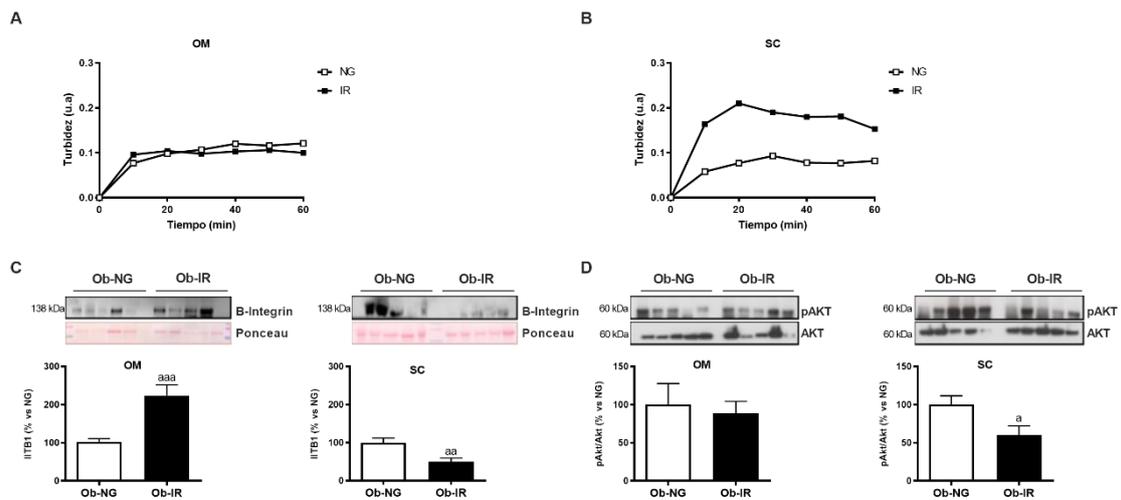


Figura 13. Efecto extra- e intracelular de la fibrosis del tejido adiposo en obesidad y resistencia a insulina. Cuantificación de la capacidad de fibrilógenesis del tejido adiposo OM y SC de individuos Ob-NG y Ob-IR. Se incubaron extractos proteicos de tejido adiposo (A) OM y (B) SC de pacientes obesos NG e IR

con colágeno I (COL-I) (1 mg/mL) y se midió la formación de fibrillas. Los datos representan la medida de turbidez a 340 nm. **(C)** Inmunoblot representativo (panel superior) y cuantificación (gráfica inferior) del contenido total de β -integrina en muestras de tejido adiposo de individuos Ob-NG y Ob-IR. **(D)** Inmunoblot representativo (panel superior) y cuantificación (gráfica inferior) del ratio p-Akt/Akt en muestras de tejido adiposo de individuos Ob-NG y Ob-IR. Los datos representan la media \pm SEM ($n=5$ individuos/grupo). Las diferencias estadísticas se evaluaron mediante el análisis *t* de Student para los datos paramétricos y mediante la prueba *U* de Mann-Whitney para los datos no paramétricos. ^a $p<0,05$ vs. Ob-NG; ^{aa} $p<0,01$ vs. Ob-NG; ^{aaa} $p<0,001$ vs. Ob-NG.

4.2. Caracterización funcional de lumican en adipocitos 3T3-L1

Partiendo de los resultados anteriores que muestran como las condiciones patológicas del tejido adiposo en obesidad alteran la producción de LUM, y que esto puede afectar a la funcionalidad de la matriz extracelular, en el presente trabajo realizamos una caracterización funcional de LUM en los adipocitos usando como modelo la línea celular 3T3-L1.

En primer lugar, se analizó la regulación de LUM, tanto su producción como su secreción durante el proceso de diferenciación de los adipocitos 3T3-L1. Nuestros estudios de *western blot* revelaron que el contenido intracelular de LUM (medido por cuantificación de la proteína *core*, 37 kDa-LUM) aumentó durante la inducción de la diferenciación a preadipocitos y, posteriormente, a adipocitos maduros, mientras que el contenido de la proteína con glicosilaciones, 50 kDa-LUM, disminuyó a lo largo de la diferenciación (Fig. 14A y B). Los resultados obtenidos sobre la proteína *core* se validaron cuando se evaluó el contenido de LUM mediante un ELISA comercial (Fig. 14C). Los estudios de ELISA se completaron mediante la cuantificación de LUM en el medio de cultivo (i.e., secreción), que mostraron mayores niveles tanto de LUM extracelular como del ratio LUM extracelular/intracelular en adipocitos a día 9 de diferenciación que en células sin diferenciar (día 0).

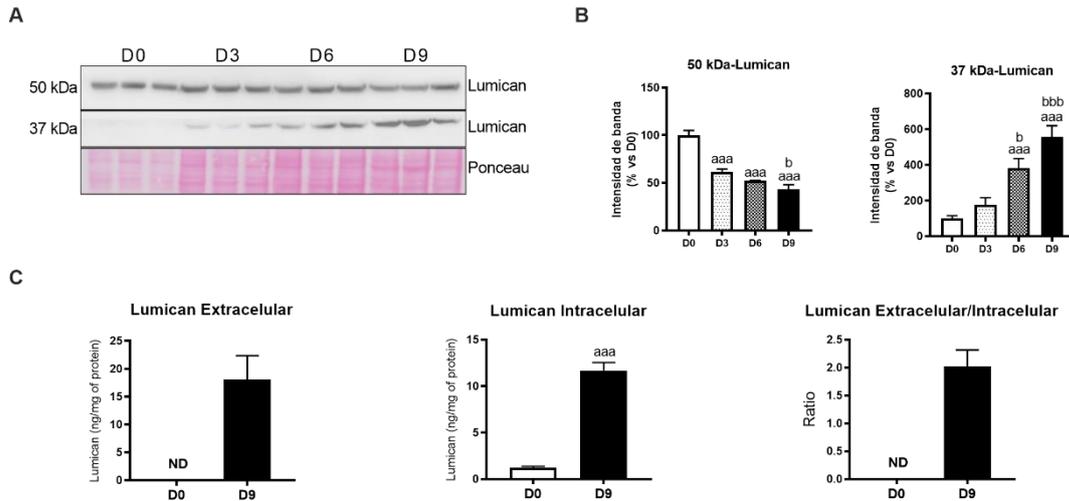


Figura 14. Regulación de la producción de LUM durante el proceso de diferenciación de células 3T3-L1 en cultivos 2D. (A) Inmunoblot representativo y **(B)** medida del contenido de 50 kDa-LUM y 37 kDa-LUM durante el proceso de diferenciación: Día 0 (D0), 3 (D3), 6 (D6), y 9 (D9) en cultivos 2D de células 3T3-L1. . n= 3 replicados/día de diferenciación. Se representa la media \pm SEM. ^{aaa}p<0,001 vs. D0, ^bp<0,05 y ^{bbb}p<0,01 vs. D3, n.s. No significativo vs. D6. Las diferencias estadísticas se evaluaron mediante el análisis ANOVA de un factor. **(C)** Medida del contenido extracelular (gráfica izquierda) y del contenido intracelular (gráfica central) de LUM mediante test ELISA en células 3T3-L1 indiferenciadas (D0) y diferenciadas a adipocitos - L1 (D9) y del ratio contenido extracelular/intracelular de LUM (gráfica derecha) como medida de secreción. Los datos representan la media \pm SEM (n=4 replicados/condición). Las diferencias estadísticas se evaluaron mediante el análisis t de Student. ^{aaa}p<0,001 vs. D0.

Con el fin de profundizar en la regulación de LUM en los pacientes en estudio, que se caracterizan principalmente por tener niveles plasmáticos de glucosa e insulina elevados, se desarrolló un modelo *in vitro* de hiperglucemia/hipeinsulinemia y se analizó el efecto de estas condiciones sobre la producción de LUM. Para ello, se evaluó la producción de LUM (secreción y contenido intracelular) en adipocitos diferenciados (día 9) mediante la exposición durante 24 h a concentraciones elevadas de glucosa (4,5 g/L) e insulina (100 nM) (HGHI) (Diaz-Ruiz et al., 2015). Este tratamiento produjo un aumento significativo en el contenido intracelular de 37 kDa-LUM, sin que se observara ningún efecto sobre la forma glicosilada de la proteína (Fig. 15A y B). Por su parte, los estudios de ELISA revelaron un aumento leve pero no significativo en el contenido intracelular de LUM en adipocitos 3T3-L1 en respuesta a HGHI, mientras que estas condiciones

aumentaron significativamente la liberación de LUM al medio extracelular (Fig. 15C). Respecto al ratio secreción/contenido intracelular de LUM, observamos un aumento significativo de la capacidad secretora de dicha proteína por parte de los adipocitos en condiciones de hiperglucemia e hiperinsulinemia (Fig. 15C).

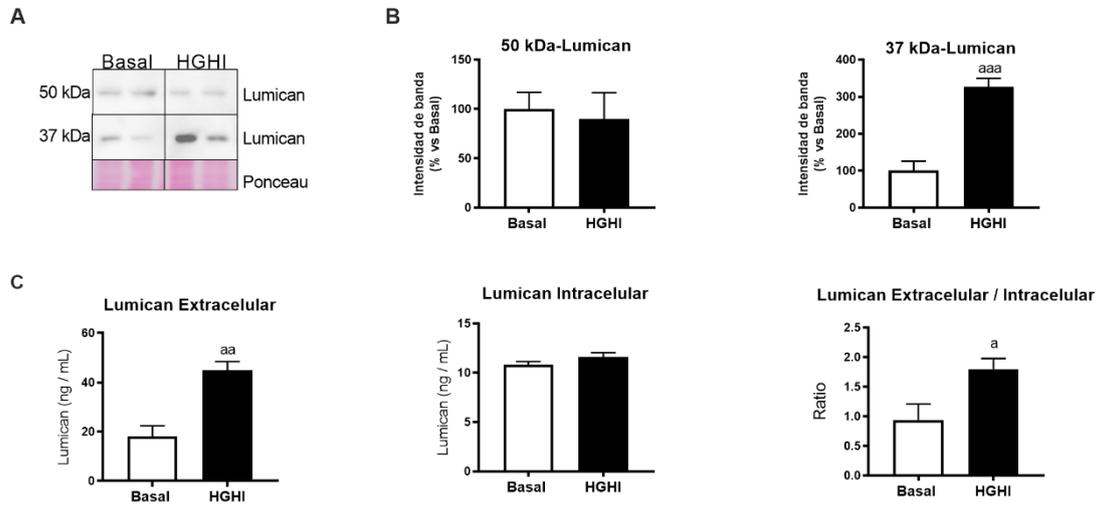


Figura 15. Regulación de la producción de LUM en respuesta a altas concentraciones de glucosa e insulina de adipocitos 3T3-L1 en cultivos 2D. (A) *Immunoblot* representativo y (B) *cuantificación* de la producción de 50 kDa-LUM y 37 kDa-LUM en adipocitos 3T3-L1 (D9) en respuesta al tratamiento con concentraciones elevadas de glucosa (4,5 g/L) e insulina (100 nM) (alta glucosa, alta insulina; HGHI). Los datos representan la media \pm SEM (n=6 replicados/condición). Las diferencias estadísticas se evaluaron mediante el análisis *t* de Student. ^{aaa} $p < 0,001$ vs. basal. (C) *Medida* del contenido extracelular (gráfica izquierda) y del contenido intracelular (gráfica central) de LUM mediante test ELISA en adipocitos 3T3-L1 (D9) y del ratio contenido extracelular/intracelular de LUM (gráfica derecha) como medida de secreción en respuesta al tratamiento con HGHI. Los datos representan la media \pm SEM (n=4 replicados/condición). Las diferencias estadísticas se evaluaron mediante el análisis *t* de Student. ^a $p < 0,05$ vs. basal, ^{aa} $p < 0,01$ vs. basal.

4.3. Respuesta de los adipocitos 3T3-L1 a cambios en lumican extracelular

4.3.1. Diferenciación celular

Para llevar a cabo este objetivo, hemos desarrollado y optimizado un sistema de cultivo tridimensional (3D) basado en hidrogeles de COL-I para el cultivo y la diferenciación de células 3T3-L1. Tras varios ensayos utilizando diferentes concentraciones de COL-I, de densidad celular de los cultivos, y condiciones de

RESULTADOS

gelificación (datos no mostrados), establecimos un protocolo optimizado consistente en el cultivo de las células 3T3-L1 en COL-I a una concentración de 3,6 mg/mL, que permite inducir el proceso de adipogénesis. Así, como se muestra en la figura 16 en estas condiciones, la administración del coctel hormonal de diferenciación indujo la diferenciación de las células 3T3-L1 (D0) en adipocitos maduros (D10) acumuladores de gotas lipídicas (Fig. 16B), de forma similar a lo que se observa en cultivos convencionales 2D (Fig. 16A).

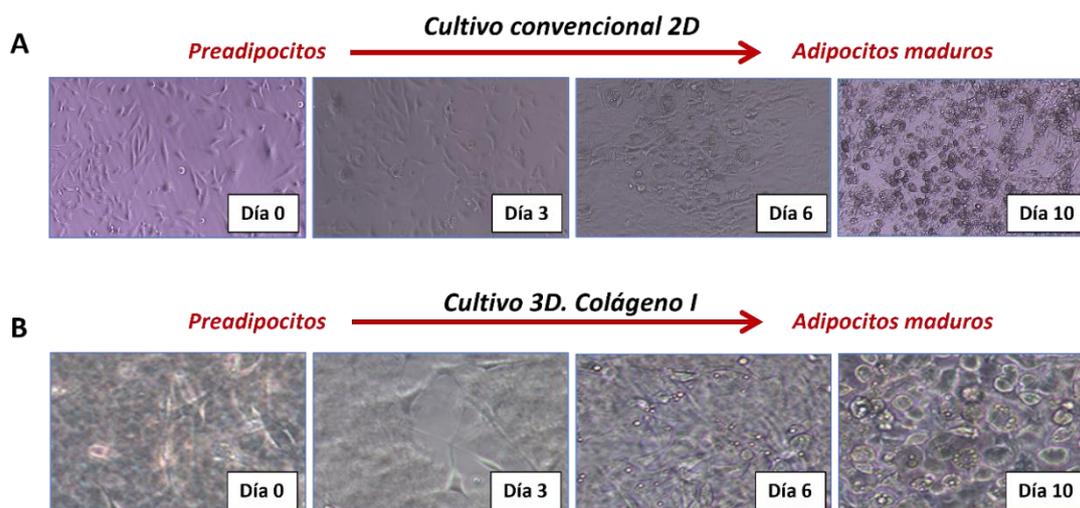


Figura 16. Proceso de diferenciación de adipocitos 3T3-L1. Imágenes de microscopía óptica (400 x) representativas del proceso de diferenciación de células 3T3-L1 (A) en cultivo convencional (2D) y (B) en hidrogeles de colágeno I (3,6 mg/mL) (Cultivos 3D). Las células 3T3-L1 se expusieron a un coctel hormonal para inducir la diferenciación durante 10 días.

A continuación, una vez optimizado el cultivo 3D, se analizó el impacto de LUM en el proceso de diferenciación de las células 3T3-L1 en las matrices de COL-I (3,6 mg/mL). Para ello, se testaron dos dosis de LUM (10 y 30 ng/mL) en función de la respuesta de secreción de este PG por parte de los adipocitos 3T3-L1 en condiciones basales vs. condiciones de HGHI, respectivamente (Fig. 15C), y se monitorizaron los cambios morfológicos de las células mediante microscopía óptica. Como se observa en la figura 17 (panel intermedio), los adipocitos cultivados en presencia de la dosis más baja testada de LUM (10 ng/mL) presentan una menor capacidad de acumular gotas lipídicas, en comparación con los cultivos control (sin LUM). Por el contrario, en presencia de LUM a concentración más elevada (30 ng/mL) (Fig. 17, panel derecho), los

adipocitos no adquirieron la morfología redondeada característica de las células maduras y acumularon menos lípidos que en condiciones control (Fig. 17, panel izquierdo) o a dosis más bajas del PG (Fig. 17, panel intermedio).

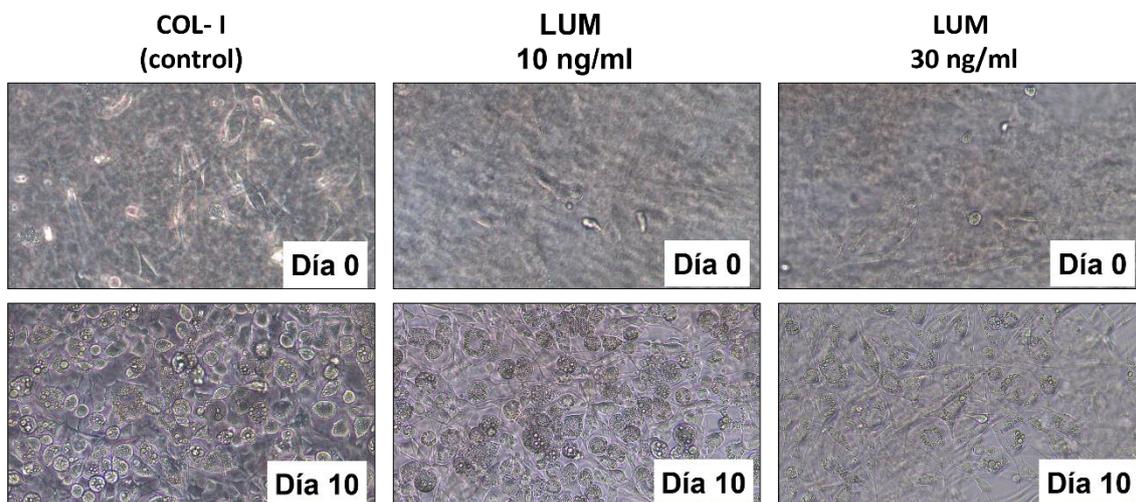


Figura 17. Proceso de diferenciación de adipocitos 3T3-L1 en cultivos 3D. Los fibroblastos 3T3-L1 se embebieron en matrices de colágeno tipo I (3,6 mg/mL), en ausencia (control) o presencia de lumican (10 y 30 ng/mL). Se añadió un coctel hormonal para inducir la diferenciación durante 10 días. Las imágenes se obtuvieron mediante microscopía óptica (400x).

4.3.2. Diferenciación y viabilidad de las células 3T3-L1 en cultivos 3D

Puesto que la presencia de LUM parece afectar a la diferenciación de los adipocitos, se realizaron estudios complementarios orientados a determinar el contenido lipídico de los adipocitos 3T3-L1 diferenciados a término en hidrogeles de COL-I con o sin LUM, mediante microscopía confocal. Concretamente, las células se tiñeron con *Nile Red* para visualizar las gotas lipídicas (*Lipid droplets*; LDs) (Fig. 18A), calculándose tanto el número de LDs, como el área celular ocupada por el conjunto de LDs de las células individuales y el área media de las LDs (Fig. 18B).

Como se muestra en las imágenes representativas de microscopía confocal tanto los adipocitos cultivados en presencia de COL-I solo o con LUM a baja concentración (10 ng/mL) mostraron una morfología redondeada (Fig. 18A), así como un contenido abundante de lípidos, siendo numéricamente mayor, aunque sin diferencias estadísticamente significativas, en la condición control (COL-I), confirmando las

observaciones realizadas mediante microscopía óptica. Por el contrario, se observó que una concentración más elevada de LUM (30 ng/mL) daba lugar a la aparición de adipocitos con LDs de pequeño tamaño en los cultivos 3D (Fig. 18A), lo que está en consonancia con la morfología alargada que muestran estas células, más típica de preadipocitos, a pesar de haber estado expuestas al coctel de diferenciación durante 10 días. Estas observaciones fueron confirmadas mediante el análisis morfométrico de las imágenes de microscopía confocal, que mostraron que los adipocitos en cultivos 3D con LUM 30 mg/mL contienen LDs de menor tamaño, así como un contenido lipídico total menor que las células diferenciadas en las matrices control (COL-I) o en presencia de una dosis baja de LUM (10 ng/mL) (Fig. 18B).

En vista de los resultados obtenidos mediante microscopía, evaluamos la expresión de dos factores adipogénicos principales, PPAR γ (*peroxisome proliferator-activated receptor gamma*) y C/EBP α (*CCAAT/enhancer binding protein, Alfa*) (Rutkowski et al., 2015). Como se observa en la figura 18C, la adición de LUM, a cualquiera de las dosis testadas, a los cultivos 3D provocó una disminución significativa de la expresión de *C/ebp α* y *Ppar γ* en los adipocitos. Estas observaciones, junto con los resultados de microscopía, indican que LUM induce una disminución significativa de la capacidad adipogénica de una manera dosis dependiente.

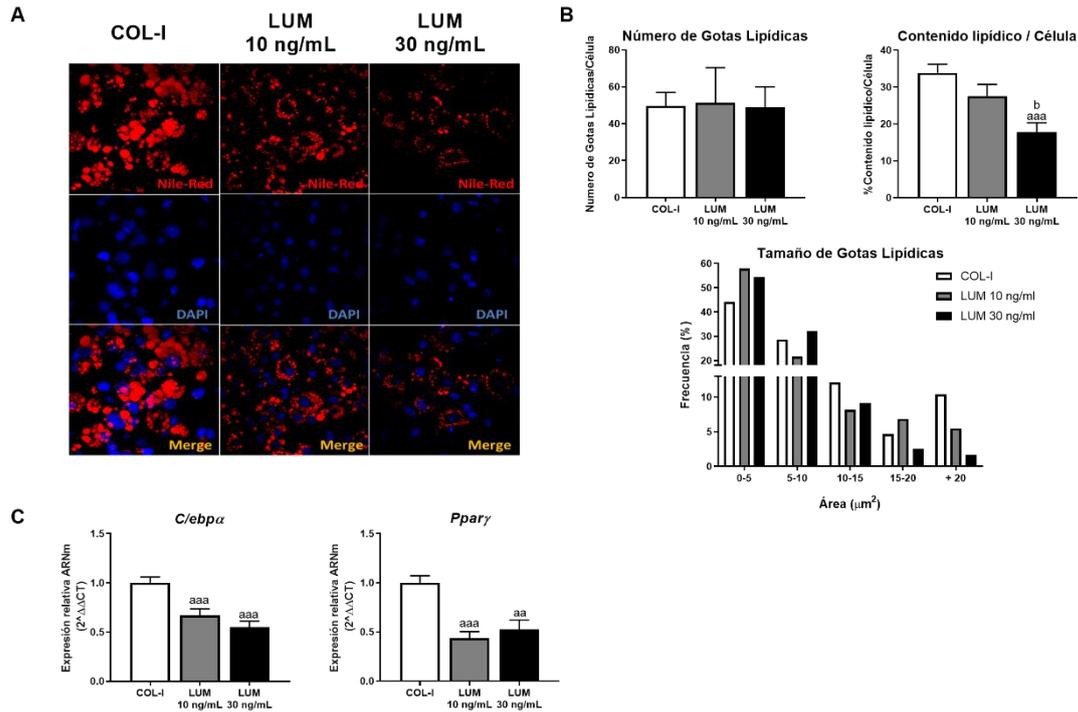


Figura 18. Efecto de lumican en la adipogénesis de los adipocitos 3T3-L1 en cultivo tridimensional (3D).

(A) Imágenes representativas de microscopía confocal de los adipocitos 3T3-L1 diferenciados en matrices de COL-I (3,6 mg/mL), solo (COL-I) o combinado con lumican (LUM) a 10 ng/mL o 30 ng/mL. Los lípidos se tiñeron con Nile Red (Rojo) y los núcleos con DAPI (azul). Se emplearon microfotografías para la cuantificación del **(B)** número de gotas lipídicas (LDs), el contenido total de LDs y el tamaño de LDs. ($n = 15$ células/grupo de tres experimentos independientes). **(C)** Niveles de expresión de ARNm de *C/ebpα* y *Pparγ* determinado por RT-qPCR. Los datos representan la media \pm SEM ($n = 12$ repeticiones/grupo). Las diferencias estadísticas se evaluaron mediante el análisis ANOVA de un factor para los datos paramétricos y mediante el análisis Kruskal-Wallis para los datos no paramétricos. ^{aa} $p < 0,01$; ^{aaa} $p < 0,001$ vs. COL-I, ^b $p < 0,05$ vs. LUM 10 ng/mL.

Adicionalmente, se evaluó en dichos cultivos la viabilidad y la citotoxicidad celular medida mediante los ensayos de *AlamarBlue*, que mide la actividad metabólica celular, y de lactato deshidrogenasa (LDH), que se libera desde el citoplasma de las células dañadas o lisadas. No se observaron cambios significativos ni en la proliferación celular (Fig. 19A), ni en los niveles de LDH secretados al medio de cultivo (Fig. 19B) en ninguna de las condiciones testadas, demostrando que la presencia de LUM no afecta a la viabilidad celular.

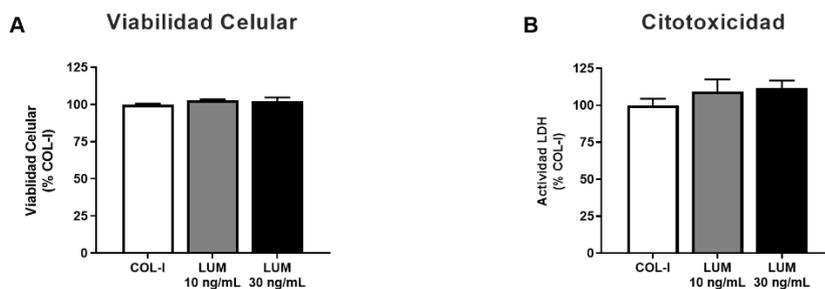


Figura 19. Viabilidad y citotoxicidad en adipocitos 3T3-L1 en cultivo tridimensional (3D celular). (A) Viabilidad celular medida por la actividad metabólica de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH). (B) Citotoxicidad celular evaluada mediante el ensayo de AlamarBlue. Los datos representan la media \pm SEM ($n = 3$ repeticiones/grupo).

4.4. Caracterización ultraestructural de las matrices 3D

Con el fin de analizar el efecto de LUM sobre el ambiente extracelular medido mediante su impacto en la organización de las fibrillas de COL-I, se tomaron micrografías de los cultivos celulares tras su procesamiento para microscopía electrónica de barrido (Fig. 20). Como se muestra en las imágenes, los adipocitos quedan embebidos en la matriz tridimensional de fibrillas de COL-I, en las que es posible visualizar el bandeo característico de dichas fibrillas (Fig. 20A).

Para realizar la evaluación cuantitativa de las imágenes, éstas se procesaron con el programa *DiameterJ* incluido en el paquete *ImageJ*. De cada imagen, se obtuvo una digitalización binaria en blanco (fibrillas) y negro (poro) para su análisis. Tras el procesamiento de las imágenes, se obtuvo una nueva imagen en la que se marcó la línea media de cada fibra para la cuantificación del diámetro medio de las fibrillas (Fig. 20B) y el área existente entre las fibrillas (espacio libre de fibrillas) (Fig. 20C). La figura 20B muestra la distribución de frecuencias del diámetro de las fibrillas de COL-I (nm) en intervalos, donde se observa que la mayoría de las fibrillas presentan un grosor inferior a 100 nm, tanto en los cultivos 3D control como en los expuestos a las diferentes dosis de LUM. Sin embargo, la presencia de LUM 10 ng/mL indujo un aumento del 36% en las fibrillas con radio comprendido entre 200-300 nm, mientras LUM 30 ng/mL incrementó en un 106% y 450% la frecuencia de fibrillas de 200-300 nm y 300-400 nm,

respectivamente, con respecto al intervalo control correspondiente (Fig. 20B). Por su parte, la medida del tamaño de poro (espaciado entre fibrillas), distribuido en cuartiles, mostró que el 75% de los espacios existentes entre las fibrillas de COL-I en las matrices tratadas con LUM 30 ng/mL eran menores de $3 \mu\text{m}^2$, un valor significativamente inferior al encontrado en ausencia o en presencia de bajas concentraciones de este PG (Fig. 20C).

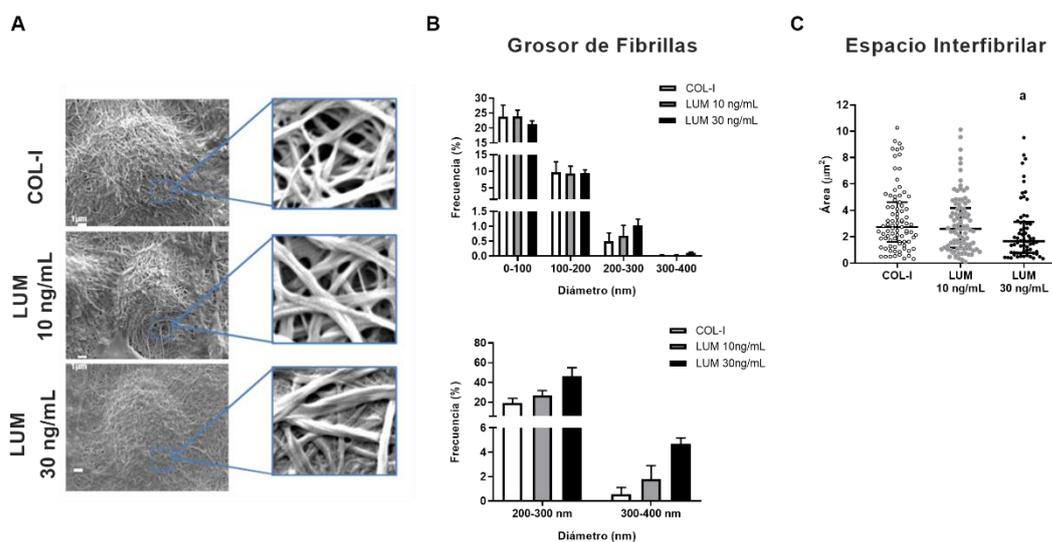


Figura 20. Caracterización ultraestructural de los cultivos 3D. (A) Microscopia electrónica de barrido de adipocitos 3T3-L1 diferenciados en matrices 3D de colágeno I (COL-I) en ausencia o presencia de lumican (10-30 ng/mL) durante 10 días, y sus respectivas ampliaciones de las micrografías, donde se observa la estriación de las fibrillas de COL-I. **(B)** Histogramas de frecuencia (%) del diámetro de las fibrillas de COL-I (nm) distribuidas en intervalos de 0-400 nm (gráfica superior) y 200-400 nm (gráfica inferior). **(C)** Diagrama de caja representando el tamaño del poro (espacio interfibrilar) (μm^2). Las diferencias estadísticas se evaluaron mediante el análisis ANOVA de un factor. $^{\circ}p < 0.05$ vs. COL-I. $n = 20$ micrografías/condición.

Adicionalmente, se realizó un ensayo de fibrilogénesis para estudiar el efecto de LUM (10 y 30 ng/mL) sobre la dinámica de formación de fibrillas de COL-I (3,6 mg/mL). Como se observa en la figura 21, la adición de LUM (ambas dosis) a la solución de COL-I parece aumentar la capacidad del COL-I de formar fibrillas, alcanzándose una mayor turbidez cuando se añadió la dosis más alta de LUM (30 ng/mL) (Fig. 21A). Paralelamente, se midió la resistencia a la compresión de las matrices 3D para definir su resistencia mecánica, observándose que este parámetro era mayor en las matrices de COL-I conteniendo la concentración más alta de LUM (30 ng/mL) (Fig. 21B).

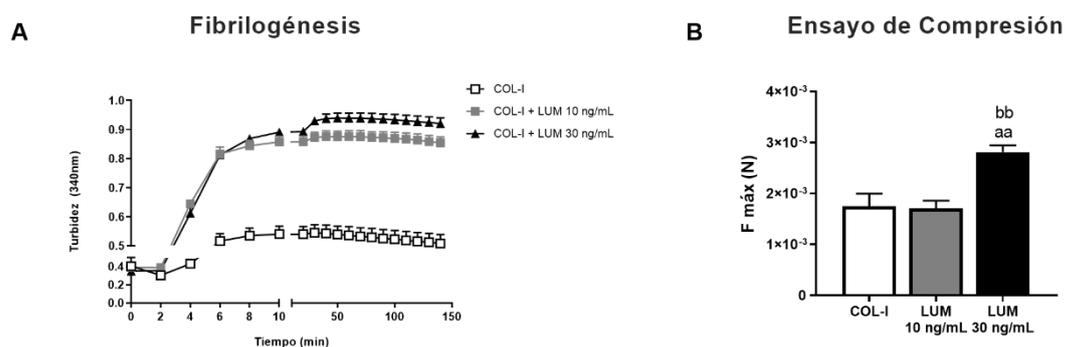


Figura 21. Efecto de lumican sobre la mecánica de la estructura de las matrices de colágeno I. (A) Efecto y dinámica de lumican (LUM) (1 y 30 ng/mL) sobre la formación de fibrillas del colágeno I (COL-I) (3,6 mg/mL). La turbidez de la solución se monitorizó durante 150 min, a 37°C, por absorbancia a 340 nm. **(B)** Efecto de LUM sobre la resistencia a la deformación evaluada mediante un ensayo de compresión en hidrogeles de COL-I solo o en presencia de LUM (10 y 30 ng/mL). Los resultados se expresan como la media \pm SEM; n=4 repeticiones/condición. ^{aa}p<0,01 vs. COL-I, ^{bb}p<0,01 vs. LUM 10 ng/mL.

4.5. Efecto de lumican sobre la función de los adipocitos

Puesto que LUM estaba incrementado en el tejido adiposo de individuos con Ob-IR, y se observó un incremento significativo de su nivel de expresión en el modelo *in vitro* de hiperglucemia/hiperinsulinemia, el siguiente paso fue estudiar si LUM podía tener algún efecto sobre la respuesta a la insulina. En este caso, observamos que LUM, tanto a dosis bajas como a dosis altas, disminuyó la expresión tanto del receptor de insulina como del transportador de glucosa GLUT-4 y el contenido proteico del mediador de la señalización de la insulina, Akt (Fig. 22A).

A continuación, se evaluaron varios marcadores funcionales de los adipocitos, incluyendo tanto la adipoquina con propiedades insulino-sensibilizantes y característica de adipocitos maduros, adiponectina (Makki, Froguel, & Wolowczuk, 2013), como los niveles de expresión de enzimas relacionadas con el estrés oxidativo como la glutatión sintetasa (GSS) y el estrés de retículo como la chaperona de retículo endoplásmico GRP78 (BiP). Estos experimentos mostraron que las dos dosis de LUM testadas indujeron una disminución numérica, aunque no significativa, del contenido de adiponectina en los medios de cultivo mientras que ambas incrementaron el contenido intracelular de

esta adipocina en los adipocitos, especialmente la dosis más baja investigada (Fig. 22B). El ratio extracelular/intracelular de adiponectina fue significativamente inferior en los cultivos 3D conteniendo LUM que en los cultivos control, indicando un efecto inhibitorio de este PG sobre la capacidad de secreción de esta adipocina por los adipocitos.

Por su parte, la presencia de LUM provocó un aumento en el contenido intracelular de BiP en los cultivos tratados con las dos concentraciones de LUM analizadas (Fig. 22C). De manera similar, observamos un aumento del contenido intracelular de la enzima GSS, que no obstante sólo llegó a ser significativo a la concentración de 10 ng/mL de LUM (Fig. 22D).

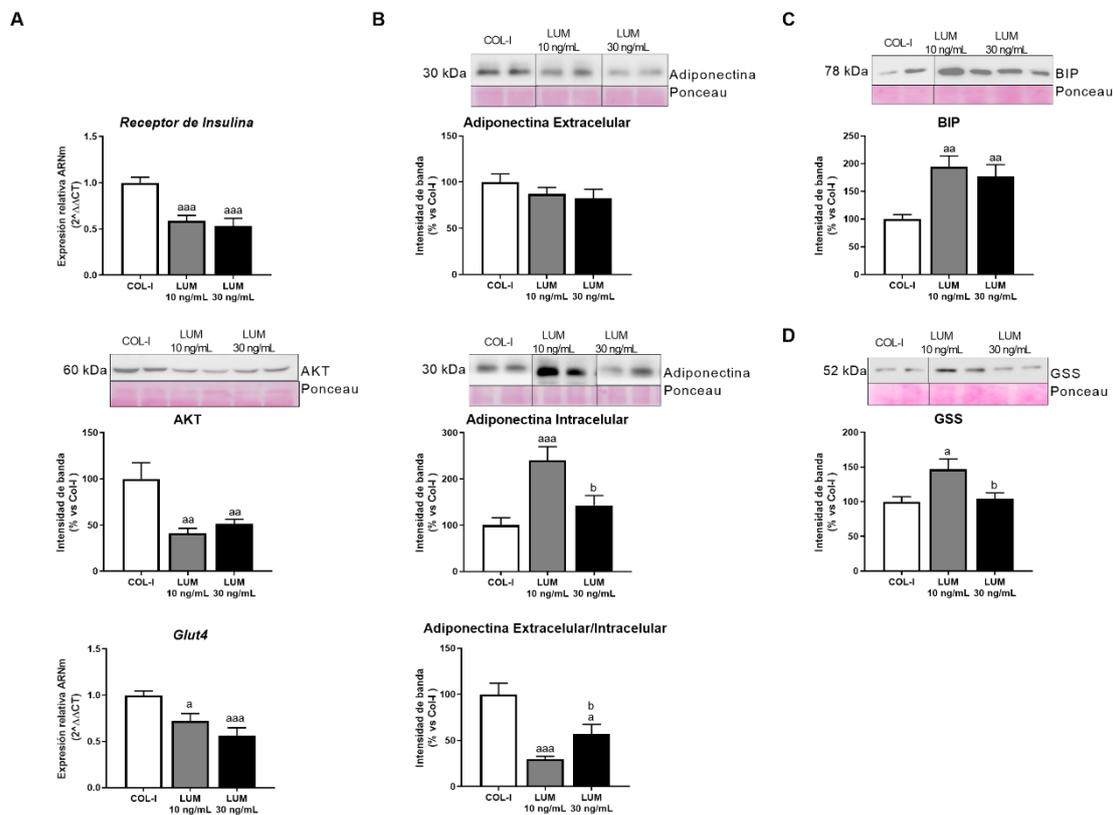


Figura 22. Efecto de lumican sobre la función de los adipocitos 3T3-L1 en cultivos 3D. (A) Niveles de expresión de ARNm del receptor de insulina determinado por RT-qPCR (gráfica superior), cuantificación de la cantidad de Akt total e inmunoblot representativo (gráfica media), y niveles de expresión de ARNm del transportador de glucosa, Glut4, determinado por RT-qPCR (gráfica inferior). **(B)** Cuantificación de adiponectina en el medio extracelular (gráfica superior) y en los extractos celulares (gráfica media) y el ratio secreción/contenido intracelular de adiponectina (gráfica inferior). **(C)** Cuantificación de la chaperona del retículo endoplásmico, BiP **(D)** y de la enzima glutatión sintetasa (GSS). Se muestran los inmunoblots representativos para cada proteína. Los datos representan la media ± SEM (n = 12 repeticiones/grupo).

RESULTADOS

Las diferencias estadísticas se evaluaron mediante el análisis ANOVA de un factor para los datos paramétricos y mediante el análisis Kruskal-Wallis para los datos no paramétricos. ^a $p < 0,05$; ^{aa} $p < 0,01$; ^{aaa} $p < 0,001$ vs. COL-I, ^b $p < 0,05$ vs. LUM 10 ng/mL.

En conjunto, estos resultados muestran que la presencia de LUM en el medio extracelular afecta a la funcionalidad de los adipocitos, disminuyendo su capacidad de diferenciación e incrementando el estrés celular de los mismos.

A partir de los resultados obtenidos en los cultivos 3D de adipocitos 3T3-L1, intentamos replicar los experimentos usando células de la SVF aisladas a partir de muestras frescas de tejido adiposo obtenidas de sujetos con obesidad sometidos a cirugía bariátrica. Desafortunadamente, la viabilidad de estas células se vio gravemente comprometida cuando se cultivaron en matrices 3D enriquecidas con COL-I, incluso a concentraciones bajas (1 mg/mL) (Fig. 23).

Adipocitos maduros (día 10) diferenciados *in vitro* de Tejido Adiposo SC

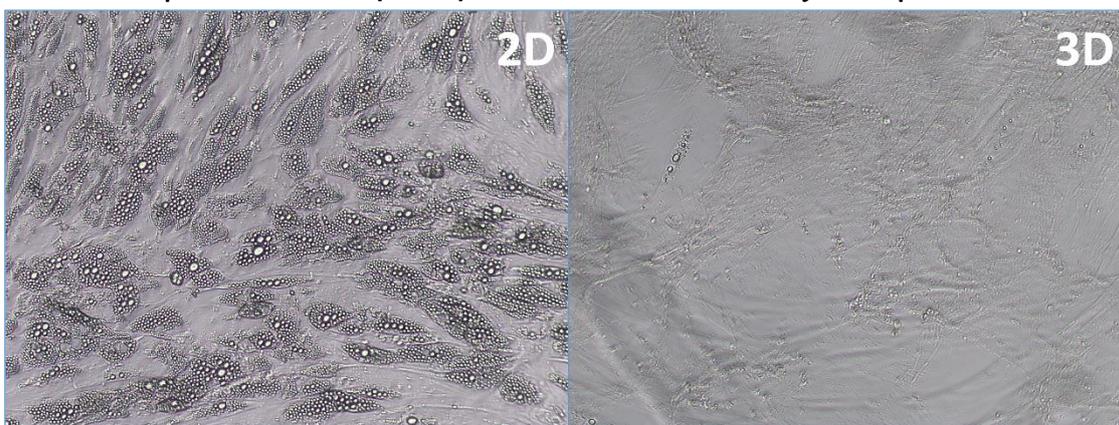


Figura 23. Imágenes representativas de microscopía óptica (400 x) de adipocitos procedentes del tejido adiposo subcutáneo de un individuo con obesidad y normogluceemia. Las células de la fracción del estroma vascular fueron se expusieron a un coctel hormonal para inducir la diferenciación hacia adipocitos en cultivos convencionales 2D (imagen izquierda) o cultivos 3D basados en hidrogel de colágeno I (1 mg/mL) (imagen derecha).

Capítulo 2. Contribución de los componentes de la matriz extracelular y de la fibrosis (lumican y colágeno VI) en la fisiopatología del tejido adiposo.

El estudio previo demostró que el tejido adiposo de individuos con obesidad en presencia o ausencia de resistencia a insulina muestra diferencias en contenido y distribución de componentes de la ECM tan relevantes como COL-I o LUM, demostrando además que este PG, a concentraciones elevadas, como ocurre en obesidad e insulinoresistencia (IR), puede ejercer efectos negativos sobre la capacidad adipogénica de los adipocitos e inducir estrés celular en estas células. Estos estudios también mostraron que otros componentes de la ECM, como colágeno VI (COL-VI) también mostraban una regulación diferencial dependiente del grado de sensibilidad a la insulina de los pacientes con obesidad, como el COL-VI α 3 (Fig. 11). De hecho, en línea con nuestras observaciones, otros estudios han mostrado aumentos fundamentalmente en isoformas de COL-I (COL-I α 1) y COLI-VI (COL-VI α 3) en tejido adiposo SC y OM de individuos con obesidad, (Ob-NG o Ob-IR), respecto a individuos delgados, y en animales con obesidad genética (ob/ob) o inducida por dieta alta en grasa (Guzman-Ruiz et al., 2020; Lawler et al., 2016; Pellegrinelli et al., 2016). Así, el siguiente objetivo fue evaluar el impacto de la presencia de COL-VI sobre los adipocitos y su posible interacción con LUM.

4.6. Caracterización ultraestructural de matrices 3D en presencia de LUM y COL-VI.

En primer lugar, llevamos a cabo una estrategia múltiple para determinar si COL-VI puede modificar la formación y el ensamblaje de las fibrillas de COL-I, ya que se había descrito previamente la interacción entre ambos colágenos (Bonaldo, Russo, Bucciotti, Doliana, & Colombatti, 1990; Keene, Ridgway, & Iozzo, 1998). Así, se llevó a cabo un estudio de fibrillogénesis utilizando una concentración de COL-VI de 36 μ g/mL (Iyengar et al., 2005; Llacua et al., 2018). En paralelo, se realizaron estudios con la concentración de LUM (30 ng/mL) compatible con la respuesta de secreción de este PG por parte de

los adipocitos expuestos a condiciones HGHI (Fig. 15) para seguir profundizando en la acción de este componente de la ECM.

De acuerdo con nuestros resultados del capítulo 1 de esta Tesis, LUM aumentó la capacidad de COL-I para formar fibrillas, alcanzando la mezcla una mayor turbidez que la observada para la solución de COL-I solo (Fig. 24; tabla 6). Por su parte, tanto la pendiente como el valor máximo de turbidez fueron mayores cuando se añadió COL-VI a la solución de COL-I. Sin embargo, la adición de LUM a la mezcla de COL-I y COL-VI no produjo cambios significativos en ninguno de los parámetros estudiados en relación con los observados en ausencia del PG (Fig. 24; tabla 6).

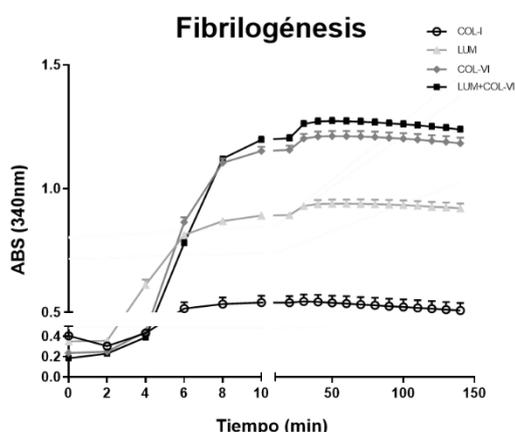


Figura 24. Efecto de lumican y colágeno-VI sobre la fibrillogénesis de colágeno I. La solución de Colágeno-I (COL-I, 3,6 mg/mL) se incubó en ausencia o presencia de lumican (LUM, 30 ng/mL), colágeno VI (COL-VI, 36 µg/mL) o la combinación de lumican y colágeno VI (LUM+COL-VI). La turbidez se midió como absorbancia a 340 nm. Los datos representan la media ± SEM, n = 3-4 repeticiones/grupo.

	COL-I	LUM	COL-VI	LUM+COL-VI
Pendiente	0.00044 ± 0.00029	0.0021 ± 0.00078	0.004 ± 0.0013	0.0047 ± 0.0015
Turbidez max.	0.54 ± 0.028	0.94 ± 0.017	1.21 ± 0.021	1.27 ± 0.012

Tabla 6. Efecto de lumican, colágeno VI en la formación de fibrillas de colágeno I. La formación de fibrillas se midió por absorbancia a 340 nm y las tasas de estabilidad se midieron determinando la pendiente de la curva y la turbidez máxima. Los ensayos se realizaron para mezclas que contenían colágeno I (COL-I) (3,6 mg/mL) solo, o en combinación con lumican (LUM) (30 ng/mL) y/o colágeno VI (COL-VI) (36 µg/mL). Los datos representan la media de tres experimentos ± SEM.

A continuación, se realizó un análisis morfométrico en micrografías de las matrices generadas en las distintas condiciones experimentales (COL-I, LUM, COL-VI y la combinación de ambas proteínas (LUM+COL-VI)) pero en ausencia de células (Fig. 25A-D). El análisis ultraestructural de estas matrices (Fig. 25B-D) mostró que la presencia de LUM indujo una disminución, aunque no significativa, en el número de fibrillas de colágeno con diámetro comprendido entre 200-300 nm en comparación con los cultivos 3D control (COL-I). Por su parte, COL-VI solo y su combinación con LUM indujeron aumentos significativos en la proporción de fibrillas de COL-I más delgadas (< 100 nm), mientras que disminuyeron en un 91% y 70%, respectivamente, y también de forma significativa, la frecuencia de las fibrillas de COL-I con un diámetro comprendido entre 200 – 300 nm, en comparación con lo observado en las matrices de COL-I solo o combinado con LUM (Fig. 25B). De esta manera, COL-VI también indujo un aumento significativo en la densidad de las fibrillas de COL-I en las matrices y, a pesar de que en presencia de LUM (LUM+COL-VI), los efectos inducidos por COL-VI sobre el grosor de las fibrillas de COL-I tendieron a recuperar los valores observados en las matrices control, la densidad de las fibrillas de COL-I no varió con respecto a las matrices que contenían COL-VI (Fig. 25C). Finalmente, COL-VI también aumentó significativamente el espaciado entre las fibrillas de COL-I, efecto que también se observó, aunque en menor medida, en presencia de LUM solo o combinado con COL-VI (Fig. 25D).

Está ampliamente aceptado que las células remodelan activamente la ECM que las rodea, mientras que la matriz influye simultáneamente en el comportamiento celular (Frantz, Stewart, & Weaver, 2010). Por ello, también se estudió la formación y organización de las fibrillas de COL-I en respuesta a LUM y COL-VI (solos o combinados) en cultivos 3D conteniendo células. Para ello, las células 3T3-L1 se diferenciaron a adipocitos (día 10) en los diferentes hidrogeles de COL-I, solo o en presencia de LUM o COL-VI, solos y en combinación (LUM+COL-VI) (Fig. 25E-I). A diferencia de lo observado en ausencia de células, LUM aumentó significativamente el grosor de las fibrillas de COL-I, a la vez que disminuyó el tamaño del poro de la matriz (o espacio interfibrilar) en comparación con el grupo control (Fig. 25F y G), confirmando los resultados obtenidos previamente en este trabajo (Fig. 20) (Guzman-Ruiz et al., 2020). Por el contrario, como se puede observar en las imágenes de microscopía electrónica de los cultivos 3D de

RESULTADOS

adipocitos que contenían COL-VI, al igual que en ausencia de células, la frecuencia de las fibrillas de COL-I con un diámetro superior a 200 nm disminuyó con respecto a dicho intervalo en condiciones control (COL-I) (Fig. 25F). A su vez, COL-VI también aumentó la densidad de las fibrillas de COL-I en los cultivos 3D de adipocitos, aunque en menor medida que la observada en ausencia de células (33,3 vs. 39,9 fibrillas/ μ^2 ; $p = 0,01$) (Fig. 25G). Sin embargo, la combinación de ambas proteínas (LUM+COL-VI) bloqueó el efecto inducido por LUM sobre el grosor de las fibrillas de COL-I (Fig. 25F), pero no modificó el tamaño del poro de las matrices (Fig. 25H). LUM tampoco tuvo ningún efecto sobre los cambios inducidos por COL-VI sobre la densidad de las fibrillas de COL-I cuando se combinaron las dos proteínas en presencia de células (Fig. 25G).

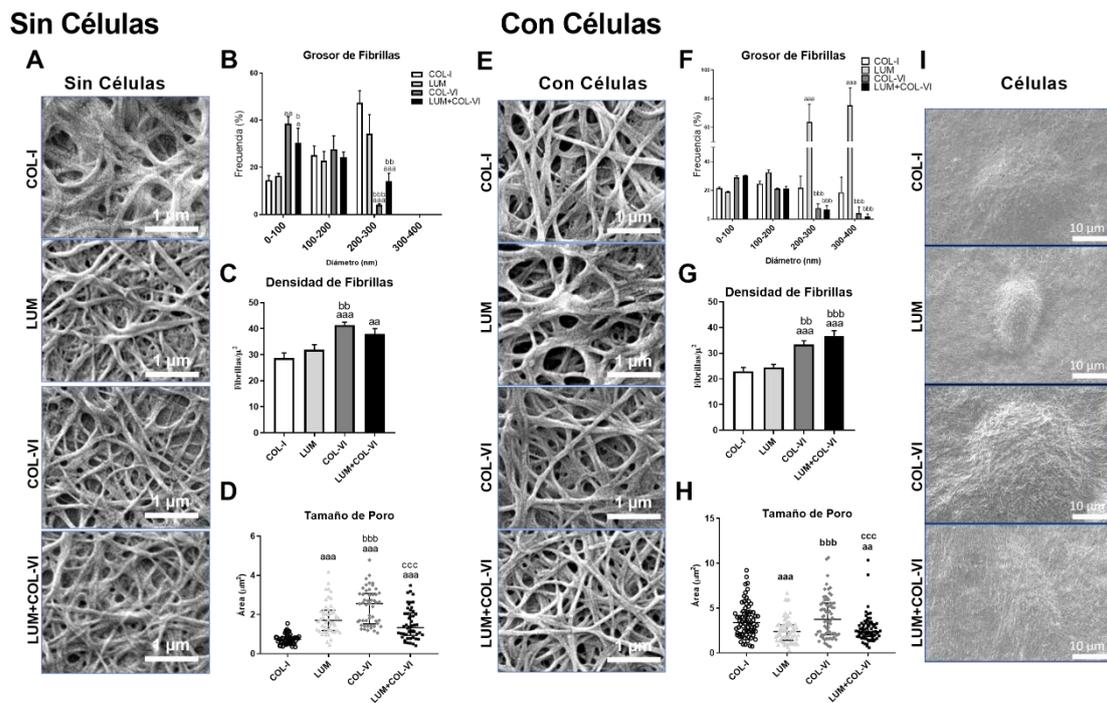


Figura 25. Caracterización ultraestructural de las matrices tridimensionales (3D). (A) Imágenes representativas de microscopía electrónica de barrido de las fibrillas de colágeno I (COL-I) solo, o en combinación con lumican (LUM), colágeno VI (COL-VI) o la mezcla de ambas proteínas (LUM+COL-VI) en ausencia de células. (B) Análisis cuantitativo del grosor de las fibrillas COL-I en las matrices 3D. Se representa en intervalos de % de frecuencia. (C) número de fibrillas/ μ^2 y (D) tamaño de poro (espacio interfibrilar) en hidrogel sin células. (E) Micrografías representativas de las fibrillas de COL-I solo, o en combinación con LUM, COL-VI o ambas proteínas (LUM+COL-VI) en presencia de células 3T3-L1. (F) Análisis cuantitativos del grosor de las fibrillas de COL-I en las matrices 3D representadas en intervalos de % de frecuencia. (G) Número de fibrillas/ μ^2 y (H) tamaño del poro en los cultivos 3D que contienen células 3T3-

L1. (I) Micrografías representativas de adipocitos 3T3-L1 diferenciados en cultivos 3D que contienen COL-I solo, o en combinación con LUM, COL-VI o ambas proteínas (LUM+COL-VI). Se analizaron 40 micrografías por grupo experimental procedentes de dos experimentos independientes. Las diferencias estadísticas se evaluaron mediante el análisis ANOVA de dos vías para el análisis de la distribución de frecuencias y la prueba de ANOVA de una vía para el resto de los análisis de datos. ^ap < 0,05; ^{aa}p < 0,01; ^{aaa}p < 0,001 vs COL-I; ^bp < 0,05; ^{bb}p < 0,01; ^{bbb}p < 0,001 vs. LUM; ^cp < 0,05 y ^{ccc}p < 0,001 vs. COL-VI.

En relación con estas observaciones, y para profundizar en el estudio de la influencia recíproca entre los adipocitos y la ECM, se llevó a cabo un análisis comparativo sobre la orientación de las fibrillas de COL-I en ausencia vs. presencia de células (Fig. 26). Para ello, se realizó el análisis cuantitativo de las imágenes de microscopía electrónica con el programa *OrientationJ* incluido en el paquete *DiameterJ*. Como se muestra en los histogramas (Fig. 26A-D), los patrones específicos de alineamiento de fibrillas de COL-I que fueron observados en las matrices 3D estuvieron influenciados por la presencia de células (Fig. 26E-H). No obstante, la orientación de las fibrillas de COL-I no presentó una dirección de alineamiento predominante en los hidrogeles en ausencia de células (sin células, línea roja) ni en las fibrillas de COL-I que rodean a los adipocitos (con células, línea negra) en respuesta a la presencia de LUM y/o COL-VI.

Sin Células vs Con Células

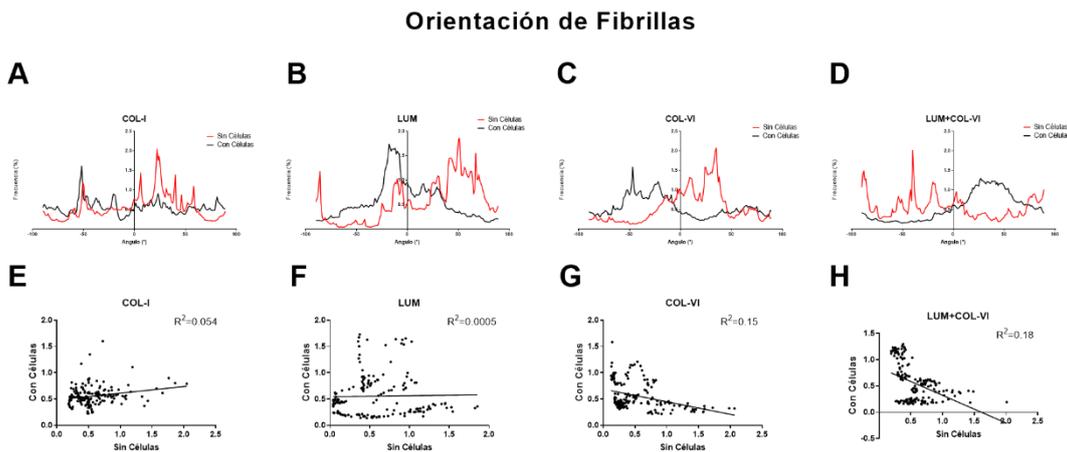


Figura 26. Análisis de alineación de las fibrillas de colágeno I. Distribución de la frecuencia de los ángulos de orientación de las fibrillas de (A) colágeno I (COL-I) solo, (B) o en combinación con lumican (LUM), (C) COL-VI o (D) ambas proteínas (LUM+COL-VI), en ausencia (línea roja) o presencia (línea negra) de adipocitos 3T3-L1. Correlaciones entre los datos de alineación de fibrillas en matrices 3D que contienen o

no células 3T3-L1 en presencia de **(E)** COL-I, **(F)** LUM, **(G)** COL-VI o **(H)** LUM+COL-VI. Las imágenes se procesaron con el programa OrientationJ incluido en el paquete ImageJ.

En conjunto, estos resultados sugieren que los adipocitos tienen la capacidad de regular la organización de las fibrillas de colágeno y, por tanto, remodelar la estructura del microambiente, estando este efecto condicionado por la presencia de componentes específicos de la ECM que, a su vez, son producidos por las células del tejido tanto en condiciones fisiológicas como patológicas.

4.7. Predicción *in silico* de la interacción entre componentes de la matriz extracelular. Estudios de *docking* proteína-proteína

Atendiendo a los resultados obtenidos en los ensayos de fibrillogénesis (Fig. 24), junto con los datos publicados por otros autores sobre la interacción entre COL-I y COL-VI (Bonaldo et al., 1990; Keene et al., 1998), y de estos colágenos con LUM (Stamov et al., 2013; Takahashi, Cho, Kublin, & Cintron, 1993), se realizó un estudio de *docking* proteína-proteína para predecir la estructura molecular de los complejos formados por estos componentes de la ECM. Para ello, se obtuvo el modelado de la estructura de LUM y a continuación, se realizó el *docking* tanto con la triple hélice de COL-I (PDB ID: 1K6F) como con la estructura cristalina del dominio α 3N2 COL-VI (PDB ID: 6SNK) y α 3N5 COL-VI (PDB ID: 4IGI) (ver procedimientos experimentales). Ambos dominios de COL-VI exhibieron parámetros de interacción similares con COL-I y/o con LUM (datos no mostrados), por lo que solo se mostrarán los datos de α 3N2 COL-VI (COL-VI, de ahora en adelante).

Los resultados de este estudio confirman y amplían los datos previos referentes a la interacción entre COL-I con LUM o COL-VI, con valores de puntuación del modelo de -666,3 y -482, respectivamente (Fig. 27A y B), así como entre LUM y COL-VI (valor de puntuación del modelo = 949,60) (Fig. 27C). Concretamente, nuestro modelo de *docking* proteína - proteína predijo que la estabilización del complejo COL-I/LUM a través de puentes de hidrógeno ocurre entre cuatro aminoácidos de la molécula de COL-I (Pro2,

Gly9, Pro11 y Pro14) y del dominio central constituido por repeticiones en tándem ricas en leucina (LRRs) [Tyr20 y Tyr47 en el dominio N-terminal de LRR (LRRNT); Tyr72 en LRR1 y Gln143 en LRR4] de la molécula de LUM (Fig. 27A). En el caso del complejo COL-I/COL-VI, los enlaces de hidrógeno se establecen entre cuatro aminoácidos de la molécula de COL-I (Gly6, Pro11, Pro19 y Pro20) y cinco aminoácidos de la molécula de COL-VI (Arg 1715, Lys1754, Arg1742 y Lys1772) (Fig. 27B). A su vez, COL-VI forma 24 puentes de hidrógeno con los dominios LRRNT, LRR1-LRR6, LRR9 y LRR11 de la estructura en lamina β de la molécula de LUM (complejo LUM/COL-VI; Fig. 27C).

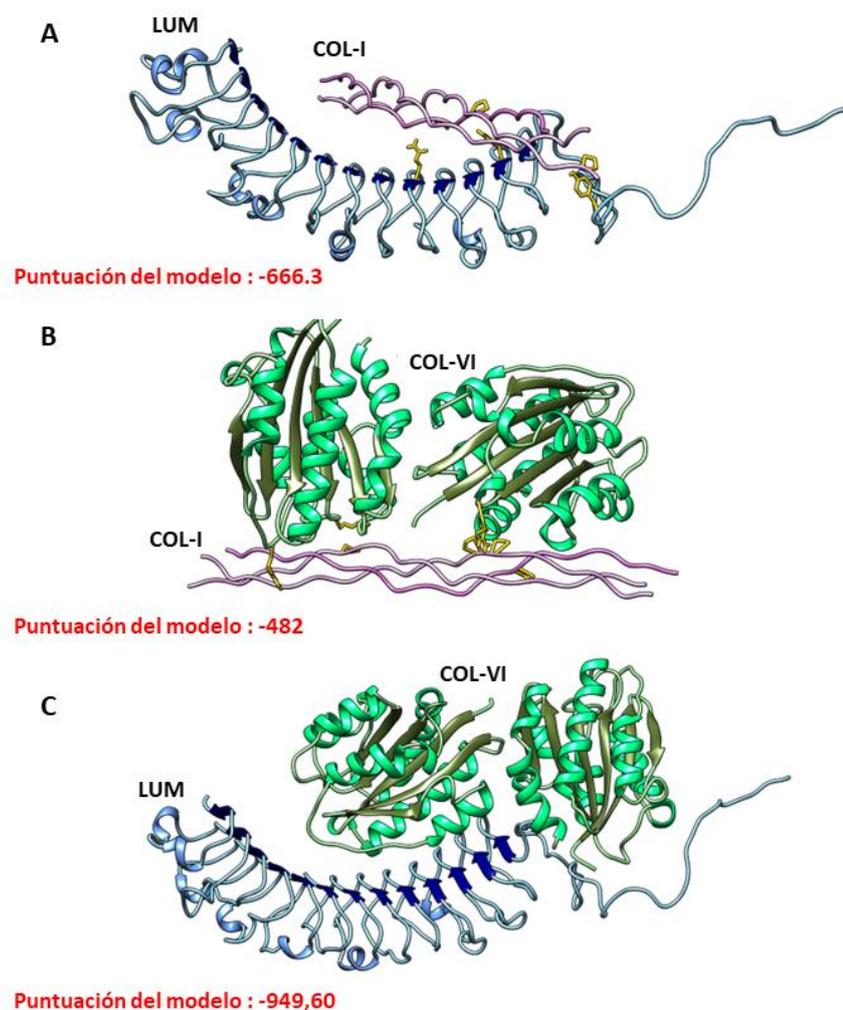


Figura 27. Docking proteína-proteína. Estructuras 3D predictivas de la interacción de colágeno I (COL-I) (PDB ID: 1K6F; morado), lumican (LUM) (modelado; azul) y α 3N2 COL-VI (PDB ID: 6SNK; verde). Complejo formado por la unión de **(A)** COL-I y LUM, **(B)** COL-I y α 3N2 COL-VI, y **(C)** LUM y α 3N2 COL-VI. Se indican para cada combinación las puntuaciones del modelo de acoplamiento basadas en las afinidades de unión de los complejos de proteínas.

A continuación, se realizó una simulación adicional de *docking* en el que se combinaron los tres componentes de la ECM (COL-I, LUM y COL-VI). Este análisis reveló que las interacciones que se establecen entre cada par de proteínas pueden estar modificadas cuando se combinan los tres componentes, generando así tres posibles estructuras moleculares del complejo COL-I/LUM/COL-VI (Fig. 28). De esta manera, cuando COL-VI está presente desaparecen los puentes de hidrógeno formados entre COL-I y LUM (Fig. 28A; estructura molecular 1), mientras que, a su vez, se reducen las interacciones establecidas entre COL-I y COL-VI cuando se combinan con LUM (Fig. 28B; estructura molecular 2). Por su parte, la presencia de COL-I limita la unión entre LUM y COL-VI al dominio LRRNT y reduce el número de enlaces de hidrogeno entre las dos proteínas (de 24 a 5 enlaces) (Fig. 28C; estructura molecular 3). De hecho, los puentes de hidrogeno establecidos entre los dominios LRR1 (Tyr72) y LRR4 (Gln143) de LUM y la molécula de COL-VI, fueron sustituidos por la unión de estos dominios a dos aminoácidos (Pro11 y Pro14, respectivamente) de la triple hélice de COL-I cuando se combinaron las tres proteínas (Fig. 28).

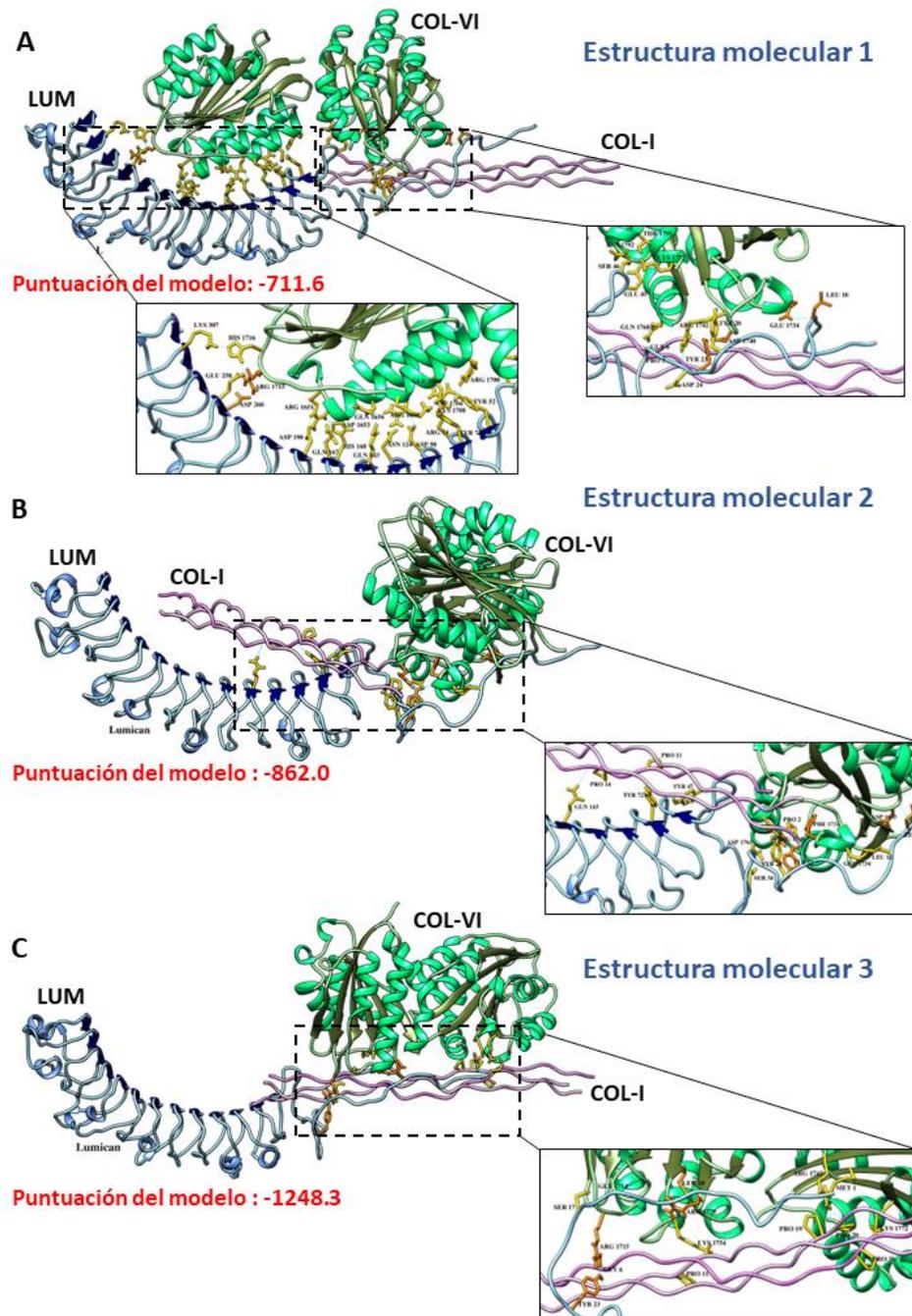


Figura 28. Docking proteína-proteína. Estructuras 3D predictivas de la interacción de colágeno I (COL-I) (PDB ID: 1K6F; morado), lumican (LUM) (modelado; azul) y $\alpha 3N2$ COL-VI (PDB ID: 6SNK; verde). Complejo formado por la unión de **(A)** LUM- $\alpha 3N2$ COL-VI Y COL-I (**estructura molecular 1**), **(B)** COL-I- LUM y $\alpha 3N2$ COL-VI (**estructura molecular 2**), y **(C)** COL-I- $\alpha 3N2$ COL-VI y LUM (**estructura molecular 3**). Se indican para cada combinación las puntuaciones del modelo de acoplamiento basadas en las afinidades de unión de los complejos de proteínas. Los enlaces de hidrógeno se muestran en dorado y los residuos involucrados en el efecto competencia se muestran en naranja.

En resumen, nuestro modelo de *docking* proteína–proteína apoya nuestros datos experimentales, y refuerza la idea de que tanto la formación como la organización de las fibrillas de COL-I se ven afectadas por la composición específica de la ECM.

4.8. Respuesta de los adipocitos a Lumican y COL-VI en cultivos 3D

4.8.1. Análisis de la diferenciación de los adipocitos 3T3-L1 en cultivos 3D

En primer lugar, se analizó si los cambios en COL-VI, solo o en combinación con LUM, podrían afectar al proceso de diferenciación de las células 3T3-L1, tal y como demostramos que ocurre en presencia de LUM (capítulo 1).

Como en los estudios descritos en la primera parte de esta Tesis, la observación microscópica de los cultivos de adipocitos en matrices 3D conteniendo LUM mostraban signos morfológicos de una alteración de la adipogénesis (Fig. 29). Por su parte, en presencia de COL-VI, observamos que las células acumulaban numerosas LDs, aparentemente más numerosas que en las células diferenciadas en los cultivos control (COL-I), exhibiendo una morfología redondeada (Fig. 29). Las células 3T3-L1 diferenciadas en las matrices 3D conteniendo LUM+COL-VI mostraron una morfología intermedia a la descrita para cada proteína por separado (Fig. 29).

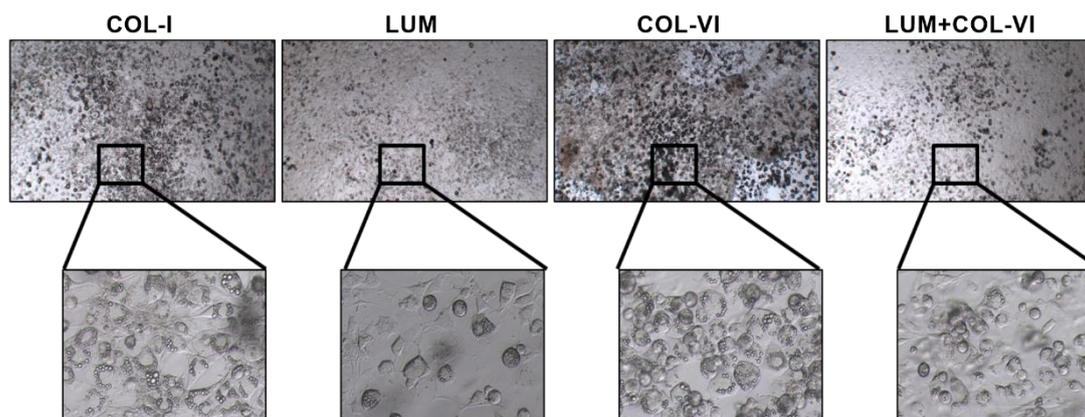


Figura 29. Adipocitos 3T3-L1 en cultivos 3D. Los fibroblastos 3T3-L1 se embebieron en matrices de colágeno I (3,6 mg/mL), en ausencia (COL-I) o presencia de lumican (30 ng/mL) (LUM), colágeno VI (36 μ g/mL) (COL-VI) o la combinación de ambas proteínas (LUM+COL-VI). Se añadió un coctel hormonal para inducir la diferenciación durante 10 días. Las imágenes se obtuvieron mediante microscopía óptica (400x).

Estas observaciones morfológicas se confirmaron cuando cuantificamos la acumulación de lípidos en las células 3T3-L1 cultivadas y diferenciadas en las distintas matrices 3D (COL-I, LUM, COL-VI, LUM+COL-VI) mediante el análisis de imágenes de microscopía confocal (Fig. 30A) y la cuantificación del contenido lipídico, tamaño y número de LDs y tamaño celular en las mismas (Fig. 30B-E). De acuerdo con lo descrito en la primera parte de la Tesis, los adipocitos 3T3-L1 cultivados en los hidrogeles que contenían LUM exhibieron una reducción del 75% del contenido lipídico en comparación con los adipocitos en matrices que contenían solo COL-I (Fig. 18B y Fig. 30B). Por el contrario, la presencia de COL-VI en los hidrogeles aumentó significativamente la capacidad para acumular lípidos por parte de los adipocitos 3T3-L1 (aumento del 51% vs. COL-I) y, en menor medida, pero también de forma significativa, cuando el COL-VI se administró conjuntamente con LUM (LUM+COL-VI) (reducción del 49% vs. COL-I) (Fig. 30B). Por su parte, los cambios en el tamaño de las LDs y del tamaño celular fueron paralelos a lo observado para el contenido de lípidos en todas las condiciones experimentales. Así, LUM provocó una disminución, mientras que COL-VI aumentó significativamente ambos parámetros y la combinación de ambos componentes (LUM+COL-VI), provocó nuevamente un fenotipo celular y de LDs intermedio (Fig. 30D y E). Aunque se observó un aumento en el número de LDs, especialmente en respuesta a COL-VI, éste no alcanzó significancia estadística (Fig. 30C).

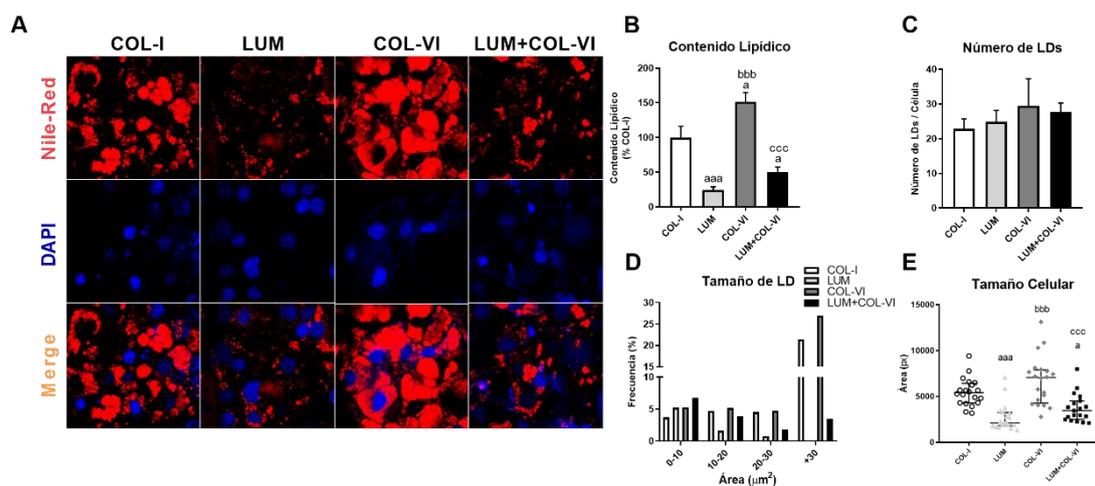


Figura 30. Diferenciación de adipocitos 3T3-L1 en matrices 3D. (A) Imágenes representativas de microscopía confocal de adipocitos 3T3-L1 diferenciados en hidrogeles de colágeno I (COL-I) solo o en presencia de lumican (LUM) o colágeno VI (COL-VI) o la combinación de ambas proteínas (LUM+COL-VI). Las gotas lipídicas (LDs) se visualizaron mediante la tinción Nile Red (rojo)

RESULTADOS

y los núcleos se tiñeron con DAPI (azul). Se utilizaron imágenes de microscopía confocal para la cuantificación del **(B)** contenido total de lípidos, **(C)** número de LDs y **(D)** la distribución de la frecuencia de tamaño de LD. Para la cuantificación del **(E)** tamaño celular se utilizaron imágenes de microscopía óptica (figura 29). ($n = 10$ células/grupo). Las diferencias estadísticas se evaluaron mediante el análisis ANOVA de una vía para los datos paramétricos, o la prueba de Kruskal-Wallis para los datos no paramétricos. ^a $p < 0,05$, ^{aaa} $p < 0,001$ vs. COL-I; ^{bbb} $p < 0,001$ vs. LUM; ^{ccc} $p < 0,001$ vs. COL-VI. Los datos representan la media \pm SEM ($n = 10$ imágenes/grupo).

Se analizaron también los factores de transcripción que dirigen la diferenciación adipogénica en las células 3T3-L1 cultivadas en los diferentes hidrogeles 3D (Fig. 31). En línea con las observaciones microscópicas, LUM disminuyó significativamente la expresión de factores adipogénicos como C/ebp α o Ppar γ , y de genes que son regulados por estos factores, como FABP4 (Fig. 31A-D). Además, LUM indujo la acumulación intracelular de adiponectina en los adipocitos disminuyendo significativamente la capacidad para secretar esta adipoquina al medio extracelular (Fig. 31E y F), lo que confirma y amplía los resultados descritos en apartados anteriores (Fig. 22B) (Guzman-Ruiz et al., 2020). Por su parte, COL-VI indujo el efecto contrario a LUM, así indujo un aumento significativo en los niveles de expresión de C/ebp α , Ppar γ y de FABP4 (*fatty acid binding protein*) (Fig. 31A-D) así como del ratio secreción/contenido intracelular de adiponectina (Fig. 31E y F), lo que, en conjunto, probablemente contribuya al aumento en el contenido y tamaño de LDs observados en los adipocitos diferenciados en matrices 3D conteniendo COL-VI (Fig. 30). Por su parte, los cultivos que contenían LUM y COL-VI combinados mostraron un fenotipo intermedio. Concretamente, estos adipocitos mostraron niveles de expresión similares a los obtenidos en los cultivos control (COL-I) en todos los factores adipogénicos (C/ebp α , Ppar γ y FABP4) (Fig. 31A-D). Sin embargo, en dichos cultivos si se vio aumentada significativamente la capacidad para secretar adiponectina por parte de las células, alcanzando un contenido extracelular similar al encontrado en los cultivos que contenían solo COL-VI para esta adipoquina (Fig. 31E y F).

Reguladores de la Adipogénesis

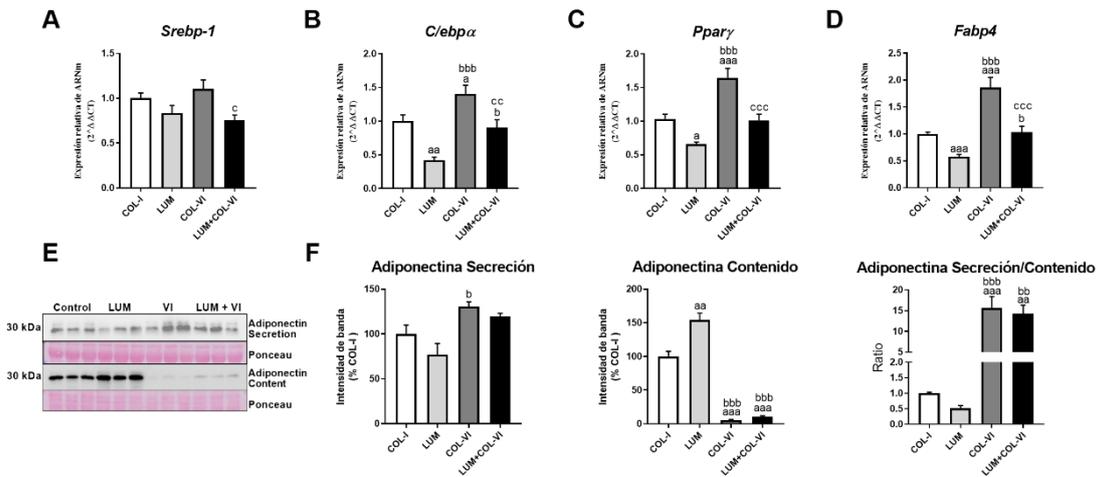


Figura 31. Adipogénesis in vitro de adipocitos 3T3-L1 en cultivos 3D. Cuantificación por RT-qPCR de los niveles de expresión de ARNm de los marcadores de adipogénesis **(A)** *Srebp-1*, **(B)** *C/ebpα*, **(C)** *Pparγ*, y **(D)** *Fabp4* en adipocitos 3T3-L1 diferenciados en hidrogeles de colágeno I (COL-I) (3,6 mg/mL) solo o en presencia de lumican (LUM; 30 ng/mL), colágeno VI (COL-VI; 36 μg/mL) o la combinación de ambas proteínas (LUM+COL-VI). Los datos representan la media ± SEM (n = 12-18 repeticiones/grupo). **(E)** Immunoblots representativo del **(F)** contenido proteico de Adiponectina en el medio de cultivo (gráfico izquierdo), y extractos celulares (gráfico central) de adipocitos 3T3-L1 diferenciados en las matrices 3D. El ratio extracelular/intracelular de adiponectina (gráfica derecho) se calculó como una medida de la secreción de adiponectina. Los datos representan la media ± SEM (n = 3 repeticiones/grupo). Las diferencias estadísticas se evaluaron mediante el análisis ANOVA de un factor para los datos paramétricos y mediante el análisis Kruskal-Wallis para los datos no paramétricos. ^ap<0,05; ^{aa}p<0,01; ^{aaa}p<0,001 vs. COL-I, ^bp<0,05; ^{bb}p<0,01; ^{bbb}p<0,001 vs. LUM, ^cp<0,05; ^{cc}p<0,01; ^{ccc}p<0,001 vs. COL-VI.

En vista de los resultados obtenidos respecto a la expresión de los genes relacionados con el fenotipo adipogénico, se evaluó la expresión de genes determinantes de la formación (Seipin) y crecimiento (Cidea, Cidec/Fsp27) de las LDs, así como el contenido de perilipina (Plin-1), una proteína presente en la monocapa de las LDs que desempeña un importante papel en la movilización y acumulación de grasa (Moseti et al., 2016), en los adipocitos en los distintos modelos de cultivos 3D. Los estudios de expresión génica mostraron que cuando estas células se mantienen en un ambiente rico en LUM solo o combinado con COL-VI, se produce una disminución en los niveles de expresión de todos los genes estudiados en comparación con lo observado en los

hidrogeles que contenían COL-I solo o combinado con COL-VI (Fig. 32). Por el contrario, el cultivo de los adipocitos en presencia de COL-VI indujo un aumento numérico, aunque no significativo, de todos los marcadores génicos relacionados con la formación y el crecimiento de LDs en comparación con las matrices de COL-I (Fig. 32). Solo en el caso de Cidea, una proteína que participa en el proceso de fusión de LDs, se observaron niveles significativos de expresión tras la exposición a COL-VI (Fig. 32B).

Reguladores de la formación de LDs

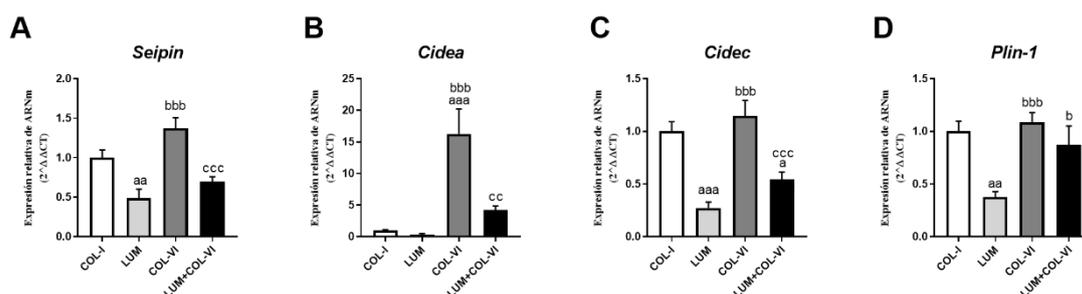


Figura 32. Formación, crecimiento y metabolismo de las gotas lipídicas en adipocitos 3T3-L1 en cultivos 3D. Cuantificación por RT-qPCR de los niveles de expresión de ARNm de los marcadores de formación, (A) *Seipin*, crecimiento (B) *Cidea*, (C) *Cidec* y metabolismo, (D) *Perilipin 1 (Plin-1)* de gotas lipídicas (LDs) en adipocitos 3T3-L1 diferenciados en hidrogeles de colágeno I (COL-I) (3,6 mg/mL) solo o en presencia de lumican (LUM; 30 ng/mL), colágeno VI (COL-VI; 36 µg/mL) o la combinación de ambas proteínas (LUM+COL-VI). Los datos representan la media ± SEM (n = 12 repeticiones/grupo). Las diferencias estadísticas se evaluaron mediante el análisis ANOVA de un factor para los datos paramétricos y mediante el análisis Kruskal-Wallis para los datos no paramétricos. ^{aa}p<0,01; ^{aaa}p<0,001 vs. COL-I, ^{bbb}p<0,001 vs. LUM, ^{cc}p<0,01; ^{ccc}p<0,001 vs. COL-VI.

4.8.1. Estudios de señalización: Fosfoproteómica de adipocitos 3T3-L1 en cultivos 3D

Con el fin de profundizar en los posibles mecanismos moleculares implicados en la respuesta a los componentes de la ECM observados en los adipocitos, se llevó a cabo un análisis del fosfoproteoma de adipocitos 3T3-L1 diferenciados en las matrices de COL-I solo o con LUM y/o COL-VI. De esta manera, se identificaron las fosfoproteínas que sufrían cambios en alguna de las condiciones testadas, así como los residuos fosforilados concretos en cada una de ellas. A partir de estos datos, se realizaron diferentes estudios bioinformáticos utilizando distintos *softwares* para la identificación de los procesos

biológicos y las rutas de señalización afectadas, así como para la realización de análisis de enriquecimiento funcional y de redes de interacción de proteínas. También se realizaron estudios de identificación de las quinasas que serían responsables de los cambios observados en las proteínas fosforiladas identificadas en cada condición experimental (regulación *up-stream*).

Así, se identificaron un total de 2244 residuos fosforilados y 1534 fosfopéptidos (1518, 1514 y 1513 fosfopéptidos para LUM, COL-VI y LUM+COL-VI, respectivamente), que corresponden a un total de 770 fosfoproteínas identificadas en las distintas matrices 3D (Fig. 33A). Entre ellas, el ~80 %, ~10 % y ~2 %, de las fosforilaciones ocurrieron en residuos de serina (Ser), treonina (Thr) y tirosina (Tyr), respectivamente (Fig. 33B). Concretamente, como se muestra en el diagrama de dispersión de la figura 33C, 40 fosfopéptidos presentaron diferencias estadísticamente significativas en el grado de fosforilación, (16 fosfopéptidos con el grado de fosforilación aumentado (fosforilados), y 24 fosfopéptidos con el grado de fosforilación disminuido (desfosforilados); $p < 0.05$) en las matrices que contenían LUM en comparación con las matrices control (COL-I) (Fig. 33C). Adicionalmente, se identificaron 159 fosfopéptidos (92 fosforilados y 67 desfosforilados; $p < 0.05$) y 151 fosfopéptidos (87 fosforilados y 64 desfosforilados; $p < 0.05$) con diferencias significativas en el grado de fosforilación en las matrices que contenían COL-VI solo (Fig. 33D) o combinado con LUM (Fig. 33F) respectivamente.

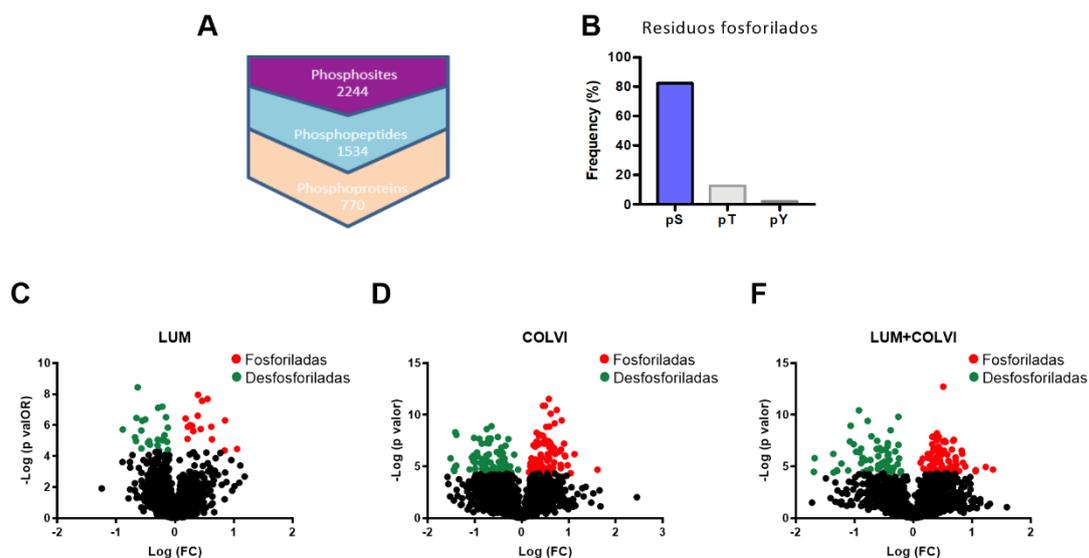


Figura 33. Análisis fosfoproteómico de adipocitos 3T3-L1 en matrices 3D. (A) Resumen del número de fosfositos (morado), fosfopéptidos (azul) y fosfoproteínas (rosa) identificados en el estudio fosfoproteómico en adipocitos 3T3-L1 en adipocitos 3T3-L1 diferenciados en diferenciados en hidrogel de colágeno I (COL-I) (3,6 mg/mL) solo o en presencia de lumican (LUM; 30 ng/mL), colágeno VI (COL-VI; 36 μ g/mL) o la combinación de ambas proteínas (LUM+COL-VI). (B) Frecuencia de los residuos fosforilados de serina (pS), treonina (pT) y tirosina (pY) en el conjunto de datos. Volcano plots que muestran la fosforilación diferencial de los fosfositos en adipocitos 3T3-L1 en matrices 3D. El eje Y muestra el \log_{10} (p valor) frente a \log_2 (fold change (FC)) en el eje X. Los residuos que presentan diferencias significativas en el grado de fosforilación en comparación con el control (COL-I) se muestran en rojo (fosforilados) y verde (desfosforilados) ($p < 0,05$).

En términos de las fosfoproteínas correspondientes, se identificaron un total de 34, 203 y 136 proteínas con distinto grado de fosforilación en respuesta a LUM, COL-VI y la combinación de ambas proteínas (LUM+COL-VI), respectivamente (Fig. 34A-C). Dichas proteínas fueron categorizadas por procesos biológicos y agrupadas para visualizar las redes de interacción molecular mediante el uso del *software Cytoscape*. Así, el análisis de la interacción entre las fosfoproteínas significativamente diferentes aportó información sobre los procesos celulares y rutas metabólicas, comunes y no comunes, que dirigen las funciones biológicas de los adipocitos en respuesta al microambiente generado por las distintas matrices 3D. Entre los procesos celulares comunes en las tres condiciones experimentales, se identificaron mecanismos de unión a ARN/proteínas, procesos de traducción intracelular de señales y organización de citoesqueleto (Fig. 34A-

C). Adicionalmente, este estudio también permitió la identificación de dos proteínas asociadas con la mecanotransducción de señales, el coactivador transcripcional YAP (proteína 1 asociada a Yes) y la proteína nuclear lamina A, que estaban significativamente fosforilada y desfosforilada, respectivamente, en los tres tipos de cultivos 3D en comparación con las matrices que contenían solo COL-I (Fig. 34A-C). En todas las condiciones estudiadas, también se encontraron proteínas diferencialmente reguladas relacionadas con procesos celulares como metabolismo y la unión de carbohidratos y/o lípidos, así como proteínas que participan en las rutas de señalización y resistencia a insulina (Fig. 34A-C).

Adicionalmente, se realizó un estudio para identificar rutas canónicas diferencialmente reguladas entre las distintas matrices 3D mediante el *software* bioinformático *Ingenuity Pathways* (IPA) (Fig. 34D). De las rutas identificadas, se consideraron significativamente diferentes aquellas que obtuvieron un valor Z mayor a 2 ($Z\text{-score} > 2$) para la activación y menor a 2 ($Z\text{-score} < 2$) para la inhibición de las vías de señalización (Z. Shao et al., 2020). Este análisis mostro un total de 68 rutas diferencialmente reguladas, de las cuales, en su mayor parte, se activaron significativamente en los tres grupos experimentales, aunque en diferente medida ($Z\text{-score}$), en comparación con los hidrogeles control (COL-I) (Fig. 34D). Entre las rutas que se encontraron inhibidas en los cultivos 3D, se identificaron la señalización por receptores activados por PPARs (especialmente en los hidrogeles que contenían LUM) y la vía de señalización RhoGDI (especialmente en los cultivos que contenían LUM+COL-VI), mientras que la regulación del ciclo celular en G1/S y la ruta de señalización que induce apoptosis se encontraron especialmente inhibidas en LUM y COL-VI, respectivamente (Fig. 34D).

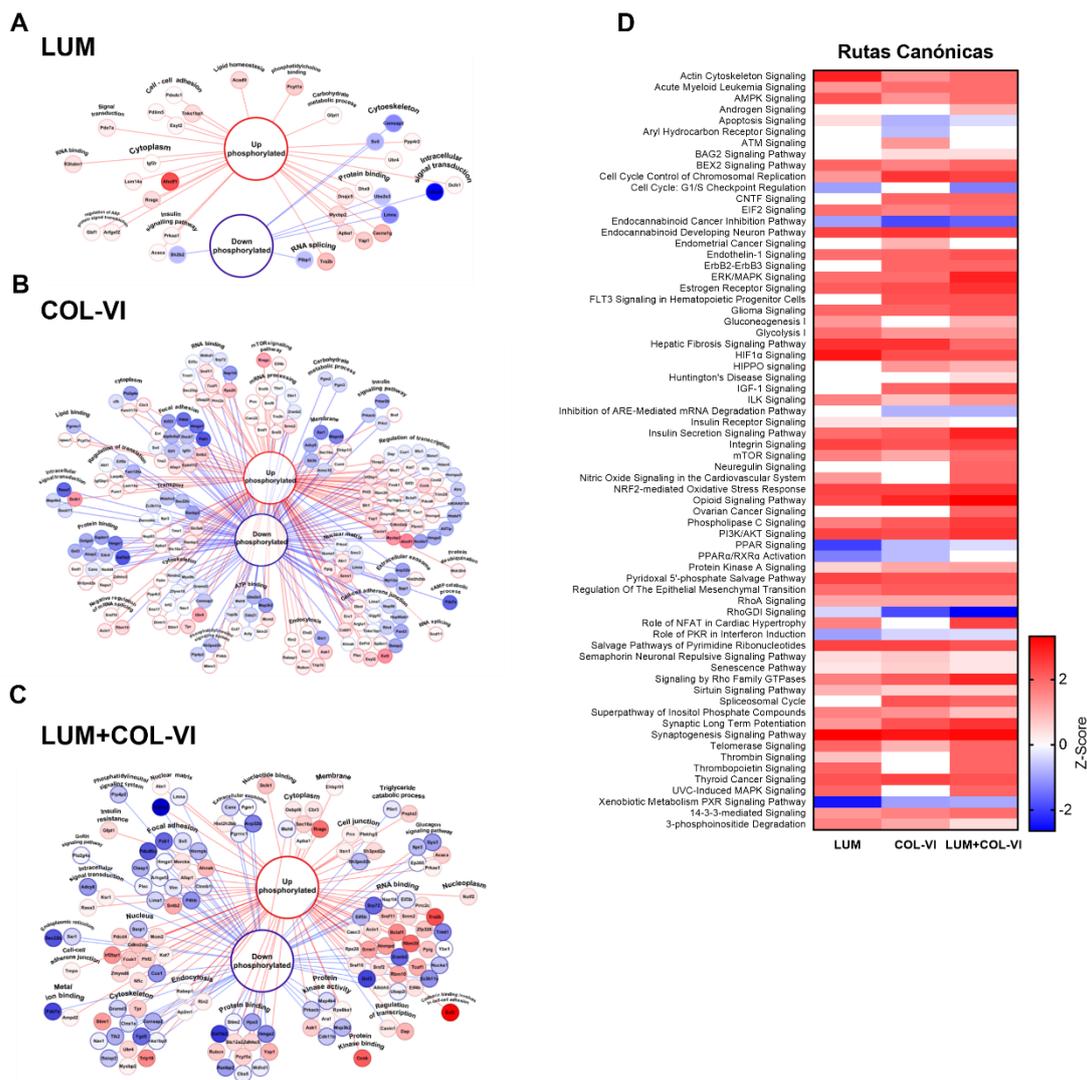


Figura 34. Análisis de redes biológicas y rutas canónicas en adipocitos 3T3-L1 en cultivos 3D. Análisis de la interacción de las proteínas con diferencias significativas en el grado de fosforilación en adipocitos 3T3-L1 diferenciados en hidrogeles **(A)** que contienen lumican (LUM; 30 ng/mL), **(B)** colágeno VI (COL-VI; 36 µg/mL) o **(C)** la combinación de ambas proteínas (LUM+COL-VI) en comparación con los hidrogeles de colágeno I (COL-I) (3,6 mg/mL) solo, usando el software Cytoscape. Los procesos biológicos se representan en un mapa de categorías funcionales. Los círculos rojos y azules representan las proteínas fosforiladas y desfosforiladas, respectivamente. La intensidad del color indica el grado de fosforilación. **(D)** Heat Map generado por el análisis de rutas canónicas del software Ingenuity Pathways Analysis (IPA). El color rojo y azul indican las rutas canónicas que se encuentran activas o inactivas, respectivamente. La intensidad del color indica el grado de activación/inactivación de las vías determinado por el Z-score de IPA.

En la figura 35 se muestran las 10 rutas con mayor cambio para cada condición (LUM, COLVI, LUM+COLVI) (ordenadas por $-\log_2$ (p valor) y “*Fold enrichment*”) (Fig. 35A-C), así como los sitios específicos de fosforilación identificados (residuos fosforilados) de las proteínas que componen las distintas rutas de señalización (Fig. 35D-W). Entre las principales vías de señalización asociadas a la presencia de LUM, se encontraron la ruta de la glucólisis (*Glycolysis I*), la señalización mediada por el citoesqueleto de actina (*Actin Cytoskeleton Signaling*) y la señalización a través de la activación del receptor de insulina (*Insulin Receptor Signaling*) (Fig. 35A). Entre ellas, tanto glucólisis como señalización por receptor de insulina se encontraban entre los 10 primeros procesos regulados en los hidrogeles que contenían COL-VI, solo o combinado con LUM (Fig. 35B y C). En los adipocitos diferenciados en presencia de COL-VI, solo o en combinación con LUM, se identificaron otras rutas de interés como la señalización inducida por AMPK (*AMPK Signaling*) y la vía de señalización HIPPO (*HIPPO Signaling*) (Fig. 35B y C).

Con el fin de poder profundizar en las rutas diferencialmente reguladas, se llevó a cabo un análisis de fosfopéptidos de las proteínas para cada ruta identificada. Estos resultados mostraron distintos patrones de fosforilación en respuesta a la diferente composición de las matrices 3D. En particular, el patrón de residuos fosforilados identificados en los adipocitos cultivados en presencia de LUM, siguió una tendencia distinta en comparación con los sitios de fosforilación encontrados en los adipocitos cultivados en hidrogeles que contenían COL-VI, solo o combinado con LUM (LUM+COL-VI), en todas las rutas de señalización estudiadas (Fig. 35D-W).

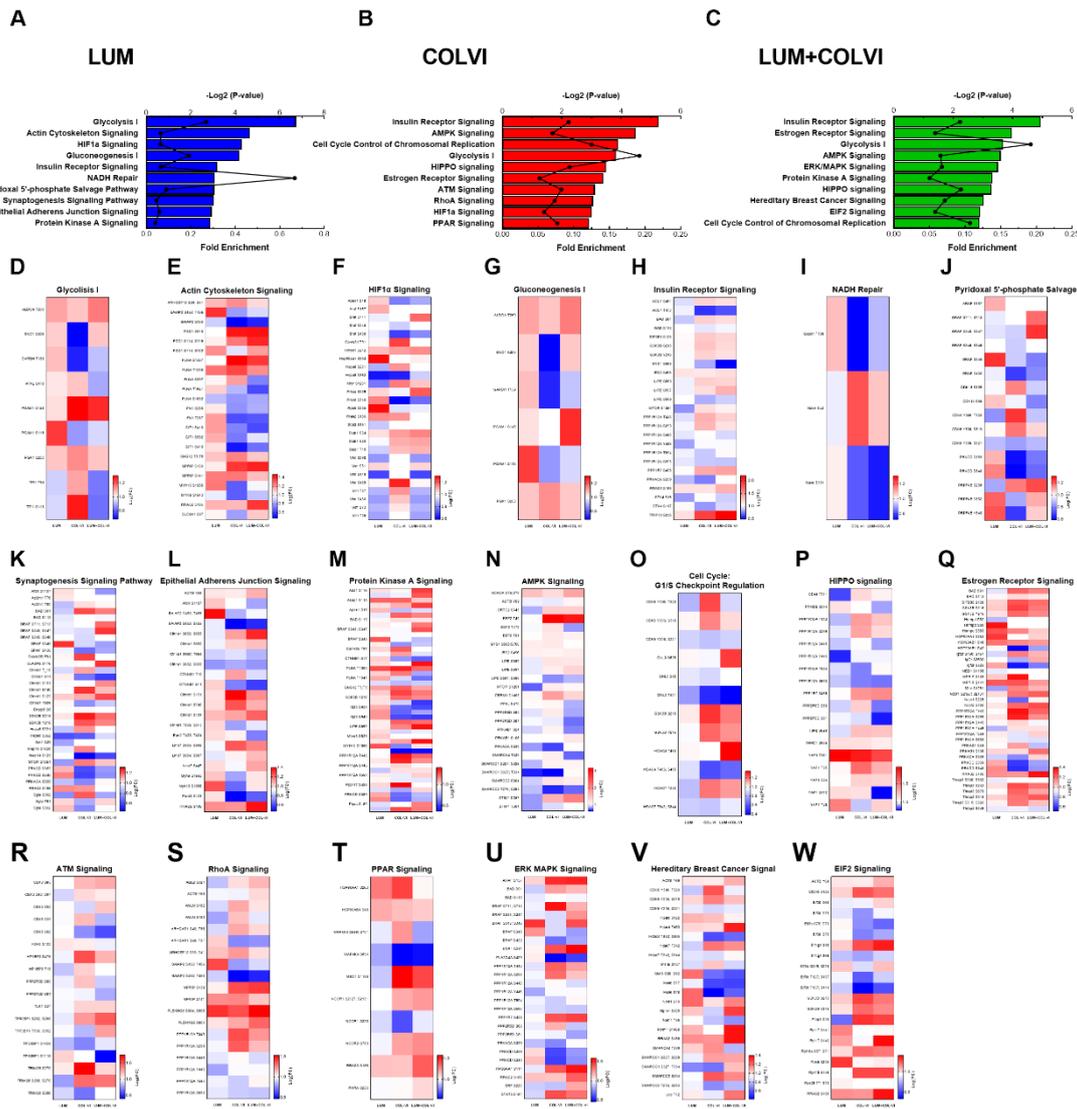


Figura 35. Ingenuity Pathways Analysis (IPA) en adipocitos 3T3-L1 en cultivos 3D. Análisis de las 10 vías canónicas con mayores diferencias estadísticas en adipocitos 3T3-L1 diferenciados en hidrogeles (A) que contienen lumican (LUM; 30 ng/mL), (B) colágeno VI (COL-VI; 36 µg/mL) o (C) la combinación de ambas proteínas (LUM+COL-VI) en comparación con los hidrogeles de colágeno I (COL-I) (3,6 mg/mL) solo. Heat Maps de los fosfositios diferencialmente fosforilados en las 10 principales rutas con mayores diferencias estadísticas para cada condición experimental: (D) Glycolysis; (E) Actin cytoskeleton signaling; (F) Hypoxia Inducible Factor alfa (HIF1α) signaling; (G) Gluconeogenesis; (H) Insulin receptor signaling; (I) Nicotinamide adenine dinucleotides (NADH) repair; (J) Pyridoxal 5'-phosphate salvage; (K) Synaptogenesis signaling pathway; (L) Epithelial adherens junction signaling; (M) Protein kinase A signaling; (N) AMP-activated protein kinase (AMPK) signaling; (O) Cell cycle: G1/S Checkpoint regulation; (P) HIPPO signaling; (Q) Estrogen receptor signaling; (R) ATM signaling; (S) RhoA signaling; (T) PPAR signaling; (U) ERK/MAPK Signaling; (V) Hereditary breast cancer signal; and (W) EIF2 signaling. Los residuos fosforilados y desfosforilados se muestran en rojo y azul, respectivamente. El grado de fosforilación se representa como log2 (fold change) y se indica mediante la intensidad del color.

Por último, también se llevó a cabo un análisis de las quinasas potencialmente responsables de la activación/inhibición de las fosfoproteínas identificadas (Savage & Zhang, 2020) utilizando la herramienta *Kinase Enrichment Analysis 2* (KEA2) (<http://www.maayanlab.net/KEA2>). Este análisis reveló que, en los hidrogeles que contenían COL-VI, solo o combinado con LUM (LUM+COL-VI), se produciría un aumento significativo de la activación de la glucógeno sintasa quinasa 3 (GSK3) y de la quinasa dependiente de ciclina 2 (CDK2) (Fig. 36), dos quinasas que están estrechamente vinculadas con el proceso de diferenciación en los adipocitos (Li et al., 2007; Zaragosi et al., 2008). Respecto a LUM solo, se observó un menor grado de activación de quinasas *up-stream*, que, en cualquier caso, parece también afectar a las dos quinasas indicadas para COL-VI.

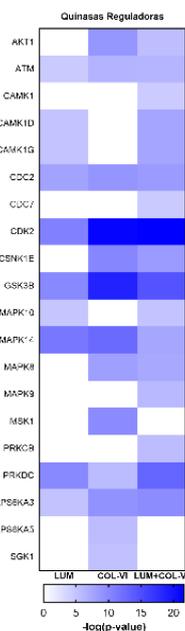


Figura 36. Kinase Enrichment Analysis 2 (KEA2) en adipocitos 3T3-L1 en matrices 3D. Análisis de las quinasas potencialmente responsables de la fosforilación/desfosforilación de las fosfoproteínas identificadas usando el software KEA2 en adipocitos 3T3-L1 diferenciados en hidrogeles que contienen lumican (LUM; 30 ng/mL), colágeno VI (COL-VI; 36 µg/mL) o la combinación de ambas proteínas (LUM+COL-VI) en comparación con los hidrogeles de colágeno I (COL-I) (3,6 mg/mL) solo. La intensidad del color indica el grado de activación según lo determinado por el $-\log(p \text{ valor})$.

4.9. Efectos de los componentes de la matriz extracelular en la señalización de insulina y la captación de glucosa en adipocitos 3T3-L1

Como se ha descrito en el apartado anterior, el estudio fosfoproteómico en células 3T3-L1 cultivadas y diferenciadas en las diferentes matrices 3D reveló cambios significativos en el grado de fosforilación de proteínas relacionadas con la ruta de la señalización por receptor de insulina en los adipocitos expuestos a todas las condiciones experimentales estudiadas (Fig. 35A-C). Con el fin de validar estos resultados y evaluar el efecto específico de los distintos componentes de la ECM sobre la fisiología de los adipocitos, se analizó tanto el receptor de insulina como los mediadores que participan en la ruta de señalización de esta hormona, así como de la respuesta celular asociada a cambios potenciales en dicha ruta (Fig. 37). Así, se observó que los adipocitos cultivados en las matrices que contenían LUM presentaban un nivel de expresión significativamente inferior del gen del receptor de insulina (Fig. 37 A), así como una disminución, también significativa, de la expresión del transportador de glucosa característico de los adipocitos, GLUT-4 (Fig. 37C). La disminución de la expresión génica de GLUT-4 estuvo acompañada además de una disminución del contenido de la proteína GLUT4, como determinamos mediante la cuantificación de la señal inmunofluorescente para dicha proteína en las imágenes de microscopía confocal de los adipocitos en matrices 3D conteniendo LUM (Fig. 37C y E). Más aún, la señal inmunofluorescente para GLUT4 en los cultivos tratados con LUM presentaba una localización intracelular mucho más dispersa que en el resto de las condiciones experimentales (Fig. 37E). Por su parte, la presencia de COL-VI en los cultivos 3D produjo un aumento en el contenido del sustrato del receptor de insulina 1 (IRS-1) con respecto a lo observado en los cultivos control (COL-I) (Fig. 37B). De manera similar, COL-VI también indujo un incremento significativo de la expresión de GLUT-4 en estas células (Fig. 37C), así como un aumento de la señal de inmunofluorescencia obtenida para GLUT-4 mediante el análisis de las imágenes de microscopía confocal (Fig. 37E). Curiosamente, en las células expuestas a COL-VI, la inmunoseñal para GLUT-4 se localizó principalmente asociada a la superficie celular (Fig. 28E). También se observó un aumento cuantitativo, aunque no significativo, en el contenido intracelular de AS160 (Fig. 37D), una Rab GTPasa que participa en el tráfico

vesicular de GLUT-4 (Sharma & Dey, 2021) y que, además, encontramos diferencialmente fosforilada en nuestro estudio fosfoproteómico (Fig. 35). Estos resultados permiten sugerir una mayor traslocación de este transportador de glucosa a la membrana plasmática de los adipocitos cultivados en las matrices que contenían COL-VI.

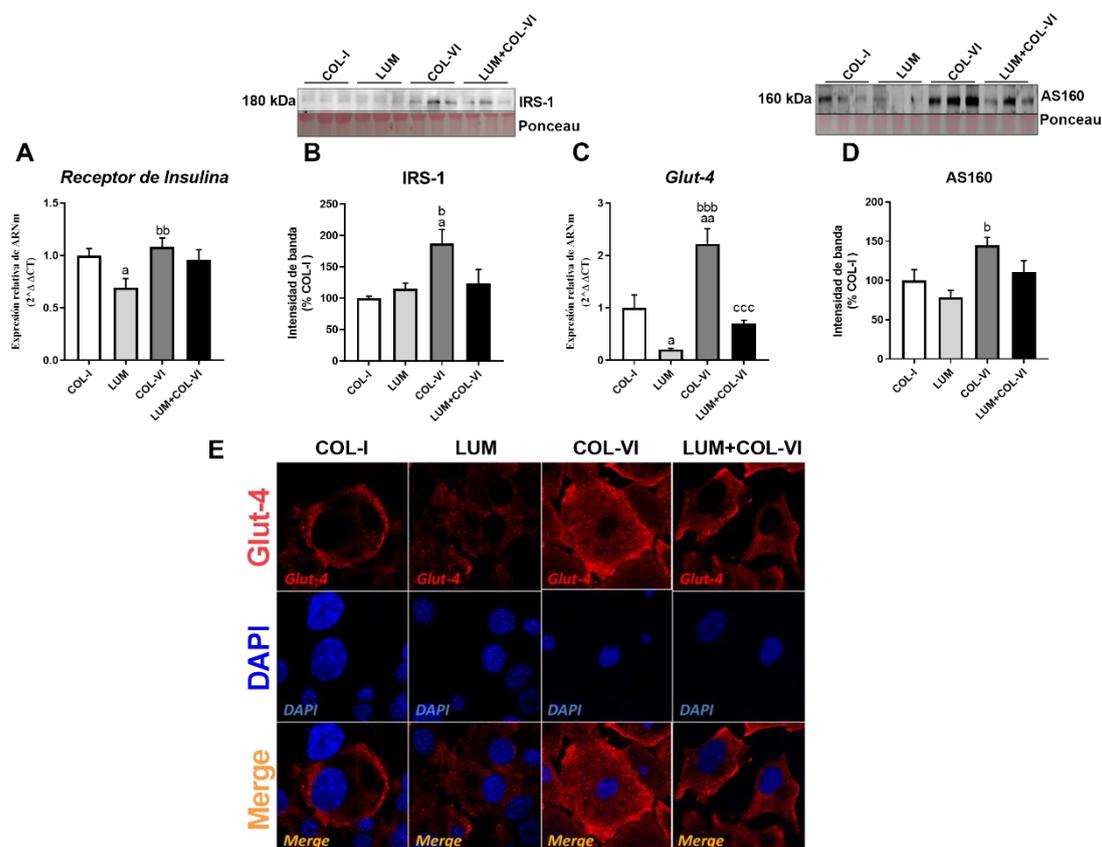


Figura 37. Análisis de la vía de señalización de la insulina en adipocitos 3T3-L1 diferenciados en matrices 3D. (A) Niveles de expresión de ARNm del receptor de insulina; **(B)** contenido proteico e inmunoblot representativo del sustrato del receptor de insulina (IRS), **(C)** niveles de expresión de ARNm de GLUT-4; y **(D)** contenido proteico e inmunoblot representativo de AS160 en adipocitos 3T3-L1 diferenciados en diferenciados en hidrogeles de colágeno I (COL-I) (3,6 mg/mL) solo o en presencia de lumican (LUM; 30 ng/mL), colágeno VI (COL-VI; 36 μg/mL) o la combinación de ambas proteínas (LUM+COL-VI). Los datos representan la media ± SEM (n = 6-12 repeticiones/grupo). Las diferencias estadísticas se evaluaron mediante el análisis ANOVA de un factor para los datos paramétricos y mediante el análisis Kruskal-Wallis para los datos no paramétricos. ^ap<0,05; ^{aa}p<0,01; vs. COL-I, ^bp<0,05; ^{bb}p<0,01vs. LUM, ^{ccc}p<0,001 vs. COL-VI. **(E)** Imágenes representativas de microscopía confocal de adipocitos 3T3-L1 diferenciados en matrices 3D e inmunteñidos para GLUT-4 (rojo). Los núcleos se tiñeron con DAPI (azul).

Para completar el estudio de la ruta de señalización de insulina, se evaluó la respuesta a la insulina de los adipocitos 3T3-L1 cultivados en las distintas matrices 3D (Fig. 38). En esta ruta, la quinasa Akt desempeña un papel clave como mediador de las acciones celulares de la insulina, favoreciendo, entre otros procesos, la incorporación de glucosa en los adipocitos a través de la translocación de GLUT-4 a la superficie celular (Habtemichael, Brewer, Romenskaia, & Mastick, 2011). En este contexto, nuestros experimentos en adipocitos 3T3-L1 mostraron que la insulina promovió un aumento de la cantidad de inmunoseñal para la forma fosforilada de la Akt (p-Akt) tanto en los hidrogeles control (COL-I) como en las matrices que contenían LUM (Fig. 38A y B). De hecho, estos datos son consistentes con el aumento observado en la activación de Akt (ratio p-Akt/Akt total) inducido por insulina en estas células (Fig. 38B). Sin embargo, en los cultivos 3D con COL-VI, solo o combinación con LUM, la insulina no fue capaz de activar la señalización de esta ruta, atendiendo a la falta de efecto sobre p-Akt (Fig. 38A y B). Por su parte, ninguna de las matrices 3D analizadas indujo cambios significativos en el contenido total de la quinasa Akt (Fig. 38B), aunque en las células cultivadas en presencia de LUM, se observó una disminución del 17 % en comparación con los cultivos de COL-I solo (Fig. 38B). Curiosamente, en presencia de LUM, la activación de Akt (ratio p-Akt/Akt total) no parece dirigir la captación de glucosa, ya que este efecto no estuvo acompañado por cambios en la incorporación de glucosa en estas células (Fig. 38C). Por el contrario, la presencia de COL-VI en los cultivos 3D, en los que no se observó la activación de Akt (ratio p-Akt/Akt total) en respuesta a la administración de insulina, indujo un aumento significativo de la captación de glucosa en comparación con los adipocitos cultivados en COL-I, tanto en condiciones basales como tras la estimulación con esta hormona (Fig. 38C).

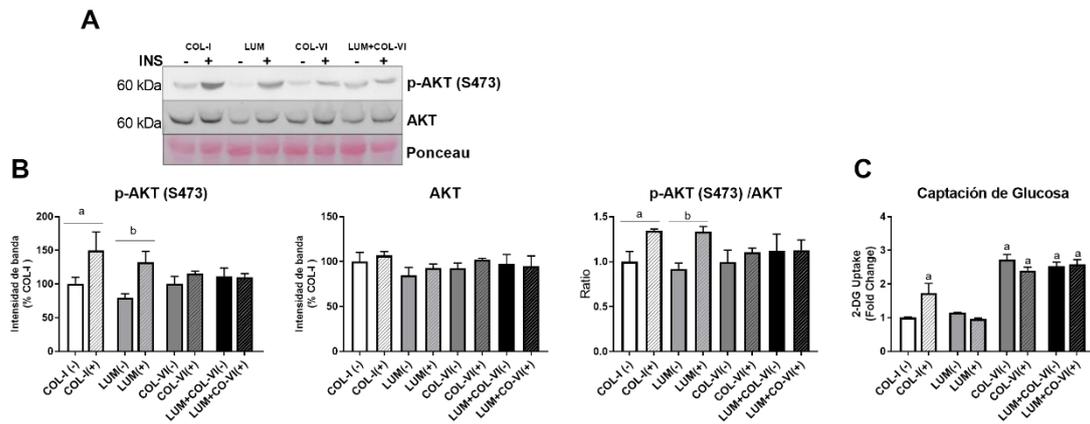


Figura 38. Respuesta a la insulina de los adipocitos 3T3-L1 diferenciados en matrices 3D. Análisis de la respuesta a la insulina de los adipocitos 3T3-L1 diferenciados en hidrogeles de colágeno I (COL-I) (3,6 mg/mL) solo o en presencia de lumican (LUM; 30 ng/mL), colágeno VI (COL-VI; 36 µg/mL) o la combinación de ambas proteínas (LUM+COL-VI) tras la estimulación con 200 nM de insulina (+) vs. condiciones basales (sin insulina (-)). **(A)** Inmunoblot representativo y **(B)** Cuantificación del contenido proteico de p-AKT (S473) (grafica izquierda), AKT (grafica central), y el ratio p-AKT/AKT (grafica derecha). **(C)** Captación de glucosa por parte de las células 3T3-L1 en cultivos 3D. Los datos representan la media ± SEM (n = 3-4 repeticiones/grupo). Las diferencias estadísticas se evaluaron mediante el análisis ANOVA de un factor para los datos paramétricos y mediante el análisis Kruskal-Wallis para los datos no paramétricos. ^ap<0,05 vs. COL-I, ^bp<0,05 vs. LUM.

4.10. Regulación del metabolismo glucídico y lipídico en los adipocitos en matrices 3D

La glucólisis constituye una ruta metabólica fundamental en los adipocitos, ya que, mediante la oxidación de la glucosa, se generan moléculas intermediarias que, entre otros procesos, intervienen en la biosíntesis de ácidos grasos (Cisa-Wieczorek & Hernandez-Alvarez, 2020). En este contexto, nuestros resultados sobre la captación de glucosa, junto con el análisis fosfoproteómico de los adipocitos diferenciados en las distintas matrices 3D, sugerían que tanto LUM como COL-VI, solos o en combinación, podían alterar rutas metabólicas relacionadas con carbohidratos y/o los lípidos en los adipocitos. En esta línea, el análisis de dos enzimas que intervienen en la glucólisis, la fructosa-bisfosfato aldolasa (Aldolasa) y la Glicer aldehído 3-fosfato deshidrogenasa

(GAPDH), mostró una disminución significativa del contenido intracelular de aldolasa (Fig. 39A), así como, una pequeña, aunque no significativa disminución en la expresión génica de GAPDH (Fig. 39B) en los cultivos 3D conteniendo LUM, lo que sugería que este PG podría actuar inhibiendo la ruta glucolítica en estas células. Por el contrario, en los adipocitos cultivados en presencia de COL-VI observamos un aumento significativo de la expresión de GAPDH (Fig. 39B). Por su parte, el contenido de aldolasa fue superior, aunque esta variación no resultó significativa, en comparación con los adipocitos control (COL-I solo), aunque sí se observó un aumento significativo en el contenido de esta enzima cuando lo comparamos con las matrices que contenían LUM (Fig. 39A).

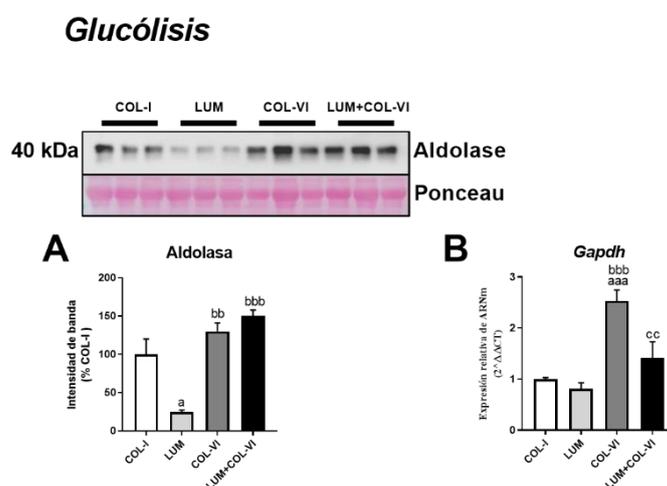


Figura 39. Regulación del metabolismo de glucosa en adipocitos 3T3-L1 diferenciados en matrices 3D. (A) Cuantificación del contenido proteico e inmunoblot representativo de Aldolasa y (B) niveles de ARNm de adipocitos 3T3-L1 diferenciados en hidrogeles de colágeno I (COL-I) (3,6 mg/mL) solo o en presencia de lumican (LUM; 30 ng/mL), colágeno VI (COL-VI; 36 μg/mL) o la combinación de ambas proteínas (LUM+COL-VI). Los datos representan la media ± SEM (n = 3-4 repeticiones/grupo). Las diferencias estadísticas se evaluaron mediante el análisis ANOVA de un factor para los datos paramétricos y mediante el análisis Kruskal-Wallis para los datos no paramétricos. ^ap<0,05; ^{aaa}p<0,001 vs. COL-I, ^bp<0,05; ^{bbb}p<0,001 vs. LUM, ^{cc}p<0,01 vs. COL-VI.

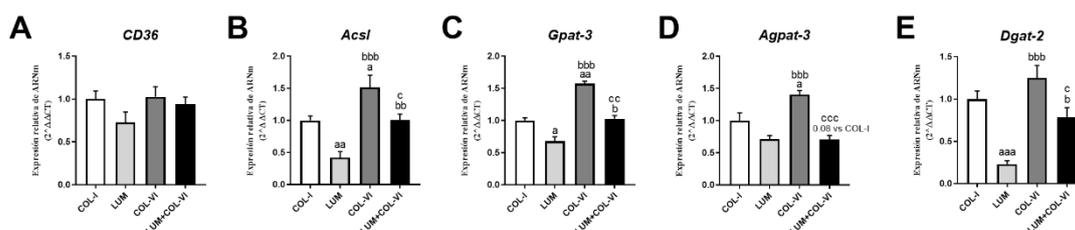
Existen dos rutas bioquímicas que permiten la síntesis y acumulación de lípidos en los adipocitos: la lipogénesis, que conlleva la activación y esterificación de ácidos grasos procedentes del exterior celular para su almacenamiento en forma de triglicéridos (Cisa-Wieczorek & Hernandez-Alvarez, 2020) y la lipogénesis *de novo*,

proceso por el que la célula sintetiza ácidos grasos y otros lípidos a partir del acetil-CoA derivado de carbohidratos, aminoácidos y otras fuentes (Cisa-Wieczorek & Hernandez-Alvarez, 2020). Ambas rutas fueron evaluadas mediante la cuantificación de la expresión génica de moléculas clave de estas rutas en los adipocitos cultivados en las diferentes matrices 3D.

Concretamente, se analizó el transportador de ácidos grasos CD36 y las enzimas lipogénicas Acil-CoA sintetasa (ACSL), Glicerol-3-fosfato acil-transferasa (GPAT-3), Acil-glicerol-fosfato acil-transferasa (AGPAT-3) y Diacilglicerol acil-transferasa (DGAT-2) para evaluar la primera ruta. Como muestra la figura 40, la presencia de LUM en los cultivos 3D provocó una disminución significativa en los niveles de ARNm de ACSL, GPAT-3 y DGAT-2 así como una disminución, aunque no significativa, en el transportador CD36 y en la enzima lipogénica AGPAT-3 (Fig. 40A-E). Por el contrario, todos los componentes de esta ruta lipogénica mostraron niveles de expresión significativamente incrementados en los adipocitos diferenciados en presencia de COL-VI con respecto a los cultivos control (COL-I) y/o conteniendo LUM (Fig. 40A-E). Curiosamente, la combinación de LUM con COL-VI (LUM+COL-VI) restableció los niveles de expresión de todos los marcadores de la ruta lipogénica hasta niveles similares a los observados en las matrices de COL-I (Control) (Fig. 40A-E).

Por su parte, el análisis de las enzimas implicadas en la lipogénesis *de novo* (ATP citrato liasa (ACLY), Acetil-CoA carboxilasa (ACC), y la Ácido graso sintetasa (FAS)), mostró que la presencia de COL-VI solo (COL-VI) o combinado con LUM (LUM+COL-VI) tendía a disminuir, aunque no de forma significativa, la expresión génica de las enzimas que dirigen la síntesis de lípidos por esta ruta en particular (Fig. 40F-H).

Lipogénesis



Lipogénesis De Novo

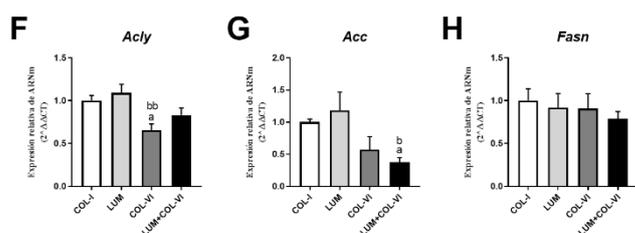


Figura 40. Regulación del metabolismo de los lípidos en adipocitos 3T3-L1 en cultivos 3D. Cuantificación de los niveles de ARNm de adipocitos 3T3-L1 diferenciados en hidrogeles de colágeno I (COL-I) (3,6 mg/mL) solo o en presencia de lumican (LUM; 30 ng/mL), colágeno VI (COL-VI; 36 μg/mL) o la combinación de ambas proteínas (LUM+COL-VI) de genes reguladores de la lipogénesis, **(A)** CD36; **(B)** acil-CoA sintetasa (*Acs1*); **(C)** glicerol-3-fosfato aciltransferasa 3 (*Gpat-3*); **(D)** 1-acilglicerol-3-fosfato O-aciltransferasa 3 (*Agpat-3*); **(E)** diacilglicerol O-aciltransferasa 2 (*Dgat-2*), y de la lipogénesis de novo, **(F)** ATP-citrato sintasa (*Acy1*); **(G)** acetil-CoA carboxilasa (*Acc*); y **(H)** ácido graso sintasa (*Fasn*). Los datos representan la media ± SEM (n = 9-12 repeticiones/grupo). Las diferencias estadísticas se evaluaron mediante el análisis ANOVA de un factor para los datos paramétricos y mediante el análisis Kruskal-Wallis para los datos no paramétricos. ^ap<0,05; ^{aa}p<0,01 vs. COL-I, ^bp<0,05; ^{bb}p<0,01; ^{bbb}p<0,001 vs. LUM; ^cp<0,05; ^{cc}p<0,01; ^{ccc}p<0,001 vs. COL-VI.

4.11. Implicación de los componentes de la matriz extracelular en procesos de mecanotransducción en adipocitos 3T3-L1

El estudio fosfoproteómico puso de manifiesto la existencia de cambios en varias rutas relacionadas con procesos de mecanotransducción en los adipocitos 3T3-L1 en respuesta a cambios en el ambiente extracelular, incluyendo la señalización mediada por el citoesqueleto de actina, la vía de señalización RhoA y la vía de señalización Hippo (Fig. 35). Además, también se observaron diferencias significativas en el grado de fosforilación de la proteína YAP-1 (*Yes-associated protein*), un co-activador

transcripcional implicado, entre otros procesos, en mecanostraducción (Dupont et al., 2011) y de la proteína de la envoltura nuclear, Lamina A, que también está asociada con fenómenos de mecanotransducción a nivel nuclear (Dahl, Ribeiro, & Lammerding, 2008) (Fig. 33).

Por ello, y para profundizar en los mecanismos que regulan las rutas de mecanotransducción de señales desde la ECM hasta el interior de los adipocitos, en primer lugar, se evaluó la distribución intracelular de YAP-1 en las células diferenciadas en las matrices 3D que contenían LUM y/o COL-VI (Fig. 41A). El análisis de los resultados obtenidos mediante microscopía confocal reveló que, en los adipocitos control (COL-I solo), el inmunomarcaje de YAP-1 se localizó principalmente en el citosol (Fig. 41A), mientras que éste se concentró principalmente en el núcleo de los adipocitos que fueron diferenciados en presencia de LUM (Fig. 41A). Estos resultados fueron validados mediante la cuantificación de la inmunoseñal de YAP-1 en ambos compartimentos celulares (citosol y núcleo) (Fig. 41B y C), así como determinando el número de células con localización nuclear de YAP-1 (Fig. 41D). Por su parte, COL-VI disminuyó la señal de inmunofluorescencia de YAP-1 en el citosol de los adipocitos 3T3-L1 (Fig. 41A), mientras que provocó un aumento en la cantidad de YAP-1 nuclear (Fig. 41C), así como de la proporción de células que contenían YAP-1 en el núcleo (Fig. 41D), aunque estos efectos no fueron significativos respecto a los valores observados en el grupo control (COL-I). Curiosamente, también se observó una tendencia, aunque no resultó significativa, a aumentar la localización de YAP-1 en el núcleo de los adipocitos cultivados en presencia de las dos proteínas de la ECM combinadas (LUM+COL-VI) (Fig. 41D).

Dado que se ha propuesto que la vía de señalización Hippo interviene en la translocación de YAP-1 al núcleo, lo que está controlado por su fosforilación en distintos residuos de YAP-1 por la quinasa *Mammalian sterile 20-like kinase 1* (MST-1) (Rausch & Hansen, 2020), evaluamos el contenido total de esta quinasa mediante *western-blot* (Fig. 41E). Como se muestra en la figura 41, LUM disminuyó los niveles intracelulares de MST-1, lo que, junto con el aumento del coactivador transcripcional YAP-1 en el núcleo (Fig. 41C), sugeriría que este PG podría actuar como un regulador negativo de la ruta de señalización Hippo. En los cultivos 3D que contenían COL-VI solo o combinado con LUM, nuevamente observamos un efecto contrario respecto a la regulación de MST-1,

observándose un aumento significativo del contenido total de esta quinasa en comparación tanto con los cultivos control (COL-I), como en comparación con las matrices que contenían solo LUM (Fig. 41E). Estos resultados son consistentes con los datos de nuestro análisis fosfoproteómico, que, junto con los resultados del estudio de microscopía confocal sobre la localización citoplasmática de YAP-1 en presencia de COL-VI (Fig. 41A y B), indican, que, en estas condiciones, la activación de la vía de señalización Hippo podría estar inducida por este colágeno en particular. También se analizó la expresión génica del factor de transcripción de la familia *TEA domain transcription factor* (TEAD1), con el que se asocia YAP-1 cuando se transloca al núcleo (Rausch & Hansen, 2020), si bien no observamos ningún cambio en dicho parámetro en las condiciones testadas con respecto a lo observado en los cultivos 3D que contenían COL-I solo (control) (Fig. 41F).

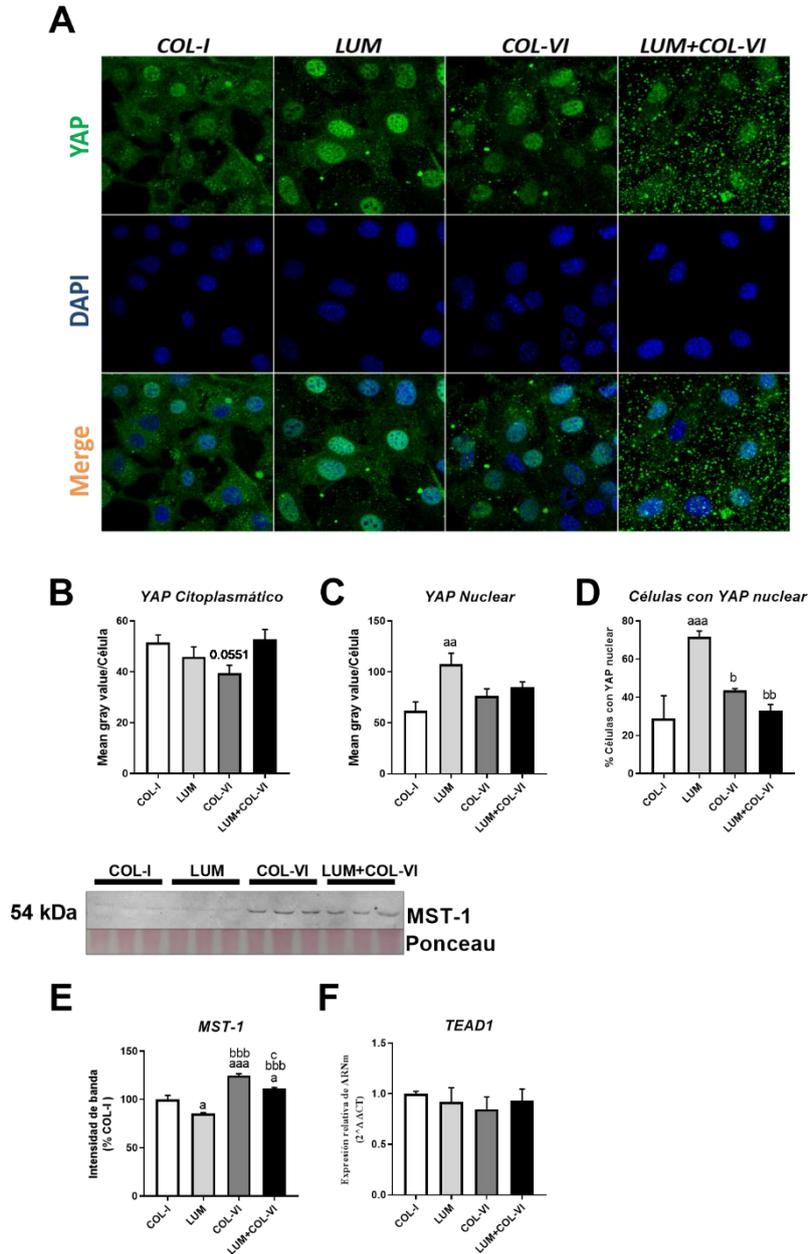


Figura 41. Mecanotransducción en adipocitos 3T3-L1 diferenciados en matrices 3D. (A) Imágenes representativas de microscopía confocal de adipocitos 3T3-L1 diferenciados en hidrogel de colágeno I (COL-I) (3,6 mg/mL) solo o en presencia de lumican (LUM; 30 ng/mL), colágeno VI (COL-VI; 36 µg/mL) o la combinación de ambas proteínas (LUM+COL-VI) e inmunoteñidos con YAP (verde). Los núcleos se tiñeron con DAPI (azul). Se utilizaron micrografías confocales ($n = 10$ células/grupo) para la cuantificación de (B) YAP citoplasmático, (C) YAP nuclear y (C) número de celular con núcleos inmunomarcados con YAP. (E) Contenido proteico e inmunoblot representativo de MST-1 en extractos de células 3T3-L1, y (F) niveles de expresión de ARNm de TEAD1. Los datos representan la media \pm SEM ($n = 3$ repeticiones/grupo). Las diferencias estadísticas se evaluaron mediante el análisis ANOVA de un factor para los datos paramétricos y mediante el análisis Kruskal-Wallis para los datos no paramétricos. ^a $p < 0,05$; ^{aa} $p < 0,01$; ^{aaa} $p < 0,001$ vs. COL-I, ^b $p < 0,05$; ^{bb} $p < 0,01$; ^{bbb} $p < 0,001$ vs. LUM; ^c $p < 0,05$; vs. COL-VI.

También se estudió tanto la distribución intracelular como los niveles de expresión de la proteína de la envoltura nuclear Lamina A, que actúa como proteína mecanosensora en respuesta al estrés mecánico (Cho et al., 2019). Como se puede observar en la figura 42, los adipocitos 3T3-L1 cultivados en presencia de LUM exhibieron una inmunoseñal más intensa, así como niveles de expresión génica significativamente mayores para esta proteína nuclear en comparación con las células control (COL-I) (Fig. 42A y B). Curiosamente, estos efectos no se detectaron en los adipocitos diferenciados en las matrices ricas en COL-VI solo o combinado con LUM, que presentaron características similares a las encontradas en los adipocitos cultivados en las condiciones control (COL-I) (Fig. 42A y B).

Adicionalmente, se realizó un análisis de la morfología de los núcleos de los adipocitos 3T3-L1 en respuesta a los distintos componentes de los cultivos 3D empleados (LUM, COL-VI, LUM+COL-VI). Para ello, se marcaron los núcleos con la tinción de DAPI, se determinaron los contornos de los núcleos utilizando el *software ImageJ* y se clasificaron utilizando el parámetro de circularidad ($4 * \pi * \text{área} / \text{perímetro}^2$), estableciendo cuatro intervalos en el rango entre 0 y 1 ($\geq 0,35-0,6$; $\geq 0,6-0,7$; $\geq 0,7-0,8$; $\geq 0,8- <1,0$) (Schochlin et al., 2014). En este análisis, se observó un cambio importante en la forma de los núcleos de los adipocitos cultivados en las matrices 3D ricas en LUM. De esta manera, solo el 35,7 % de los adipocitos diferenciados en presencia de este PG mostraron valores de circularidad cercanos a 1. Un porcentaje similar de células (30,6 %) contenían núcleos ovalados, correspondientes a valores de circularidad $< 0,7$ (Fig. 42C). Por el contrario, las células con núcleos más redondeados, que además presentaron valores de circularidad $> 0,7$, se encontraron predominantemente en los cultivos 3D que contenían COL-VI solo (67,9%) o combinado con LUM (59,3%) en comparación con las matrices control (COL-I) (51,4 %) (Fig. 42C).

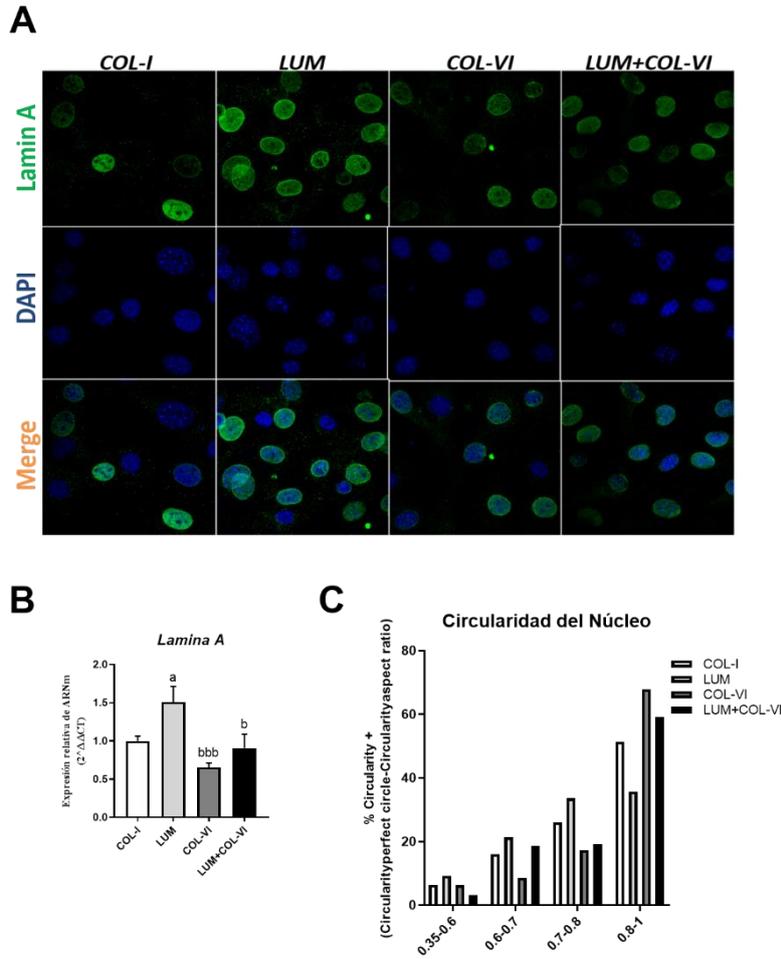


Figura 42. Efectos de la mecanotransducción en adipocitos 3T3-L1 diferenciados en matrices 3D. (A) Imágenes representativas de microscopía confocal de adipocitos 3T3-L1 diferenciados en hidrogeles de colágeno I (COL-I) (3,6 mg/mL) solo o en presencia de lumican (LUM; 30 ng/mL), colágeno VI (COL-VI; 36 μg/mL) o la combinación de ambas proteínas (LUM+COL-VI) e inmunoteñidos con Lamina A (verde). Los núcleos se tiñeron con DAPI (azul). **(A)** Niveles de expresión de ARNm de Lamin A en células 3T3-L1 diferenciadas en cultivo 3D. Los datos representan la media ± SEM (n = 12 repeticiones/grupo). Se emplearon micrografías confocales (n = 10 células/grupo) para la cuantificación de **(C)** la redondez nuclear representada como % de circularidad. Los datos representan la media ± SEM (n = 3 repeticiones/grupo). Las diferencias estadísticas se evaluaron mediante el análisis ANOVA de un factor para los datos paramétricos y mediante el análisis Kruskal-Wallis para los datos no paramétricos. ^ap<0,05; vs. COL-I, ^bp<0,05; ^{bbb}p<0,001 vs. LUM.

Así, en conjunto podemos sugerir que LUM ejerce un efecto inhibitorio sobre la vía Hippo, mientras que COL-VI ejercería un efecto activador, evidenciando nuevos mecanismos que podrían ayudar a explicar los efectos opuestos que muestran estos componentes de la ECM sobre la función del adipocito.

4.12. Señalización mediada por lumican y colágeno VI en adipocitos

Finalmente, se estudió la señalización mediada por β -Integrina, un receptor de membrana que conecta la matriz con el entorno celular (Bonnans et al., 2014) y que, además, actúa como molécula mecanosensora de la ruta Hippo, regulando la translocación de YAP/TAZ (Rausch & Hansen, 2020). Curiosamente, se observó que solo en los cultivos 3D de células 3T3-L1 que contenían LUM, la expresión de β -Integrina estaba modificada, en concreto aumentada, con respecto a las condiciones control (Fig. 43A).

En estas condiciones, se evaluó la respuesta celular potencialmente transmitida al interior celular vía β -Integrina, mediante el análisis de mediadores intracelulares específicos relacionados con integrinas: Akt, FAK (*Focal Adhesion Kinase*) y ERK (*Extracellular Signal-regulated Kinases*) (Brezillon et al., 2013). Para ello, se diferenciaron adipocitos 3T3-L1 en cultivos convencionales (2D) y se bloqueó el receptor β -Integrina mediante la preincubación de las células con un anticuerpo bloqueante anti- β -Integrina, estimulando posteriormente las células con LUM o COL-VI durante 15 min (ver sección 3.5.6). Como se muestra en la figura 43, la exposición de las células al anticuerpo bloqueante no modificó los niveles de fosforilación basales de ninguna de las proteínas estudiadas (Fig. 43B-D). Por su parte, la administración de LUM en condiciones control (en presencia de IgGs no bloqueantes) indujo un incremento significativo en el grado de fosforilación de FAK y Akt (Fig. 43B y C), lo que resultó en un aumento del ratio (proteína fosforilada/proteína total) en dichas condiciones con respecto a la condición control (Fig. 43B y C). Notablemente, los efectos de LUM sobre FAK y p-FAK/FAK se revirtieron cuando los adipocitos 3T3-L1 habían sido expuestos al antisuero anti- β -Integrina (Fig. 43B y C), lo que no se observó para Akt. No se observó ningún efecto de LUM sobre la activación

de ERK, tanto en condiciones control como tras la incubación con anticuerpos anti- β -integrina (Fig. 43D).

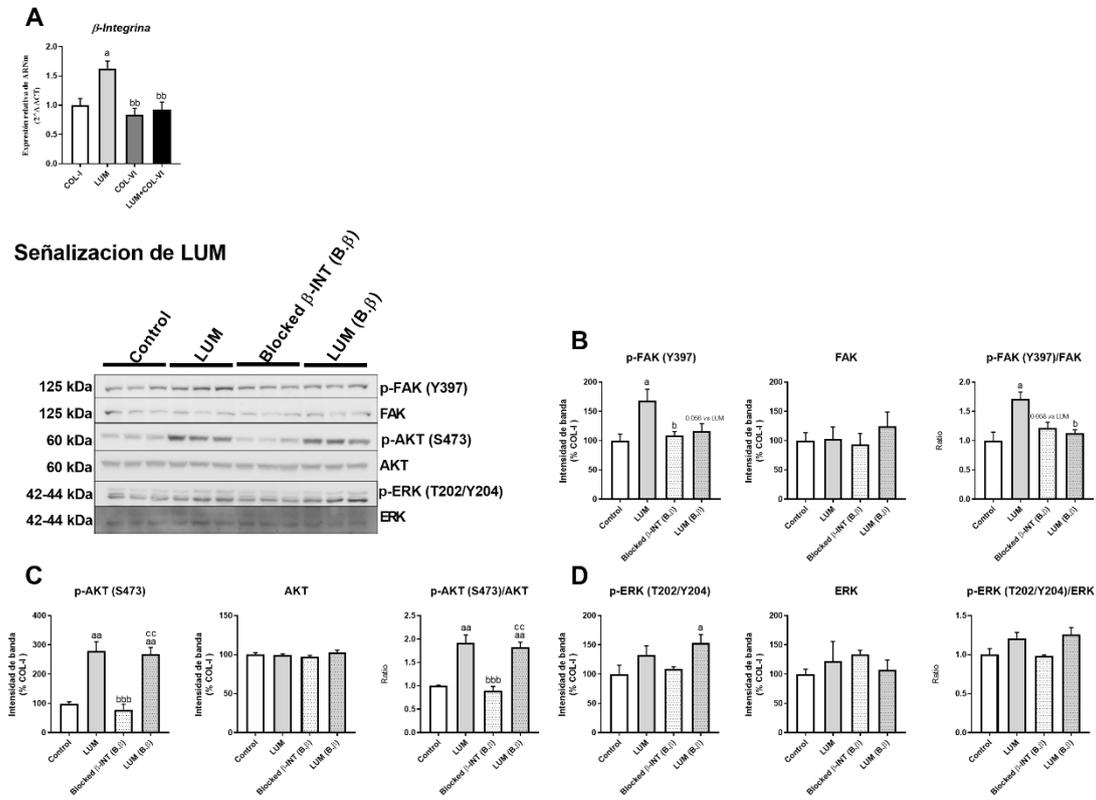


Figura 43. Rutas de señalización activadas por Lumican (LUM) a través de β -integrina en adipocitos 3T3-L1. (A) Cuantificación de los niveles de ARNm de β -integrina en adipocitos 3T3-L1 diferenciados en hidrogeles de colágeno I (COL-I) (3,6 mg/mL) solo o en presencia de lumican (LUM; 30 ng/mL), colágeno VI (COL-VI; 36 μ g/mL) o la combinación de ambas proteínas (LUM+COL-VI). (B-D) Inmunoblot representativo y análisis de señalización activada por LUM en adipocitos 3T3-L1 tras el bloqueo del receptor β -integrina con anticuerpos neutralizantes. Los adipocitos 3T3-L1 se diferenciaron en cultivos convencionales (2D) y se incubaron con un anticuerpo neutralizante de β -integrina o IgG (control) (5 μ g/mL, 1 h, 37 $^{\circ}$ C) y se expusieron a LUM (30 ng/mL), durante 15 min a 37 $^{\circ}$ C. Los extractos proteicos se analizaron para: (B) Contenido proteico de p-FAK, FAK y el ratio p-FAK/FAK, (C) p-AKT, AKT y el ratio p-AKT/AKT y (D) p-ERK, ERK y el ratio p-ERK/ERK. Los datos representan la media \pm SEM (n = 3 repeticiones/grupo). Las diferencias estadísticas se evaluaron mediante el análisis ANOVA de un factor para los datos paramétricos y mediante el análisis Kruskal-Wallis para los datos no paramétricos. ^ap<0,05; ^{aa}p<0,01 vs. control, ^bp<0,05; ^{bbb}p<0,001 vs. LUM; ^{cc}p<0,01 vs. β 1 integrina bloqueada.

De forma similar, estudiamos la fosforilación de FAK, Akt y ERK en adipocitos 3T3-L1 tras la exposición a COL-VI durante 15 min (Fig. 44). A diferencia de lo observado para LUM, el tratamiento con COL-VI solo incrementó significativamente el grado de fosforilación de ERK, así como el ratio p-ERK/ERK (Fig. 44C). Dicho efecto se bloqueó cuando las células fueron tratadas previamente con el antisuero anti- β -Integrina (Fig. 35C), lo que indica que la activación de ERK por parte de COL-VI podría ocurrir vía β -integrina. No se observaron cambios en la fosforilación de FAK o Akt en respuesta a COL-VI en las condiciones experimentales testadas (Fig. 44A y B).

Señalización de COL-VI

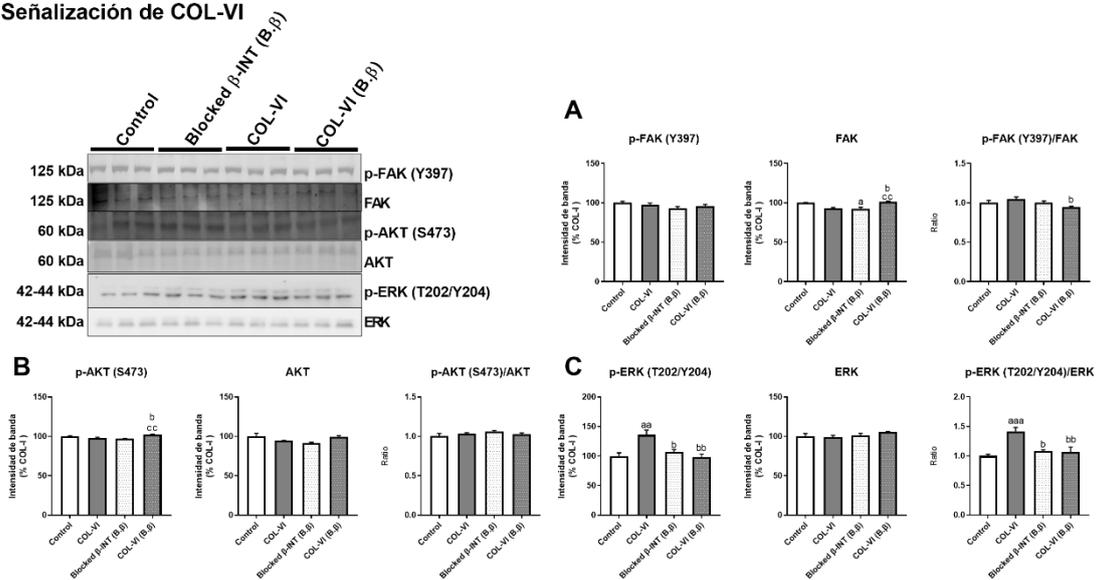


Figura 44. Rutas de señalización activadas por colágeno VI a través de β -integrina en adipocitos 3T3-L1.

(A-C) Inmunoblot representativo y análisis de señalización activada por colágeno VI (COL-VI) en adipocitos 3T3-L1 tras el bloqueo del receptor β -integrina con anticuerpos neutralizantes. Los adipocitos 3T3-L1 se diferenciaron en cultivos convencionales (2D) y se incubaron con un anticuerpo neutralizante de β -integrina o IgG (control) (5 μ g/mL, 1 h, 37 $^{\circ}$ C) y se expusieron a COL-VI (36 μ g/mL), durante 15 min a 37 $^{\circ}$ C. Los extractos proteicos se analizaron para: (A) Contenido proteico de p-FAK, FAK y el ratio p-FAK/FAK, (B) p-AKT, AKT y el ratio p-AKT/AKT y (C) p-ERK, ERK y el ratio p-ERK/ERK. Los datos representan la media \pm SEM (n = 3 repeticiones/grupo). Las diferencias estadísticas se evaluaron mediante el análisis ANOVA de un factor para los datos paramétricos y mediante el análisis Kruskal-Wallis para los datos no paramétricos. ^ap<0,05; ^{aa}p<0,01; ^{aaa}p<0,001 vs. control, ^bp<0,05; ^{bb}p<0,01 vs. COL-VI; ^{cc}p<0,01 vs. β 1 integrina bloqueada.

En conjunto nuestros resultados evidencian la importancia de analizar la composición de la matriz extracelular que rodea a los adipocitos. En concreto, LUM y COL-VI ejercen efectos opuestos sobre la diferenciación celular, la captación de glucosa y el metabolismo lipídico y glucídico de los adipocitos, aun cuando ambas proteínas, en exceso, inducen resistencia a insulina en estas células.

Discusión

Capítulo 1. Caracterización de las señales extracelulares e intracelulares específicas de los depósitos subcutáneo y omental del tejido adiposo que contribuyen a la insulinoresistencia en individuos con obesidad.

La matriz extracelular (ECM) juega un papel fundamental en la homeostasis de los tejidos y órganos, proporcionándoles integridad y elasticidad, además de servir de soporte para el desarrollo y mantenimiento de éstos mediante la regulación de la concentración de factores de crecimiento, el nivel de hidratación y el pH del entorno celular (Bonnans et al., 2014; Mouw et al., 2014). La ECM es una estructura altamente dinámica que es constantemente remodelada en respuesta al estado de sus componentes celulares y del ambiente extracelular. A su vez, las propiedades bioquímicas y biofísicas de la ECM determinan el comportamiento de las células específicas que componen los diferentes tejidos (Bonnans et al., 2014; Mouw et al., 2014). En esta línea, la deposición excesiva de ECM y/o la alteración en el equilibrio entre sus componentes, que cambia la arquitectura de los tejidos y conduce a su disfunción, se ha asociado al desarrollo de muchas enfermedades crónicas (Agarwal, 2014).

Cada tejido u órgano tiene una ECM con una composición única que contribuye a definir su función específica (Bonnans et al., 2014). El tejido adiposo, como otros tejidos, presenta varios tipos de colágeno, predominando en este caso los colágenos I (COL-I), IV y VI (COL-VI), aunque sus cantidades relativas varían durante el crecimiento del tejido, así como en función del depósito de grasa (tejido adiposo subcutáneo (SC) y omental (OM)). Otros componentes habituales de la ECM del tejido adiposo son laminina, fibronectina y diversos proteoglicanos (PGs) (Divoux et al., 2010; Pellegrinelli et al., 2016). En condiciones de sobrenutrición crónica, el tejido adiposo sufre un importante proceso de remodelación, que se transforma en patológica cuando se llega al estado obeso (Marcelin et al., 2017). De hecho, está aceptado que, en individuos con obesidad, se acumula un exceso de ECM y la fibrosis subsecuente se ha asociado a los cambios patológicos en la función metabólica y endocrina que ocurren en dicho tejido y que se propone que contribuyen al desarrollo de las comorbilidades asociadas al exceso de grasa corporal (Pellegrinelli et al., 2016). En este sentido, el análisis histológico realizado en este estudio nos ha permitido demostrar que se produce una acumulación anómala de componentes de la ECM en el tejido adiposo SC y OM de individuos con

obesidad y enfermedad metabólica. En línea con estas observaciones microscópicas, mediante estudios de expresión hemos demostrado que la transición del estado de normoglucemia (NG) a insulinoresistencia (IR) en las personas con obesidad se asocia con una mayor acumulación de colágenos en el tejido adiposo. En esta línea, en estudios previos se ha descrito que se produce un aumento del contenido total de colágenos en el tejido adiposo de individuos con obesidad respecto a individuos delgados (Divoux et al., 2010; Guzman-Ruiz et al., 2020). Concretamente, se ha establecido que, tanto en humanos como en modelos animales, la obesidad lleva consigo fundamentalmente un aumento de la producción de COL-I y COL-VI así como cambios en la concentración de otras proteínas de la ECM como fibronectina o laminina (Divoux et al., 2010). No obstante, también existen publicaciones que proponen que ocurre una disminución en la deposición de estos componentes de la ECM, en ambos depósitos, en pacientes con obesidad y diabetes tipo 2 (T2D), en comparación con pacientes con obesidad sin enfermedad metabólica (Muir et al., 2016).

Por otra parte, y continuando con los cambios que se producen en la ECM en el tejido adiposo durante la obesidad, recientemente se ha demostrado, que, además del contenido total de colágenos, otros parámetros como la distribución y organización de estos colágenos, que son específicos de los distintos depósitos, pueden contribuir a los mecanismos patogénicos asociados a la fibrosis (Crewe et al., 2017; Wernstedt Asterholm & Scherer, 2016). En esta Tesis Doctoral hemos observado que los individuos con obesidad e IR exhiben un aumento de la fibrosis pericelular en los adipocitos del tejido adiposo OM en comparación con individuos NG, mientras que no se observaron diferencias en el tamaño de los adipocitos, lo que sugiere que la acumulación de colágeno en la zona pericelular podría limitar la expansión de los adipocitos del depósito OM. De hecho, se ha propuesto que la fibrosis del tejido adiposo OM podría contribuir a mantener la homeostasis de los adipocitos restringiendo la hipertrofia celular, ya que se considera que esto podría prevenir la disfunción celular inducida por la acumulación excesiva de lípidos (Muir et al., 2016). Sin embargo, en contraste con esta propuesta, estudios previos realizados en nuestro grupo de investigación muestran que los adipocitos del tejido adiposo OM de individuos con obesidad e IR presentan una menor capacidad para responder al daño oxidativo, así como al exceso de actividad del retículo

endoplásmico (i.e., estrés del retículo) que ocurren en la obesidad que los individuos con IR (Díaz-Ruiz et al., 2015). Los procesos de estrés celular descritos, que concurren con la disfunción del proteasoma, producen la acumulación de proteínas oxidadas y/o mal plegadas en las células de dichos pacientes, dando lugar a fenómenos de proteotoxicidad celular (Díaz-Ruiz et al., 2015). En definitiva, a pesar de mantener un tamaño similar a los adipocitos de pacientes con obesidad pero normoglucémicos, los adipocitos en obesidad e IR muestran rasgos indicativos de un mayor grado de disfuncionalidad. En este contexto, cabría la posibilidad de que la disfuncionalidad de los adipocitos del tejido adiposo OM de individuos con obesidad e IR esté asociada a un entorno local en el que se produce un aumento de la rigidez de la ECM. Estas observaciones están respaldadas por los resultados obtenidos en nuestro estudio sobre β -integrina, que demostraban niveles más elevados de esta proteína en el tejido adiposo OM de pacientes con obesidad e IR. En línea con esto, un estudio previo ha demostrado que el aumento de las quinasas ligadas a integrinas en adipocitos del tejido adiposo OM de pacientes obesos e IR, se asocia a una mayor rigidez de la ECM, un proceso que estaría mediado por la traducción de señales que dirigen las fuerzas de tensión en el tejido (Vakaloglou, Chrysanthis, Rapsomaniki, Lygerou, & Zervas, 2016). Estas observaciones, junto con nuestros resultados sobre β -integrina, sugieren que el anclaje de los adipocitos a la ECM y la mecanotransducción de señales al interior celular podrían estar alterados en el tejido adiposo OM de los individuos con obesidad e IR, lo que, a su vez, apoya la idea de que la alteración de la interacción células-ECM en el tejido adiposo contribuye a las complicaciones metabólicas asociadas a la obesidad. Curiosamente, de forma contraria, nuestros datos sobre β -integrina en el tejido adiposo SC indicaban la existencia de niveles disminuidos de este receptor de membrana en pacientes con obesidad e IR en comparación con los individuos NG. De manera similar, se ha descrito que la regulación negativa de β -integrina provoca el desarrollo de IR en músculo esquelético de ratones obesos debido a la pérdida de la fosforilación inducida por la insulina de la quinasa Akt en el residuo Ser473 (Zong et al., 2009). Estas observaciones están de acuerdo con nuestros datos indicativos de la disminución de la activación de la señalización de Akt (i.e., disminución del ratio pAkt(Ser473)/Akt) en el tejido adiposo SC de sujetos con obesidad e IR. Teniendo en cuenta estos resultados, parece razonable proponer que la acumulación excesiva de lípidos y la expansión de los adipocitos del tejido adiposo SC

pueden ser tan perjudiciales como la restricción del crecimiento de los adipocitos del tejido adiposo OM en individuos con obesidad e IR, dado que los adipocitos del tejido adiposo SC son más grandes (según el presente estudio) y muestran niveles más altos de marcadores de estrés celular (inflamatorio, oxidativo y de retículo endoplásmico) en comparación con los individuos con obesidad sin IR (individuos NG) (Diaz-Ruiz et al., 2015).

Estos hallazgos apoyan la idea de que la arquitectura de la ECM influye de manera fundamental en la función de los adipocitos y contribuye al mantenimiento de la homeostasis celular. Respecto a los PGs, que cumplen importantes funciones en el mantenimiento de la arquitectura y función de la ECM (Brezillon et al., 2013; Mouw et al., 2014), se ha descrito que, dentro de la familia de los proteoglicanos de bajo peso molecular ricos en leucina (SLRPs), el lumican (LUM) está aumentado en el tejido adiposo SC de individuos con obesidad y síndrome metabólico en comparación con individuos delgados (Vila et al., 2014) y en la grasa gonadal de ratones con obesidad inducida por una dieta alta en grasa (HFD) (Wolff et al., 2019). En esta misma línea, nuestros estudios han demostrado que, en pacientes con obesidad, los niveles de esta proteína en el depósito SC son más altos en aquellos que presentan IR respecto a individuos NG con índice de masa corporal (IMC) comparables. Sin embargo, el contenido de LUM fue menor en el tejido adiposo OM de individuos con obesidad y NG respecto a lo observado en pacientes con obesidad e IR, e incluso en comparación con sujetos delgados (Guzman-Ruiz et al., 2020). El conjunto de todas estas observaciones permite sugerir que la producción de LUM puede ser regulada de forma diferencial y específica, independientemente de la especie, a nivel de depósito de grasa.

5.1. Regulación de la producción de lumican en respuesta a estímulos obesogénicos

Nuestros estudios de diferenciación de las células 3T3-L1, que son de tipo fibroblástico pero que, en presencia de una combinación específica de hormonas, se diferencian a adipocitos (Rutkowski et al., 2015), han permitido descubrir información original sobre los mecanismos que subyacen a la acumulación anormal de este PG en el tejido adiposo SC de pacientes con obesidad e IR. En este escenario, observamos que el contenido de LUM (37 kDa) aumenta fundamentalmente cuando las células comienzan a adquirir un fenotipo adiposo (i.e., acumulación de lípidos), alcanzando valores máximos en células diferenciadas. De hecho, atendiendo a los datos observados sobre contenido intracelular y secreción de LUM, las células adiposas en estadios más diferenciados (adipocitos maduros, D9) son las principales productoras de este PG (vs. células indiferenciadas, D0). Más aún, los adipocitos aumentan su capacidad de secreción de este PG cuando se exponen, *in vitro*, a altas concentraciones de glucosa e insulina, que, de hecho, simulan el ambiente que caracteriza a los pacientes en los que observamos previamente niveles elevados de LUM (tejido adiposo SC de individuos con obesidad e IR). El conjunto de estas observaciones nos permite sugerir que las condiciones de hiperglucemia e hiperinsulinemia normalmente asociadas a obesidad podrían contribuir a la inducción de la producción de LUM por parte de los adipocitos y, con ello, al aumento de la concentración local de este PG en la ECM del tejido adiposo. No obstante, como se ha indicado anteriormente, el tejido adiposo OM de los pacientes con obesidad e IR no observamos niveles elevados de LUM en comparación con el mismo depósito graso de los individuos con obesidad y NG, sino que, por el contrario, presentaron una tendencia a disminuir. Estos datos indican que existe una regulación diferencial de la producción de LUM que es dependiente de depósito graso, pero independiente de los estímulos metabólicos producidos por el ambiente de hiperglucemia/hiperinsulinemia, sugiriendo la existencia de varias vías de control de la producción de LUM en el tejido adiposo en condiciones de obesidad.

5.2. Impacto de los cambios en la matriz extracelular sobre los adipocitos en condiciones de obesidad

Uno de los objetivos específicos que persiguió este trabajo fue esclarecer la función de LUM en la ECM y el análisis de la fisiología celular del adipocito en respuesta a cambios en este componente extracelular. En condiciones fisiológicas, entre otras funciones, LUM es fundamental para la correcta formación de las fibrillas de colágeno, ya que regula su tasa de crecimiento, tamaño y morfología (Chakravarti et al., 1998; Mouw et al., 2014). El proceso de ensamblaje del COL-I, que representa el principal colágeno fibrilar de los tejidos (incluido el tejido adiposo), comienza con la síntesis y unión de trímeros de procolágeno que, una vez secretados al exterior celular, son procesados (pérdida de extremos N- y C- terminal) y las moléculas de colágeno resultantes se autoensamblan en estructuras de mayor complejidad, las fibrillas de colágeno (10-300 nm) (Mouw et al., 2014). En éstas, las moléculas de colágeno se mantienen unidas gracias a enlaces covalentes entre residuos Lys, dando lugar a un patrón organizado y escalonado responsable de la típica estriación periódica (cada 67 nm) de las fibrillas de colágeno (Mouw et al., 2014).

Sobre la base de esta información, decidimos investigar la influencia del LUM en células cultivadas en matrices de COL-I. Para ello, en primer lugar, pusimos a punto un sistema de cultivo tridimensional (3D) mediante el uso de matrices de COL-I, para reproducir, al menos en parte, las condiciones fisiológicas (Pope, Warren, Parker, & Cowan, 2016). Concretamente, se realizó una búsqueda bibliográfica de cultivos celulares 3D basados en COL-I de varios tipos celulares, incluidos fibroblastos, y coincidían en el uso de concentraciones en torno a 3 mg/mL (Doyle, 2016; Doyle, Carvajal, Jin, Matsumoto, & Yamada, 2015), lo que está en consonancia con la concentración usada en nuestros estudios (3.6 mg/mL). No obstante, ensayamos diferentes concentraciones de COL-I y de preparación de la solución de la matriz, consiguiendo desarrollar y optimizar el protocolo de cultivo 3D que se ha descrito en la sección de materiales y métodos (ver sección 3.2.2) de esta Tesis Doctoral y que hemos utilizado para nuestros trabajos. Según las imágenes obtenidas mediante microscopía electrónica de barrido de los cultivos 3D generados, las células quedaban perfectamente

embebidas en una red de fibrillas de COL-I que mostraban su estriación transversal característica. Adicionalmente, las imágenes obtenidas de los cultivos mediante microscopio invertido o tras la tinción con *Nile Red* y observación con microscopía confocal demostraban que las células 3T3-L1 se diferenciaban de forma correcta [i.e., acumulan lípidos en LDs] de forma progresiva a lo largo de la diferenciación en las matrices 3D de COL-I utilizadas. En relación con cultivos paralelos de células 3T3-L1 en formato 2D, la diferenciación de los adipocitos en el sistema 3D es básicamente idéntica, aunque se observa un cierto retraso en la aparición de las primeras LDs (D3 en cultivos 2D, D5 en cultivos 3D), de manera que para todos los estudios de diferenciación a término llevados a cabo en cultivos 3D, las células se mantuvieron hasta el D10 de diferenciación.

Una vez optimizado el método de cultivo 3D para células 3T3-L1, procedimos a investigar la influencia del LUM sobre la arquitectura de la ECM y su repercusión sobre la adipogénesis, así como sobre la morfología y función de los adipocitos diferenciados en dichos cultivos. Seleccionamos dos dosis de LUM (10-30 ng/mL) sobre la base de resultados publicados en ensayos con otros modelos celulares (Yamamoto, Matsuda, Kawahara, Ishiwata, & Naito, 2012), algunos de los cuales señalaban la dosis menor testada como la concentración existente en los tejidos (D. Chen et al., 2020; Svensson, Narlid, & Oldberg, 2000). Curiosamente, la observación de los cultivos 3D durante la diferenciación puso de manifiesto la existencia de diferencias entre, por una parte, los cultivos de COL-I sin LUM o con LUM a una concentración de 10 ng/mL y, por otra, los cultivos 3D con LUM 30 ng/mL. De esta forma, los adipocitos acumulaban LDs y adquirirían una morfología redondeada de forma progresiva en las dos primeras condiciones, mientras que los expuestos a LUM 30 ng/mL mostraron un retraso en el proceso de diferenciación, de manera que, incluso a día 10, mantenían una forma alargada y contenían pocas LDs y de menor tamaño que en los cultivos no tratados o expuestos a bajas dosis de LUM. Estos resultados indican que la dosis más alta empleada de LUM resulta nociva para el desarrollo normal de los adipocitos y sugieren que la adipogénesis se puede ver comprometida en condiciones de exceso de este PG. De hecho, observamos una disminución en la expresión génica de los factores de transcripción responsables de la expresión de los factores adipogénicos que inducen la diferenciación de los

fibroblastos a adipocitos, C/EBP α y PPAR γ (Rutkowski et al., 2015), en los extractos celulares de los cultivos 3D que contenían LUM respecto a las matrices control (con COL-I solo). Atendiendo a estas observaciones, se podría especular que la disfunción observada en la diferenciación de los adipocitos cultivados en matrices 3D ricas en LUM podría deberse a un efecto de este PG sobre el ensamblaje del COL-I presente en la matriz. Para abordar esta hipótesis, llevamos a cabo estudios de fibrillogénesis, que mostraron que LUM 30 ng/mL inducía una dinámica de polimerización de COL-I distinta de la observada en condiciones control y, curiosamente, también a bajas concentraciones de este PG. Más aún, el estudio morfométrico de las fibrillas de colágeno en los cultivos 3D mostró que la presencia de LUM 30 ng/mL alteraba la organización de las fibrillas. Concretamente, en los cultivos 3D con LUM a alta concentración, observamos que se formaba una red de fibrillas de mayor diámetro junto con una reducción del espaciado entre las fibrillas. Notablemente, estos cambios estructurales se acompañaron de una mayor resistencia a las fuerzas de compresión por parte de las matrices 3D con LUM 30 ng/mL. Estos resultados están en línea con estudios previos *in vitro* (sin células) que muestran que el aumento de la concentración de LUM relativa a la de colágeno altera el espaciado de las fibrillas (Stamov et al., 2013). En estas condiciones, es previsible que la organización de las fibrillas observada con LUM 30 ng/mL se acompañe de un aumento de la rigidez de la matriz. Este fenómeno de aumento de rigidez de la ECM se ha descrito que ocurre en la ECM en condiciones de fibrosis (Wernig et al., 2017), un proceso que, como se ha indicado a lo largo de esta Tesis Doctoral, caracteriza al tejido adiposo en condiciones de obesidad (Henegar et al., 2008; Sun et al., 2011). En esta línea, se ha demostrado que la aplicación de fuerzas compresivas sobre los preadipocitos inhibe el proceso de adipogénesis (Pope et al., 2016).

Además de alterar la adipogénesis, LUM 30 ng/mL también provocó cambios importantes en los adipocitos diferenciados en los cultivos 3D. Así, nuestros resultados *de western blot* muestran que, en comparación con los cultivos 3D con COL-I solo, las células diferenciadas en los geles 3D que contenían LUM a alta concentración mostraron signos de estrés del retículo endoplásmico, lo que se ha asociado con la disfunción de los adipocitos, incluyendo un aumento de la lipólisis (Rutkowski et al., 2015). Esto podría

justificar la presencia de LDs de pequeño tamaño en las células expuestas a LUM 30 ng/mL. Además, observamos que los adipocitos cultivados en matrices 3D ricas en LUM presentaban una menor capacidad secretora de adiponectina, una adipoquina que se ha demostrado que es secretada fundamentalmente por los adipocitos diferenciados (Fain, Madan, Hiler, Cheema, & Bahouth, 2004). Curiosamente, los niveles circulantes de adiponectina, que tiene propiedades insulino-sensibilizantes y antiinflamatorias y es producida en mayor proporción por el tejido adiposo SC comparado con el OM (Esfahani, Movahedian, Baranchi, & Goodarzi, 2015), disminuyen en condiciones de obesidad e IR (Chandran, Phillips, Ciaraldi, & Henry, 2003). Teniendo en cuenta nuestros resultados, cabe la posibilidad de que el aumento de LUM en el tejido adiposo SC de individuos con obesidad e IR pudiera contribuir a la disminución de la producción de adiponectina característica de estos pacientes. En un estudio reciente se ha demostrado que el aumento de la expresión de LUM en el tejido adiposo gonadal de ratones inducía una ganancia moderada de tejido adiposo en respuesta a una HFD, pero, curiosamente, mejoraba la sensibilidad periférica a la insulina (Wolff et al., 2019). Por otra parte, nuestras observaciones en tejido adiposo SC sugieren un papel patogénico potencial para LUM cuando este PG se produce por encima de los niveles normales. Las discrepancias entre el modelo murino y nuestras observaciones en humano podrían explicarse por la existencia de diferencias tanto de especie como de depósito graso. Es importante resaltar que, aunque la dosis menor de LUM testada no provocó cambios aparentes en la adipogénesis y en la acumulación de lípidos en los adipocitos, sí indujo algunos cambios celulares, incluyendo la inducción de estrés oxidativo y del retículo endoplásmico y la retención de la adiponectina a nivel intracelular. Cabe la posibilidad de que la concentración baja de LUM empleada esté aún por encima de los niveles existentes en el tejido adiposo en condiciones fisiológicas y/o que su combinación con la concentración de COL-I utilizada pueda resultar, en conjunto, desfavorable para la función de los adipocitos maduros.

Teniendo en cuenta estas consideraciones, no obstante, a partir de nuestros resultados podemos proponer que LUM efectivamente es importante para el ensamblaje del colágeno y que su producción patológica puede provocar daño en los preadipocitos y adipocitos y, con ello, contribuir a la disfunción del tejido adiposo debido, al menos

DISCUSIÓN

parcialmente, a su acción sobre el propio colágeno. Además, nuestros estudios permiten sugerir que el ambiente generado por la hiperglucemia/hiperinsulinemia que ocurre en condiciones de obesidad e IR, promueven la producción de LUM por las células residentes en dicho tejido, lo que podría potenciar el daño inducido por la fibrosis (i.e., acumulación de la cantidad de colágeno, como muestran los datos de tinción de rojo picrosirio).

Capítulo 2. Contribución de los componentes de la matriz extracelular y de la fibrosis (lumican y colágeno VI) en la fisiopatología del tejido adiposo.

5.3. Papel de Lumican y Colágeno VI en la fisiología de los adipocitos

Como se ha mencionado anteriormente, la fibrosis es un sello distintivo de la expansión patológica del tejido adiposo en la obesidad. Además, la remodelación y la composición de la ECM (matrisoma) del tejido adiposo juegan un papel crucial en la renovación de los adipocitos y en la arquitectura del tejido adiposo. Además del colágeno tipo I y otras proteínas asociadas al matrisoma como LUM, existen otros tipos de colágeno, como el COL-VI, que también están desregulados en el tejido adiposo en condiciones de obesidad (Divoux & Clement, 2011; Guzman-Ruiz et al., 2020). Sin embargo, aún se desconoce cómo afectan estos cambios a la función del adipocito y si contribuyen al daño patológico relacionado con la fibrosis del tejido adiposo.

En esta sección de la presente Tesis Doctoral se utilizó nuevamente el modelo de cultivo en 3D para investigar si dos de los componentes de la ECM del tejido adiposo que se encuentran alterados en el depósito SC de individuos con obesidad, LUM y COL-VI (Guzman-Ruiz et al., 2020), interactúan y modifican la organización de las fibrillas de COL-I. Además, estas proteínas de la ECM, que se ha demostrado que actúan sobre distintas vías intracelulares, podrían regular la función del adipocito y su capacidad de respuesta a la insulina mediante una acción directa sobre las células. En línea con estas hipótesis de partida, nuestros estudios muestran que los adipocitos expuestos a LUM (a una dosis de 30 ng/mL, de acuerdo con los resultados obtenidos en el Capítulo I) y COL-VI, solos o en combinación, presentan alteraciones en el metabolismo lipídico y de la glucosa, lo que constituye dos de las principales características del tejido adiposo disfuncional en obesidad. En particular, nuestros resultados muestran que los adipocitos diferenciados y cultivados en hidrogeles de COL-I enriquecidos con LUM, presentaron una disminución tanto de la acumulación de lípidos como de la secreción de adiponectina. Estas observaciones sugieren que el incremento de la concentración de LUM, como se observa en el tejido adiposo de individuos con obesidad, podría tener un efecto patogénico sobre la adipogénesis (Guzman-Ruiz et al., 2020).

En esta parte del estudio, confirmamos y ampliamos los resultados previos obtenidos con LUM, demostrando que otra adipoquina y marcador de diferenciación de los adipocitos, FABP4 (Moseti et al., 2016), también se encuentra disminuida en los adipocitos cultivados en matrices 3D que contienen LUM. Además, nuestros resultados son consistentes con las observaciones descritas en el Capítulo I de la Discusión en cuanto a la disminución observada de la expresión de los factores de transcripción clave que regulan la adipogénesis, C/EBP α y PPAR γ (Lowe et al., 2011). En conjunto, estos hallazgos sugieren que el aumento de la concentración de LUM, como la encontrada en el tejido adiposo de individuos con obesidad e IR, podría tener un efecto inhibitorio tanto sobre la diferenciación de los adipocitos como en la regulación de la producción de adipoquinas, lo que podría contribuir a la disfunción del tejido adiposo observada en estos pacientes. Cabe destacar que, entre otras dianas, los factores de transcripción estudiados regulan la expresión de varias proteínas asociadas a la superficie de las LDs, como CIDEc y Plin1 (Lowe et al., 2011; Slayton, Gupta, Balakrishnan, & Puri, 2019), las cuales también se encontraron disminuidas en los adipocitos diferenciados en presencia de LUM. En consonancia con estos resultados, las células expuestas a este PG también mostraron niveles reducidos de Seipin, una proteína asociada al retículo endoplásmico que promueve la biogénesis y acumulación de triglicéridos en las LDs y que, a su vez, activa la señalización y la transcripción génica dirigida por PPAR γ (Rao & Goodman, 2021). Existen otras evidencias experimentales obtenidas en nuestro estudio que permiten apoyar adicionalmente esta propuesta. Así, nuestras observaciones microscópicas demuestran la presencia de LDs de menor tamaño en los adipocitos diferenciados y cultivados en las matrices 3D ricas en LUM en comparación con las matrices utilizadas como control en este estudio (hidrogeles de COL-I). Otras vías que parecen estar desreguladas en los adipocitos cultivados en presencia de LUM incluyen la síntesis de triglicéridos, tal y como indican los niveles reducidos de expresión de las enzimas ACSL, GPAT-3 y DGAT-2, y el transporte de lípidos, como sugiere la expresión disminuida del transportador de membrana CD36.

Por otra parte, nuestros resultados también sugieren que la acción inhibitoria de LUM sobre la acumulación de lípidos podría estar reforzada por su efecto sobre el metabolismo de la glucosa. Así, nuestros datos de expresión génica junto con nuestros estudios funcionales apoyan la idea de que, en el ambiente fibrótico asociado a la obesidad, LUM podría afectar a la señalización de la insulina y reducir tanto la expresión del transportador de glucosa GLUT4 como el tráfico de esta proteína a la superficie del adipocito. Esta señalización alterada resultaría en una inhibición de la glucólisis lo que, a su vez, podría reducir la producción de glicerol-3-fosfato, un sustrato utilizado para la síntesis de triglicéridos (Maraschin et al., 2019), estableciendo con ello una alteración de la relación funcional entre el metabolismo glucídico y lipídico en los adipocitos. En este sentido, nuestro estudio ha permitido establecer, por primera vez, una descripción detallada de las vías metabólicas y los mediadores que pueden ser regulados por LUM, un componente esencial de la ECM del tejido adiposo en individuos con obesidad e IR, que, como hemos demostrado, también regula el proceso de diferenciación de los adipocitos.

Por otra parte, la acción inhibitoria de LUM sobre la diferenciación de los adipocitos podría estar relacionada con su efecto en la organización de las fibrillas de COL-I, que, como hemos mostrado en la primera parte de nuestro estudio, se vuelven más gruesas y se encuentran más densamente empaquetadas cuando las células son expuestas a este PG (Guzman-Ruiz et al., 2020). Como se ha mencionado anteriormente, en este trabajo hemos demostrado que los cultivos 3D que contienen LUM son más resistentes a las fuerzas de compresión que los hidrogeles 3D utilizados como control (COL-I solo) (Guzman-Ruiz et al., 2020), lo cual es consistente con un efecto promotor de este PG sobre la rigidez de la ECM. De acuerdo con esta idea, en esta sección del trabajo mostramos que LUM también alteró la expresión, distribución y/o estado de fosforilación de varias proteínas involucradas en rutas de mecanotransducción en los adipocitos.

Está claramente establecido que los cambios en la ECM, bioquímicos y/o mecánicos, son transmitidos al interior celular vía integrinas de la membrana plasmática, provocando respuestas celulares adaptadas al nuevo entorno, lo que constituye la base del proceso de mecanotransducción (Kai et al., 2016). Notablemente, hemos

demostrado que LUM aumentó los niveles de expresión del receptor β 1-integrina, y alteró la señalización a través de rutas intracelulares específicas activadas por β -integrina que alteran la función celular, como la vía iniciada por FAK (activación determinada por el incremento de la relación pFAK/FAK) (Brezillon et al., 2013). Además, LUM también provocó cambios significativos en la señalización acoplada al citoesqueleto de actina (i.e., organización del citoesqueleto), lo que, junto con la vía FAK, representan vías de transmisión de señales mecánicas extracelulares al interior celular (Noguchi, Saito, & Nagase, 2018). Se ha descrito que estas vías inducen la translocación de los componentes centrales de la ruta Hippo, los coactivadores transcripcionales YAP/TAZ, de su localización citosólica al núcleo (Noguchi et al., 2018). A su vez, la localización nuclear de YAP se puede ver favorecida por el efecto que provocan los sustratos rígidos sobre las células, i.e., aplanamiento del núcleo y estiramiento del poro nuclear, lo que se ha demostrado que reduce la resistencia mecánica de los complejos del poro nuclear al transporte molecular (Elosegui-Artola et al., 2017). Adicionalmente, se ha descrito que el aumento de la rigidez de la ECM conduce a la acumulación de la proteína nuclear lamina A (Cho et al., 2019). La observación de que LUM provocó la elongación de los núcleos y aumentó tanto el contenido nuclear de YAP como el de lamina A en los adipocitos 3T3-L1, junto con los resultados que muestran un aumento en el grado de fosforilación del residuo T48 de la proteína YAP (un fosfositio que se ha propuesto que desempeña un papel en la activación de YAP en el núcleo) (Quinn et al., 2021), nos llevan a proponer que los cambios inducidos por LUM en las propiedades mecánicas de la ECM desencadenan respuestas de mecanotransducción a través de la vía YAP/TAZ. Consistente con esta idea, se ha descrito que TAZ regula la diferenciación de las células madre mesenquimales ejerciendo un efecto negativo sobre la actividad de PPAR γ (Hong et al., 2005). De acuerdo con estas observaciones, Seo y colaboradores (2013) han demostrado que la sobreexpresión de YAP disminuye en particular la expresión de PPAR γ (Seo et al., 2013). Estos resultados estarían en consonancia con los datos obtenidos en nuestro trabajo que muestran una disminución de la expresión de este factor adipogénico en los adipocitos cultivados en matrices 3D ricas en LUM. Atendiendo a la función mecanotransductora que proponemos para LUM, nuestros resultados proporcionan nueva evidencia experimental que apoya la idea de que los cambios mecánicos mediados por LUM en el microambiente del adipocito regulan cascadas de

señalización intracelular que conducen consecuentemente a una disminución en la adipogénesis y a la pérdida de la respuesta a la insulina.

Por otra parte, Seo y colaboradores (2013) demostraron que la adipogénesis ocurre cuando las células contienen niveles moderados de YAP (Seo et al., 2013). Es interesante destacar que, a diferencia de lo encontrado para LUM, observamos un aumento leve pero que no llegó a ser no significativo en la inmunotinción nuclear de YAP cuando las células 3T3-L1 se diferenciaron en matrices enriquecidas en COL-VI, sugiriendo un menor efecto de esta proteína a nivel transcripcional en estas células.

Además, LUM y COL-VI también mostraron patrones opuestos en el grado de fosforilación de YAP en varios residuos, como T48 (activación; (Quinn et al., 2021) y T95 (función desconocida). Estas diferencias podrían estar relacionadas, a su vez, con las distintas proteínas reguladoras y efectoras que, según nuestros datos de fosfoproteómica, se asocian a LUM o COL-VI y que, en último término, deben contribuir a las diferentes respuestas transcripcionales y fenotipos celulares inducidos por cada una de estas proteínas de la ECM. De esta manera, nuestros datos sobre COL-VI revelaron un aumento de la expresión de C/EBP α y PPAR γ así como de las proteínas reguladas por estos factores de transcripción (FABP4, adiponectina, GLUT4, AGPAT y DGAT-2), y de varias proteínas asociadas a la biogénesis y crecimiento de LDs (Seipin, CIDEA, CIDEC). Del mismo modo, en concordancia con estudios previos (Stockli et al., 2011), nuestros estudios sugieren que, en presencia de COL-VI, se produce una activación de las vías de señalización de la insulina y el tráfico de GLUT4 a la membrana plasmática (de acuerdo a nuestros datos sobre AS160), lo que nos lleva a proponer que este colágeno podría contribuir al aumento tanto de la captación de glucosa como del contenido de lípidos que hemos observado que ocurre en los adipocitos cultivados en presencia de COL-VI.

Curiosamente, los efectos estimuladores de COL-VI sobre las rutas de señalización de la insulina se observaron incluso en ausencia de esta hormona. Más aún, no observamos cambios de la fosforilación de Akt o en el transporte de GLUT4 hacia la membrana plasmática tras la estimulación con insulina, lo que indica que los adipocitos cultivados en presencia de COL-VI presentan una alteración en la señalización mediada por esta hormona. Todos estos datos, en conjunto, indican que el exceso de COL-VI, como ocurre en la obesidad, puede contribuir al desarrollo de IR en los adipocitos del

tejido adiposo. Si comparamos las respuestas de los adipocitos a LUM y COL-VI, que inducen fenotipos metabólicos opuestos, es razonable proponer que la IR a nivel de los adipocitos se puede establecer tanto en condiciones que induzcan una disminución (en respuesta a LUM) como un aumento (en respuesta a COL-VI) del contenido intracelular de lípidos en estas células.

Si analizamos los resultados de fosfoproteómica obtenidos de los cultivos celulares expuestos a COL-VI, junto con los datos de inmunoblotting cuantitativo sobre MST-1, una quinasa que regula la localización subcelular de YAP mediante su fosforilación diferencial (traslocación al núcleo de YAP o mantenimiento y destrucción de YAP en el citosol) (Piccolo, Dupont, & Cordenonsi, 2014), y la disminución en el contenido citoplasmático de YAP provocado por este colágeno, es razonable proponer que los efectos inducidos por COL-VI podrían estar mediados por la activación de la vía Hippo.

Aparte de la ruta Hippo, existen otras rutas intracelulares que, según nuestros estudios, se regulan de manera diferencial por LUM y COL-VI. Así, el estudio proteómico presentado en este trabajo reveló diferencias entre ambas proteínas en cuanto a su regulación de las cascadas de señalización a través de las vías Rho, AMPK, PKA, mTOR y ERK/MAPK, todas ellas implicadas en varios procesos biológicos que afectan a la diferenciación de los adipocitos (Ahmad et al., 2020; Bost, Aouadi, Caron, & Binetruy, 2005; P. L. Lee, Jung, & Guertin, 2017; London & Stratakis, 2022; Sordella, Jiang, Chen, Curto, & Settleman, 2003; Wei & Shi, 2022). Puesto que todas estas vías pueden modificar la expresión génica y el comportamiento celular en respuesta a los cambios en las propiedades mecánicas y/o bioquímicas de la ECM (Hastings, Skhinas, Fey, Croucher, & Cox, 2019), no resulta posible discriminar la contribución específica de cada ruta a los efectos de LUM y COL-VI sobre la diferenciación de los adipocitos. Además, es muy probable que ocurran eventos de interacción entre estas vías en los adipocitos en las matrices 3D; como ejemplo de estos fenómenos de *cross-talk*, se ha demostrado que PKA puede inducir la activación de la vía Hippo y alterar con ello la adipogénesis (Yu et al., 2013).

En resumen, nuestros estudios nos han permitido identificar dos nuevos reguladores, LUM y COL-VI, y sus efectores en el control de la función de los adipocitos. Sin embargo, para obtener una comprensión completa de las respuestas de los adipocitos a los cambios en la composición y organización de la ECM, es necesario realizar nuevos estudios que establezcan con precisión los eventos de interacción y la jerarquía de los factores de señalización intracelular que están involucrados en dichas respuestas.

Finalmente, es importante resaltar que la activación o desactivación de las vías de señalización observadas podrían resultar de una interacción directa de las proteínas de la ECM, LUM y COL-VI, con integrinas de la membrana de los adipocitos, tal y como se ha descrito para ambas proteínas en otros tipos celulares (Cescon, Gattazzo, Chen, & Bonaldo, 2015; Lamande & Bateman, 2018; Voiles et al., 2014). Nuestros estudios usando anticuerpos anti- β -integrina están en consonancia con esta propuesta e indican que la señalización vía integrinas es necesaria para que LUM y COL-VI activen las cascadas de señalización en las que participan FAK y ERK, respectivamente, en los adipocitos. Además de poder interactuar directamente con las integrinas de la membrana de los adipocitos, LUM y COL-VI también podrían ejercer sus efectos sobre las células 3T3-L1 mediante su interacción directa con el COL-I presente en el ambiente extracelular, tal y como sugieren datos previos proporcionados por otros autores que avalan dicha interacción (Bonaldo et al., 1990; Kalamajski & Oldberg, 2009; Keene et al., 1998; Stamoj et al., 2013), y como sugieren nuestros propios resultados sobre el efecto de ambas proteínas sobre la organización de las fibrillas de COL-I. En este sentido, nuestros estudios de *docking* molecular predicen que LUM podría interactuar con COL-I a través de su dominio central, el cual contiene repeticiones en tándem ricas en leucina (LRR) y proporciona la estructura característica en forma de herradura de las proteínas SLRP (Gesteira et al., 2017; Nikitovic et al., 2008). Notablemente, el dominio central también contiene numerosos enlaces de hidrógeno potenciales de unión de LUM con COL-VI. La presencia de sitios de interacción comunes entre COL-I y COL-VI a nivel del dominio central del LUM permiten suponer la existencia de interferencias entre las tres proteínas cuando están presentes en la ECM. De hecho, nuestros modelos de predicción de interacciones proteína-proteína indican que los enlaces de hidrógeno formados entre

COL-I y LUM desaparecerían en presencia de COL-VI, mientras que aquellos formados entre COL-I y COL-VI se verían reducidos e involucrarían además a diferentes residuos en presencia de LUM con relación a los establecidos cuando los dos colágenos están solos. A su vez, COL-I también podría interferir en la interacción molecular entre LUM y COL-VI. Estos estudios de predicción estarían en consonancia con las observaciones de microscopía electrónica obtenidas en las matrices 3D conteniendo tanto LUM como COL-VI, en cuanto a que la organización de las fibrillas de COL-I exhibió características ultraestructurales intermedias (grosor de fibras) o similares (tamaño de poro para LUM o la densidad de fibras para COL-VI) a aquellas impuestas por cada proteína de forma individual. Nuestros estudios también demostraron que los adipocitos cultivados en las matrices 3D suplementados con LUM y COL-VI mostraban un fenotipo metabólico intermedio al exhibido por los adipocitos expuestos a solo una de estas proteínas. Estos datos refuerzan aún más la idea de que los cambios en el microambiente de los adipocitos se traducen en respuestas biológicas específicas. En sentido recíproco, la señalización activada por LUM y/o COL-VI "de fuera hacia dentro" (exterior a interior celular) está acompañada por una respuesta celular "de dentro hacia fuera" (interior a exterior celular), como indica nuestro análisis comparativo de las matrices 3D sin células vs. matrices 3D que contienen adipocitos, demostrando la capacidad de los adipocitos para cambiar la ultraestructura de la red de COL-I.

En resumen, nuestros estudios amplían nuestra comprensión actual sobre la importancia de la ECM en el tejido adiposo para mantener la homeostasis tisular, y describen los mecanismos subyacentes que pueden conducir a la progresión de la IR en los adipocitos en respuesta a los diferentes cambios en la organización y composición de la ECM asociados con la obesidad. Finalmente, los resultados obtenidos en nuestro modelo 3D ponen en relieve la importancia que tiene el conocimiento de la interacción entre las células del tejido adiposo y la ECM para entender las bases moleculares de la fibrosis, proporcionando nuevas vías de investigación para identificar posibles dianas terapéuticas para la prevención y el tratamiento de las enfermedades asociadas a obesidad.

Conclusiones

- 1) Los sistemas de cultivo 3D, como los desarrollados en esta Tesis, pueden ser útiles para profundizar en el conocimiento de los cambios cuantitativos y cualitativos que ocurren en la matriz extracelular y contribuyen a la disfunción de los adipocitos en obesidad.
- 2) Condiciones obesogénicas como la hiperglucemia/hiperinsulinemia estimulan la producción de lumican por los adipocitos, lo que puede modificar la estructura y función de la matriz extracelular.
- 3) La acumulación de lumican en un ambiente fibrótico, como ocurre en el tejido adiposo subcutáneo en obesidad y resistencia a insulina, previene la diferenciación y la acumulación de lípidos y la secreción de adipoquinas por los adipocitos, presumiblemente mediante la inducción de cambios en las propiedades mecánicas de la matriz extracelular y por un efecto directo sobre las células vía integrinas.
- 4) En condiciones de fibrosis, la presencia de colágeno VI provoca importantes alteraciones en el metabolismo glucídico y lipídico de los adipocitos, probablemente a través de la activación de la vía Hippo.
- 5) Los cambios en el contenido de lumican o de colágeno VI que ocurren en el tejido adiposo fibrótico en obesidad conducen al desarrollo de resistencia a insulina en los adipocitos.
- 6) La interacción entre la matriz extracelular y los adipocitos, en ambas direcciones (*outside-in* e *inside-out*), es fundamental para mantener el equilibrio funcional del tejido adiposo y su pérdida puede contribuir de manera significativa al desarrollo de resistencia a insulina en obesidad.

Bibliografía

- Agarwal, S. K. (2014). Integrins and cadherins as therapeutic targets in fibrosis. *Front Pharmacol*, *5*, 131. doi:10.3389/fphar.2014.00131
- Ahmad, B., Serpell, C. J., Fong, I. L., & Wong, E. H. (2020). Molecular Mechanisms of Adipogenesis: The Anti-adipogenic Role of AMP-Activated Protein Kinase. *Front Mol Biosci*, *7*, 76. doi:10.3389/fmolb.2020.00076
- Ahmed, B., Sultana, R., & Greene, M. W. (2021). Adipose tissue and insulin resistance in obese. *Biomed Pharmacother*, *137*, 111315. doi:10.1016/j.biopha.2021.111315
- American Diabetes, A. (2019). 2. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes-2019. *Diabetes Care*, *42*(Suppl 1), S13-S28. doi:10.2337/dc19-S002
- Arner, P. (2018). Fat Tissue Growth and Development in Humans. *Nestle Nutr Inst Workshop Ser*, *89*, 37-45. doi:10.1159/000486491
- Ayala-Sumuano, J. T., Velez-Delvalle, C., Beltran-Langarica, A., Marsch-Moreno, M., Cerbon-Solorzano, J., & Kuri-Harcuch, W. (2011). Srebf1a is a key regulator of transcriptional control for adipogenesis. *Sci Rep*, *1*, 178. doi:10.1038/srep00178
- Baker, N. A., Muir, L. A., Washabaugh, A. R., Neeley, C. K., Chen, S. Y., Flesher, C. G., . . . O'Rourke, R. W. (2017). Diabetes-Specific Regulation of Adipocyte Metabolism by the Adipose Tissue Extracellular Matrix. *J Clin Endocrinol Metab*, *102*(3), 1032-1043. doi:10.1210/jc.2016-2915
- Batista, T. M., Haider, N., & Kahn, C. R. (2021). Defining the underlying defect in insulin action in type 2 diabetes. *Diabetologia*, *64*(5), 994-1006. doi:10.1007/s00125-021-05415-5
- Belligoli, A., Compagnin, C., Sanna, M., Favaretto, F., Fabris, R., Busetto, L., . . . Vettor, R. (2019). Characterization of subcutaneous and omental adipose tissue in patients with obesity and with different degrees of glucose impairment. *Sci Rep*, *9*(1), 11333. doi:10.1038/s41598-019-47719-y
- Blüher, M. (2019). Obesity: global epidemiology and pathogenesis. *Nat Rev Endocrinol*, *15*(5), 288-298. doi:10.1038/s41574-019-0176-8
- Bonaldo, P., Russo, V., Bucciotti, F., Doliana, R., & Colombatti, A. (1990). Structural and functional features of the alpha 3 chain indicate a bridging role for chicken collagen VI in connective tissues. *Biochemistry*, *29*(5), 1245-1254. doi:10.1021/bi00457a021
- Bonnans, C., Chou, J., & Werb, Z. (2014). Remodelling the extracellular matrix in development and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol*, *15*(12), 786-801. doi:10.1038/nrm3904
- Bost, F., Aouadi, M., Caron, L., & Binetruy, B. (2005). The role of MAPKs in adipocyte differentiation and obesity. *Biochimie*, *87*(1), 51-56. doi:10.1016/j.biochi.2004.10.018
- Boulton, T. G., Nye, S. H., Robbins, D. J., Ip, N. Y., Radziejewska, E., Morgenbesser, S. D., . . . Yancopoulos, G. D. (1991). ERKs: a family of protein-serine/threonine kinases that are activated and tyrosine phosphorylated in response to insulin and NGF. *Cell*, *65*(4), 663-675. doi:10.1016/0092-8674(91)90098-j
- Boutens, L., & Stienstra, R. (2016). Adipose tissue macrophages: going off track during obesity. *Diabetologia*, *59*(5), 879-894. doi:10.1007/s00125-016-3904-9
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, *72*, 248-254. doi:10.1006/abio.1976.9999

- Braga, T. T., Agudelo, J. S., & Camara, N. O. (2015). Macrophages During the Fibrotic Process: M2 as Friend and Foe. *Front Immunol*, 6, 602. doi:10.3389/fimmu.2015.00602
- Brezillon, S., Pietraszek, K., Maquart, F. X., & Wegrowski, Y. (2013). Lumican effects in the control of tumour progression and their links with metalloproteinases and integrins. *FEBS J*, 280(10), 2369-2381. doi:10.1111/febs.12210
- Cescon, M., Gattazzo, F., Chen, P., & Bonaldo, P. (2015). Collagen VI at a glance. *J Cell Sci*, 128(19), 3525-3531. doi:10.1242/jcs.169748
- Chakravarti, S., Magnuson, T., Lass, J. H., Jepsen, K. J., LaMantia, C., & Carroll, H. (1998). Lumican regulates collagen fibril assembly: skin fragility and corneal opacity in the absence of lumican. *J Cell Biol*, 141(5), 1277-1286. doi:10.1083/jcb.141.5.1277
- Chandran, M., Phillips, S. A., Ciaraldi, T., & Henry, R. R. (2003). Adiponectin: more than just another fat cell hormone? *Diabetes Care*, 26(8), 2442-2450. doi:10.2337/diacare.26.8.2442
- Chang, S. H., Stoll, C. R., Song, J., Varela, J. E., Eagon, C. J., & Colditz, G. A. (2014). The effectiveness and risks of bariatric surgery: an updated systematic review and meta-analysis, 2003-2012. *JAMA Surg*, 149(3), 275-287. doi:10.1001/jamasurg.2013.3654
- Chen, D., Smith, L. R., Khandekar, G., Patel, P., Yu, C. K., Zhang, K., . . . Wells, R. G. (2020). Distinct effects of different matrix proteoglycans on collagen fibrillogenesis and cell-mediated collagen reorganization. *Sci Rep*, 10(1), 19065. doi:10.1038/s41598-020-76107-0
- Chen, Y., Pan, R., & Pfeifer, A. (2017). Regulation of brown and beige fat by microRNAs. *Pharmacol Ther*, 170, 1-7. doi:10.1016/j.pharmthera.2016.10.004
- Cho, S., Vashisth, M., Abbas, A., Majkut, S., Vogel, K., Xia, Y., . . . Discher, D. E. (2019). Mechanosensing by the Lamina Protects against Nuclear Rupture, DNA Damage, and Cell-Cycle Arrest. *Dev Cell*, 49(6), 920-935 e925. doi:10.1016/j.devcel.2019.04.020
- Choudhary, V., Ojha, N., Golden, A., & Prinz, W. A. (2015). A conserved family of proteins facilitates nascent lipid droplet budding from the ER. *J Cell Biol*, 211(2), 261-271. doi:10.1083/jcb.201505067
- Chun, T. H., Hotary, K. B., Sabeh, F., Saltiel, A. R., Allen, E. D., & Weiss, S. J. (2006). A pericellular collagenase directs the 3-dimensional development of white adipose tissue. *Cell*, 125(3), 577-591. doi:10.1016/j.cell.2006.02.050
- Cignarelli, A., Genchi, V. A., Perrini, S., Natalicchio, A., Laviola, L., & Giorgino, F. (2019). Insulin and Insulin Receptors in Adipose Tissue Development. *Int J Mol Sci*, 20(3). doi:10.3390/ijms20030759
- Cisa-Wieczorek, S., & Hernandez-Alvarez, M. I. (2020). Deregulation of Lipid Homeostasis: A Fa(c)t in the Development of Metabolic Diseases. *Cells*, 9(12). doi:10.3390/cells9122605
- Clevers, H. (2016). Modeling Development and Disease with Organoids. *Cell*, 165(7), 1586-1597. doi:10.1016/j.cell.2016.05.082
- Collaboration, N. C. D. R. F. (2016). Trends in adult body-mass index in 200 countries from 1975 to 2014: a pooled analysis of 1698 population-based measurement studies with 19.2 million participants. *Lancet*, 387(10026), 1377-1396. doi:10.1016/S0140-6736(16)30054-X

- Crewe, C., An, Y. A., & Scherer, P. E. (2017). The ominous triad of adipose tissue dysfunction: inflammation, fibrosis, and impaired angiogenesis. *J Clin Invest*, *127*(1), 74-82. doi:10.1172/JCI88883
- Czech, M. P. (2017). Insulin action and resistance in obesity and type 2 diabetes. *Nat Med*, *23*(7), 804-814. doi:10.1038/nm.4350
- Dahl, K. N., Ribeiro, A. J., & Lammerding, J. (2008). Nuclear shape, mechanics, and mechanotransduction. *Circ Res*, *102*(11), 1307-1318. doi:10.1161/CIRCRESAHA.108.173989
- Datta, R., Podolsky, M. J., & Atabai, K. (2018). Fat fibrosis: friend or foe? *JCI Insight*, *3*(19). doi:10.1172/jci.insight.122289
- Diaz-Ruiz, A., Guzman-Ruiz, R., Moreno, N. R., Garcia-Rios, A., Delgado-Casado, N., Membrives, A., . . . Malagon, M. M. (2015). Proteasome Dysfunction Associated to Oxidative Stress and Proteotoxicity in Adipocytes Compromises Insulin Sensitivity in Human Obesity. *Antioxid Redox Signal*, *23*(7), 597-612. doi:10.1089/ars.2014.5939
- Dimitriadis, G., Mitrou, P., Lambadiari, V., Maratou, E., & Raptis, S. A. (2011). Insulin effects in muscle and adipose tissue. *Diabetes Res Clin Pract*, *93* Suppl 1, S52-59. doi:10.1016/S0168-8227(11)70014-6
- Divoux, A., & Clement, K. (2011). Architecture and the extracellular matrix: the still unappreciated components of the adipose tissue. *Obes Rev*, *12*(5), e494-503. doi:10.1111/j.1467-789X.2010.00811.x
- Divoux, A., Tordjman, J., Lacasa, D., Veyrie, N., Hugol, D., Aissat, A., . . . Clement, K. (2010). Fibrosis in human adipose tissue: composition, distribution, and link with lipid metabolism and fat mass loss. *Diabetes*, *59*(11), 2817-2825. doi:10.2337/db10-0585
- Dodson, M. V., Du, M., Wang, S., Bergen, W. G., Fernyhough-Culver, M., Basu, U., . . . Hausman, G. J. (2014). Adipose depots differ in cellularity, adipokines produced, gene expression, and cell systems. *Adipocyte*, *3*(4), 236-241. doi:10.4161/adip.28321
- Doyle, A. D. (2016). Generation of 3D Collagen Gels with Controlled Diverse Architectures. *Curr Protoc Cell Biol*, *72*, 10.20.11-10.20.16. doi:10.1002/cpcb.9
- Doyle, A. D., Carvajal, N., Jin, A., Matsumoto, K., & Yamada, K. M. (2015). Local 3D matrix microenvironment regulates cell migration through spatiotemporal dynamics of contractility-dependent adhesions. *Nat Commun*, *6*, 8720. doi:10.1038/ncomms9720
- Ducharme, N. A., & Bickel, P. E. (2008). Lipid droplets in lipogenesis and lipolysis. *Endocrinology*, *149*(3), 942-949. doi:10.1210/en.2007-1713
- Dupont, S., Morsut, L., Aragona, M., Enzo, E., Giulitti, S., Cordenonsi, M., . . . Piccolo, S. (2011). Role of YAP/TAZ in mechanotransduction. *Nature*, *474*(7350), 179-183. doi:10.1038/nature10137
- Eiraku, M., Takata, N., Ishibashi, H., Kawada, M., Sakakura, E., Okuda, S., . . . Sasai, Y. (2011). Self-organizing optic-cup morphogenesis in three-dimensional culture. *Nature*, *472*(7341), 51-56. doi:10.1038/nature09941
- Elosegui-Artola, A., Andreu, I., Beedle, A. E. M., Lezamiz, A., Uroz, M., Kosmalska, A. J., . . . Roca-Cusachs, P. (2017). Force Triggers YAP Nuclear Entry by Regulating Transport across Nuclear Pores. *Cell*, *171*(6), 1397-1410 e1314. doi:10.1016/j.cell.2017.10.008

- ElSayed, N. A., Aleppo, G., Aroda, V. R., Bannuru, R. R., Brown, F. M., Bruemmer, D., . . . on behalf of the American Diabetes, A. (2023). 2. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Care in Diabetes-2023. *Diabetes Care*, *46*(Suppl 1), S19-S40. doi:10.2337/dc23-S002
- Engelbrechtsen, K. V., Lunde, I. G., Strand, M. E., Waehre, A., Sjaastad, I., Marstein, H. S., . . . Tonnessen, T. (2013). Lumican is increased in experimental and clinical heart failure, and its production by cardiac fibroblasts is induced by mechanical and proinflammatory stimuli. *FEBS J*, *280*(10), 2382-2398. doi:10.1111/febs.12235
- Esfahani, M., Movahedian, A., Baranchi, M., & Goodarzi, M. T. (2015). Adiponectin: an adipokine with protective features against metabolic syndrome. *Iran J Basic Med Sci*, *18*(5), 430-442.
- Fain, J. N., Madan, A. K., Hiler, M. L., Cheema, P., & Bahouth, S. W. (2004). Comparison of the release of adipokines by adipose tissue, adipose tissue matrix, and adipocytes from visceral and subcutaneous abdominal adipose tissues of obese humans. *Endocrinology*, *145*(5), 2273-2282. doi:10.1210/en.2003-1336
- Festuccia, W. T., Blanchard, P. G., & Deshaies, Y. (2011). Control of Brown Adipose Tissue Glucose and Lipid Metabolism by PPARgamma. *Front Endocrinol (Lausanne)*, *2*, 84. doi:10.3389/fendo.2011.00084
- Frantz, C., Stewart, K. M., & Weaver, V. M. (2010). The extracellular matrix at a glance. *J Cell Sci*, *123*(Pt 24), 4195-4200. doi:10.1242/jcs.023820
- Fruhbeck, G., Mendez-Gimenez, L., Fernandez-Formoso, J. A., Fernandez, S., & Rodriguez, A. (2014). Regulation of adipocyte lipolysis. *Nutr Res Rev*, *27*(1), 63-93. doi:10.1017/S095442241400002X
- Gesteira, T. F., Coulson-Thomas, V. J., Yuan, Y., Zhang, J., Nader, H. B., & Kao, W. W. (2017). Lumican Peptides: Rational Design Targeting ALK5/TGFBR1. *Sci Rep*, *7*, 42057. doi:10.1038/srep42057
- Ghaben, A. L., & Scherer, P. E. (2019). Adipogenesis and metabolic health. *Nat Rev Mol Cell Biol*, *20*(4), 242-258. doi:10.1038/s41580-018-0093-z
- Gross, D. A., & Silver, D. L. (2014). Cytosolic lipid droplets: from mechanisms of fat storage to disease. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, *49*(4), 304-326. doi:10.3109/10409238.2014.931337
- Guglielmi, V., Cardellini, M., Cinti, F., Corgosinho, F., Cardolini, I., D'Adamo, M., . . . Sbraccia, P. (2015). Omental adipose tissue fibrosis and insulin resistance in severe obesity. *Nutr Diabetes*, *5*, e175. doi:10.1038/nutd.2015.22
- Guzman-Ruiz, R., Tercero-Alcazar, C., Rabanal-Ruiz, Y., Diaz-Ruiz, A., El Bekay, R., Rangel-Zuniga, O. A., . . . Malagon, M. M. (2020). Adipose tissue depot-specific intracellular and extracellular cues contributing to insulin resistance in obese individuals. *FASEB J*, *34*(6), 7520-7539. doi:10.1096/fj.201902703R
- Habtemichael, E. N., Brewer, P. D., Romenskaia, I., & Mastick, C. C. (2011). Kinetic evidence that Glut4 follows different endocytic pathways than the receptors for transferrin and alpha2-macroglobulin. *J Biol Chem*, *286*(12), 10115-10125. doi:10.1074/jbc.M111.217935
- Hansen, C. G., Moroishi, T., & Guan, K. L. (2015). YAP and TAZ: a nexus for Hippo signaling and beyond. *Trends Cell Biol*, *25*(9), 499-513. doi:10.1016/j.tcb.2015.05.002
- Hastings, J. F., Skhinas, J. N., Fey, D., Croucher, D. R., & Cox, T. R. (2019). The extracellular matrix as a key regulator of intracellular signalling networks. *Br J Pharmacol*, *176*(1), 82-92. doi:10.1111/bph.14195

- Henegar, C., Tordjman, J., Achard, V., Lacasa, D., Cremer, I., Guerre-Millo, M., . . . Clement, K. (2008). Adipose tissue transcriptomic signature highlights the pathological relevance of extracellular matrix in human obesity. *Genome Biol*, 9(1), R14. doi:10.1186/gb-2008-9-1-r14
- Hong, J. H., Hwang, E. S., McManus, M. T., Amsterdam, A., Tian, Y., Kalmukova, R., . . . Yaffe, M. B. (2005). TAZ, a transcriptional modulator of mesenchymal stem cell differentiation. *Science*, 309(5737), 1074-1078. doi:10.1126/science.1110955
- Hresko, R. C., & Mueckler, M. (2005). mTOR.RICTOR is the Ser473 kinase for Akt/protein kinase B in 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem*, 280(49), 40406-40416. doi:10.1074/jbc.M508361200
- Huang, C. C., Meng, E. C., Morris, J. H., Pettersen, E. F., & Ferrin, T. E. (2014). Enhancing UCSF Chimera through web services. *Nucleic Acids Res*, 42(Web Server issue), W478-484. doi:10.1093/nar/gku377
- Hubbard, S. R. (2013). The insulin receptor: both a prototypical and atypical receptor tyrosine kinase. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 5(3), a008946. doi:10.1101/cshperspect.a008946
- Humphrey, J. D., Dufresne, E. R., & Schwartz, M. A. (2014). Mechanotransduction and extracellular matrix homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 15(12), 802-812. doi:10.1038/nrm3896
- Hynes, R. O., & Naba, A. (2012). Overview of the matrisome--an inventory of extracellular matrix constituents and functions. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 4(1), a004903. doi:10.1101/cshperspect.a004903
- Iskratsch, T., Wolfenson, H., & Sheetz, M. P. (2014). Appreciating force and shape-the rise of mechanotransduction in cell biology. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 15(12), 825-833. doi:10.1038/nrm3903
- Iyengar, P., Espina, V., Williams, T. W., Lin, Y., Berry, D., Jelicks, L. A., . . . Scherer, P. E. (2005). Adipocyte-derived collagen VI affects early mammary tumor progression in vivo, demonstrating a critical interaction in the tumor/stroma microenvironment. *J Clin Invest*, 115(5), 1163-1176. doi:10.1172/JCI23424
- Kai, F., Laklai, H., & Weaver, V. M. (2016). Force Matters: Biomechanical Regulation of Cell Invasion and Migration in Disease. *Trends Cell Biol*, 26(7), 486-497. doi:10.1016/j.tcb.2016.03.007
- Kajimura, S. (2017). Adipose tissue in 2016: Advances in the understanding of adipose tissue biology. *Nat Rev Endocrinol*, 13(2), 69-70. doi:10.1038/nrendo.2016.211
- Kalamajski, S., & Oldberg, A. (2009). Homologous sequence in lumican and fibromodulin leucine-rich repeat 5-7 competes for collagen binding. *J Biol Chem*, 284(1), 534-539. doi:10.1074/jbc.M805721200
- Karamanos, N. K., Theocharis, A. D., Neill, T., & Iozzo, R. V. (2019). Matrix modeling and remodeling: A biological interplay regulating tissue homeostasis and diseases. *Matrix Biol*, 75-76, 1-11. doi:10.1016/j.matbio.2018.08.007
- Karamanou, K., Franchi, M., Vynios, D., & Brezillon, S. (2020). Epithelial-to-mesenchymal transition and invadopodia markers in breast cancer: Lumican a key regulator. *Semin Cancer Biol*, 62, 125-133. doi:10.1016/j.semcancer.2019.08.003
- Karsdal, M. A., Daniels, S. J., Holm Nielsen, S., Bager, C., Rasmussen, D. G. K., Loomba, R., . . . Schuppan, D. (2020). Collagen biology and non-invasive biomarkers of liver fibrosis. *Liver Int*, 40(4), 736-750. doi:10.1111/liv.14390

- Kawai, T., Autieri, M. V., & Scalia, R. (2021). Adipose tissue inflammation and metabolic dysfunction in obesity. *Am J Physiol Cell Physiol*, 320(3), C375-C391. doi:10.1152/ajpcell.00379.2020
- Keene, D. R., Ridgway, C. C., & Iozzo, R. V. (1998). Type VI microfilaments interact with a specific region of banded collagen fibrils in skin. *J Histochem Cytochem*, 46(2), 215-220. doi:10.1177/002215549804600210
- Khan, T., Muise, E. S., Iyengar, P., Wang, Z. V., Chandalia, M., Abate, N., . . . Scherer, P. E. (2009). Metabolic dysregulation and adipose tissue fibrosis: role of collagen VI. *Mol Cell Biol*, 29(6), 1575-1591. doi:10.1128/MCB.01300-08
- Konigorski, S., Janke, J., Drogan, D., Bergmann, M. M., Hierholzer, J., Kaaks, R., . . . Pischon, T. (2019). Prediction of Circulating Adipokine Levels Based on Body Fat Compartments and Adipose Tissue Gene Expression. *Obes Facts*, 12(6), 590-605. doi:10.1159/000502117
- Kory, N., Farese, R. V., Jr., & Walther, T. C. (2016). Targeting Fat: Mechanisms of Protein Localization to Lipid Droplets. *Trends Cell Biol*, 26(7), 535-546. doi:10.1016/j.tcb.2016.02.007
- Kovacova, Z., Tencerova, M., Roussel, B., Wedellova, Z., Rossmeislova, L., Langin, D., . . . Stich, V. (2012). The impact of obesity on secretion of adiponectin multimeric isoforms differs in visceral and subcutaneous adipose tissue. *Int J Obes (Lond)*, 36(10), 1360-1365. doi:10.1038/ijo.2011.223
- Kozakov, D., Hall, D. R., Xia, B., Porter, K. A., Padhorny, D., Yueh, C., . . . Vajda, S. (2017). The ClusPro web server for protein-protein docking. *Nat Protoc*, 12(2), 255-278. doi:10.1038/nprot.2016.169
- Krahmer, N., Farese, R. V., Jr., & Walther, T. C. (2013). Balancing the fat: lipid droplets and human disease. *EMBO Mol Med*, 5(7), 973-983. doi:10.1002/emmm.201100671
- Lafontan, M. (2008). Advances in adipose tissue metabolism. *Int J Obes (Lond)*, 32 Suppl 7, S39-51. doi:10.1038/ijo.2008.237
- Lago M E L., C. M., Pirraco R., Reis R L., Marques A. (2017). Skin in vitro models to study dermal white adipose tissue role in skin healing. *Skin Tissue Models*, 327-352. doi:doi.org/10.1016/B978-0-12-810545-0.00014-0
- Lamande, S. R., & Bateman, J. F. (2018). Collagen VI disorders: Insights on form and function in the extracellular matrix and beyond. *Matrix Biol*, 71-72, 348-367. doi:10.1016/j.matbio.2017.12.008
- Laskowski, R. A., & Swindells, M. B. (2011). LigPlot+: multiple ligand-protein interaction diagrams for drug discovery. *J Chem Inf Model*, 51(10), 2778-2786. doi:10.1021/ci200227u
- Lass, A., Zimmermann, R., Oberer, M., & Zechner, R. (2011). Lipolysis - a highly regulated multi-enzyme complex mediates the catabolism of cellular fat stores. *Prog Lipid Res*, 50(1), 14-27. doi:10.1016/j.plipres.2010.10.004
- Lawler, H. M., Underkofler, C. M., Kern, P. A., Erickson, C., Bredbeck, B., & Rasouli, N. (2016). Adipose Tissue Hypoxia, Inflammation, and Fibrosis in Obese Insulin-Sensitive and Obese Insulin-Resistant Subjects. *J Clin Endocrinol Metab*, 101(4), 1422-1428. doi:10.1210/jc.2015-4125
- Lee, J. T., Pamir, N., Liu, N. C., Kirk, E. A., Averill, M. M., Becker, L., . . . Heinecke, J. W. (2014). Macrophage metalloelastase (MMP12) regulates adipose tissue expansion, insulin sensitivity, and expression of inducible nitric oxide synthase. *Endocrinology*, 155(9), 3409-3420. doi:10.1210/en.2014-1037

- Lee, M. W., Lee, M., & Oh, K. J. (2019). Adipose Tissue-Derived Signatures for Obesity and Type 2 Diabetes: Adipokines, Batokines and MicroRNAs. *J Clin Med*, *8*(6). doi:10.3390/jcm8060854
- Lee, P. L., Jung, S. M., & Guertin, D. A. (2017). The Complex Roles of Mechanistic Target of Rapamycin in Adipocytes and Beyond. *Trends Endocrinol Metab*, *28*(5), 319-339. doi:10.1016/j.tem.2017.01.004
- Leguisamo, N. M., Lehnen, A. M., Machado, U. F., Okamoto, M. M., Markoski, M. M., Pinto, G. H., & Schaan, B. D. (2012). GLUT4 content decreases along with insulin resistance and high levels of inflammatory markers in rats with metabolic syndrome. *Cardiovasc Diabetol*, *11*, 100. doi:10.1186/1475-2840-11-100
- Li, X., Kim, J. W., Gronborg, M., Urlaub, H., Lane, M. D., & Tang, Q. Q. (2007). Role of cdk2 in the sequential phosphorylation/activation of C/EBPbeta during adipocyte differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *104*(28), 11597-11602. doi:10.1073/pnas.0703771104
- Lin, D., Chun, T. H., & Kang, L. (2016). Adipose extracellular matrix remodelling in obesity and insulin resistance. *Biochem Pharmacol*, *119*, 8-16. doi:10.1016/j.bcp.2016.05.005
- Liu, X. J., Kong, F. Z., Wang, Y. H., Zheng, J. H., Wan, W. D., Deng, C. L., . . . Zhang, Z. G. (2013). Lumican Accelerates Wound Healing by Enhancing alpha2beta1 Integrin-Mediated Fibroblast Contractility. *PLoS One*, *8*(6), e67124. doi:10.1371/journal.pone.0067124
- Llacua, L. A., Hoek, A., de Haan, B. J., & de Vos, P. (2018). Collagen type VI interaction improves human islet survival in immunisolating microcapsules for treatment of diabetes. *Islets*, *10*(2), 60-68. doi:10.1080/19382014.2017.1420449
- London, E., & Stratakis, C. A. (2022). The regulation of PKA signaling in obesity and in the maintenance of metabolic health. *Pharmacol Ther*, *237*, 108113. doi:10.1016/j.pharmthera.2022.108113
- Lowe, C. E., O'Rahilly, S., & Rochford, J. J. (2011). Adipogenesis at a glance. *J Cell Sci*, *124*(Pt 16), 2681-2686. doi:10.1242/jcs.079699
- Luo, L., & Liu, M. (2016). Adipose tissue in control of metabolism. *J Endocrinol*, *231*(3), R77-R99. doi:10.1530/JOE-16-0211
- Makki, K., Froguel, P., & Wolowczuk, I. (2013). Adipose tissue in obesity-related inflammation and insulin resistance: cells, cytokines, and chemokines. *ISRN Inflamm*, *2013*, 139239. doi:10.1155/2013/139239
- Malagon, M. M., Diaz-Ruiz, A., Guzman-Ruiz, R., Jimenez-Gomez, Y., Moreno, N. R., Garcia-Navarro, S., . . . Peinado, J. R. (2013). Adipobiology for novel therapeutic approaches in metabolic syndrome. *Curr Vasc Pharmacol*, *11*(6), 954-967. doi:10.2174/15701611113116660170
- Malik, V. S., Willet, W. C., & Hu, F. B. (2020). Nearly a decade on - trends, risk factors and policy implications in global obesity. *Nat Rev Endocrinol*, *16*(11), 615-616. doi:10.1038/s41574-020-00411-y
- Manning, B. D., & Cantley, L. C. (2007). AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell*, *129*(7), 1261-1274. doi:10.1016/j.cell.2007.06.009
- Maraschin, F. D. S., Kulcheski, F. R., Segatto, A. L. A., Trez, T. S., Barrientos-Diaz, O., Margis-Pinheiro, M., . . . Turchetto-Zolet, A. C. (2019). Enzymes of glycerol-3-phosphate pathway in triacylglycerol synthesis in plants: Function,

- biotechnological application and evolution. *Prog Lipid Res*, 73, 46-64. doi:10.1016/j.plipres.2018.12.001
- Marcelin, G., Ferreira, A., Liu, Y., Atlan, M., Aron-Wisnewsky, J., Pelloux, V., . . . Clement, K. (2017). A PDGFRalpha-Mediated Switch toward CD9(high) Adipocyte Progenitors Controls Obesity-Induced Adipose Tissue Fibrosis. *Cell Metab*, 25(3), 673-685. doi:10.1016/j.cmet.2017.01.010
- Mariman, E. C., & Wang, P. (2010). Adipocyte extracellular matrix composition, dynamics and role in obesity. *Cell Mol Life Sci*, 67(8), 1277-1292. doi:10.1007/s00018-010-0263-4
- Martinez-Santibanez, G., Cho, K. W., & Lumeng, C. N. (2014). Imaging white adipose tissue with confocal microscopy. *Methods Enzymol*, 537, 17-30. doi:10.1016/B978-0-12-411619-1.00002-1
- Mebratu, Y., & Tesfaijzi, Y. (2009). How ERK1/2 activation controls cell proliferation and cell death: Is subcellular localization the answer? *Cell Cycle*, 8(8), 1168-1175. doi:10.4161/cc.8.8.8147
- Meng, Z., Moroishi, T., & Guan, K. L. (2016). Mechanisms of Hippo pathway regulation. *Genes Dev*, 30(1), 1-17. doi:10.1101/gad.274027.115
- Mori, M. A., Ludwig, R. G., Garcia-Martin, R., Brandao, B. B., & Kahn, C. R. (2019). Extracellular miRNAs: From Biomarkers to Mediators of Physiology and Disease. *Cell Metab*, 30(4), 656-673. doi:10.1016/j.cmet.2019.07.011
- Moseti, D., Regassa, A., & Kim, W. K. (2016). Molecular Regulation of Adipogenesis and Potential Anti-Adipogenic Bioactive Molecules. *Int J Mol Sci*, 17(1). doi:10.3390/ijms17010124
- Mouw, J. K., Ou, G., & Weaver, V. M. (2014). Extracellular matrix assembly: a multiscale deconstruction. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 15(12), 771-785. doi:10.1038/nrm3902
- Muir, L. A., Neeley, C. K., Meyer, K. A., Baker, N. A., Brosius, A. M., Washabaugh, A. R., . . . O'Rourke, R. W. (2016). Adipose tissue fibrosis, hypertrophy, and hyperplasia: Correlations with diabetes in human obesity. *Obesity (Silver Spring)*, 24(3), 597-605. doi:10.1002/oby.21377
- Muller, T. D., Bluher, M., Tschop, M. H., & DiMarchi, R. D. (2022). Anti-obesity drug discovery: advances and challenges. *Nat Rev Drug Discov*, 21(3), 201-223. doi:10.1038/s41573-021-00337-8
- Mullins, G. R., Wang, L., Raje, V., Sherwood, S. G., Grande, R. C., Boroda, S., . . . Harris, T. E. (2014). Catecholamine-induced lipolysis causes mTOR complex dissociation and inhibits glucose uptake in adipocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111(49), 17450-17455. doi:10.1073/pnas.1410530111
- Naba, A., Clauser, K. R., Ding, H., Whittaker, C. A., Carr, S. A., & Hynes, R. O. (2016). The extracellular matrix: Tools and insights for the "omics" era. *Matrix Biol*, 49, 10-24. doi:10.1016/j.matbio.2015.06.003
- Naba, A., Clauser, K. R., Hoersch, S., Liu, H., Carr, S. A., & Hynes, R. O. (2012). The matrisome: in silico definition and in vivo characterization by proteomics of normal and tumor extracellular matrices. *Mol Cell Proteomics*, 11(4), M111 014647. doi:10.1074/mcp.M111.014647
- Nastase, M. V., Iozzo, R. V., & Schaefer, L. (2014). Key roles for the small leucine-rich proteoglycans in renal and pulmonary pathophysiology. *Biochim Biophys Acta*, 1840(8), 2460-2470. doi:10.1016/j.bbagen.2014.01.035

- Neame, P. J., Kay, C. J., McQuillan, D. J., Beales, M. P., & Hassell, J. R. (2000). Independent modulation of collagen fibrillogenesis by decorin and lumican. *Cell Mol Life Sci*, 57(5), 859-863. doi:10.1007/s000180050048
- Nguyen, T. B., & Olzmann, J. A. (2019). Getting a handle on lipid droplets: Insights into ER-lipid droplet tethering. *J Cell Biol*, 218(4), 1089-1091. doi:10.1083/jcb.201902160
- Nikitovic, D., Katonis, P., Tsatsakis, A., Karamanos, N. K., & Tzanakakis, G. N. (2008). Lumican, a small leucine-rich proteoglycan. *IUBMB Life*, 60(12), 818-823. doi:10.1002/iub.131
- Noguchi, S., Saito, A., & Nagase, T. (2018). YAP/TAZ Signaling as a Molecular Link between Fibrosis and Cancer. *Int J Mol Sci*, 19(11). doi:10.3390/ijms19113674
- Oh, J., Kim, C. S., Kim, M., Jo, W., Sung, Y. H., & Park, J. (2021). Type VI collagen and its cleavage product, endotrophin, cooperatively regulate the adipogenic and lipolytic capacity of adipocytes. *Metabolism*, 114, 154430. doi:10.1016/j.metabol.2020.154430
- Pellegrinelli, V., Carobbio, S., & Vidal-Puig, A. (2016). Adipose tissue plasticity: how fat depots respond differently to pathophysiological cues. *Diabetologia*, 59(6), 1075-1088. doi:10.1007/s00125-016-3933-4
- Pellegrinelli, V., Heuvingh, J., du Roure, O., Rouault, C., Devulder, A., Klein, C., . . . Clement, K. (2014). Human adipocyte function is impacted by mechanical cues. *J Pathol*, 233(2), 183-195. doi:10.1002/path.4347
- Petersen, M. C., & Shulman, G. I. (2018). Mechanisms of Insulin Action and Insulin Resistance. *Physiol Rev*, 98(4), 2133-2223. doi:10.1152/physrev.00063.2017
- Piccolo, S., Dupont, S., & Cordenonsi, M. (2014). The biology of YAP/TAZ: hippo signaling and beyond. *Physiol Rev*, 94(4), 1287-1312. doi:10.1152/physrev.00005.2014
- Pilling, D., Vakil, V., Cox, N., & Gomer, R. H. (2015). TNF-alpha-stimulated fibroblasts secrete lumican to promote fibrocyte differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 112(38), 11929-11934. doi:10.1073/pnas.1507387112
- Pope, B. D., Warren, C. R., Parker, K. K., & Cowan, C. A. (2016). Microenvironmental Control of Adipocyte Fate and Function. *Trends Cell Biol*, 26(10), 745-755. doi:10.1016/j.tcb.2016.05.005
- Puri, V., Ranjit, S., Konda, S., Nicoloso, S. M., Straubhaar, J., Chawla, A., . . . Czech, M. P. (2008). Cidea is associated with lipid droplets and insulin sensitivity in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(22), 7833-7838. doi:10.1073/pnas.0802063105
- Quinn, H. M., Vogel, R., Popp, O., Mertins, P., Lan, L., Messerschmidt, C., . . . Birchmeier, W. (2021). YAP and beta-Catenin Cooperate to Drive Oncogenesis in Basal Breast Cancer. *Cancer Res*, 81(8), 2116-2127. doi:10.1158/0008-5472.CAN-20-2801
- Rao, M. J., & Goodman, J. M. (2021). Seipin: harvesting fat and keeping adipocytes healthy. *Trends Cell Biol*, 31(11), 912-923. doi:10.1016/j.tcb.2021.06.003
- Rausch, V., & Hansen, C. G. (2020). The Hippo Pathway, YAP/TAZ, and the Plasma Membrane. *Trends Cell Biol*, 30(1), 32-48. doi:10.1016/j.tcb.2019.10.005
- Ringer, P., Colo, G., Fassler, R., & Grashoff, C. (2017). Sensing the mechano-chemical properties of the extracellular matrix. *Matrix Biol*, 64, 6-16. doi:10.1016/j.matbio.2017.03.004
- Rodriguez, A., Ezquerro, S., Mendez-Gimenez, L., Becerril, S., & Fruhbeck, G. (2015). Revisiting the adipocyte: a model for integration of cytokine signaling in the

- regulation of energy metabolism. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 309(8), E691-714. doi:10.1152/ajpendo.00297.2015
- Rossi, G., Manfrin, A., & Lutolf, M. P. (2018). Progress and potential in organoid research. *Nat Rev Genet*, 19(11), 671-687. doi:10.1038/s41576-018-0051-9
- Rutkowski, J. M., Stern, J. H., & Scherer, P. E. (2015). The cell biology of fat expansion. *J Cell Biol*, 208(5), 501-512. doi:10.1083/jcb.201409063
- Sanchez-Ceinos, J., Guzman-Ruiz, R., Rangel-Zuniga, O. A., Lopez-Alcala, J., Moreno-Cano, E., Del Rio-Moreno, M., . . . Malagon, M. M. (2021). Impaired mRNA splicing and proteostasis in preadipocytes in obesity-related metabolic disease. *Elife*, 10. doi:10.7554/eLife.65996
- Sano, H., Eiguez, L., Teruel, M. N., Fukuda, M., Chuang, T. D., Chavez, J. A., . . . McGraw, T. E. (2007). Rab10, a target of the AS160 Rab GAP, is required for insulin-stimulated translocation of GLUT4 to the adipocyte plasma membrane. *Cell Metab*, 5(4), 293-303. doi:10.1016/j.cmet.2007.03.001
- Savage, S. R., & Zhang, B. (2020). Using phosphoproteomics data to understand cellular signaling: a comprehensive guide to bioinformatics resources. *Clin Proteomics*, 17, 27. doi:10.1186/s12014-020-09290-x
- Schnoor, M., Cullen, P., Lorkowski, J., Stolle, K., Robenek, H., Troyer, D., . . . Lorkowski, S. (2008). Production of type VI collagen by human macrophages: a new dimension in macrophage functional heterogeneity. *J Immunol*, 180(8), 5707-5719. doi:10.4049/jimmunol.180.8.5707
- Schochlin, M., Weissinger, S. E., Brandes, A. R., Herrmann, M., Moller, P., & Lennerz, J. K. (2014). A nuclear circularity-based classifier for diagnostic distinction of desmoplastic from spindle cell melanoma in digitized histological images. *J Pathol Inform*, 5(1), 40. doi:10.4103/2153-3539.143335
- Sebo, Z. L., & Rodeheffer, M. S. (2019). Assembling the adipose organ: adipocyte lineage segregation and adipogenesis in vivo. *Development*, 146(7). doi:10.1242/dev.172098
- Seo, E., Basu-Roy, U., Gunaratne, P. H., Coarfa, C., Lim, D. S., Basilico, C., & Mansukhani, A. (2013). SOX2 regulates YAP1 to maintain stemness and determine cell fate in the osteo-adipo lineage. *Cell Rep*, 3(6), 2075-2087. doi:10.1016/j.celrep.2013.05.029
- Shao, X., Taha, I. N., Clauser, K. R., Gao, Y. T., & Naba, A. (2020). MatrisomeDB: the ECM-protein knowledge database. *Nucleic Acids Res*, 48(D1), D1136-D1144. doi:10.1093/nar/gkz849
- Shao, Z., Wang, K., Zhang, S., Yuan, J., Liao, X., Wu, C., . . . Jie, W. (2020). Ingenuity pathway analysis of differentially expressed genes involved in signaling pathways and molecular networks in RhoE geneedited cardiomyocytes. *Int J Mol Med*, 46(3), 1225-1238. doi:10.3892/ijmm.2020.4661
- Sharma, M., & Dey, C. S. (2021). AKT ISOFORMS-AS160-GLUT4: The defining axis of insulin resistance. *Rev Endocr Metab Disord*, 22(4), 973-986. doi:10.1007/s11154-021-09652-2
- Shen, J. X., Couchet, M., Dufau, J., de Castro Barbosa, T., Ulbrich, M. H., Helmstadter, M., . . . Lauschke, V. M. (2021). 3D Adipose Tissue Culture Links the Organotypic Microenvironment to Improved Adipogenesis. *Adv Sci (Weinh)*, 8(16), e2100106. doi:10.1002/advs.202100106

- Slayton, M., Gupta, A., Balakrishnan, B., & Puri, V. (2019). CIDE Proteins in Human Health and Disease. *Cells*, 8(3). doi:10.3390/cells8030238
- Sordella, R., Jiang, W., Chen, G. C., Curto, M., & Settleman, J. (2003). Modulation of Rho GTPase signaling regulates a switch between adipogenesis and myogenesis. *Cell*, 113(2), 147-158. doi:10.1016/s0092-8674(03)00271-x
- Spencer, M., Yao-Borengasser, A., Unal, R., Rasouli, N., Gurley, C. M., Zhu, B., . . . Kern, P. A. (2010). Adipose tissue macrophages in insulin-resistant subjects are associated with collagen VI and fibrosis and demonstrate alternative activation. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 299(6), E1016-1027. doi:10.1152/ajpendo.00329.2010
- Stamov, D. R., Muller, A., Wegrowski, Y., Brezillon, S., & Franz, C. M. (2013). Quantitative analysis of type I collagen fibril regulation by lumican and decorin using AFM. *J Struct Biol*, 183(3), 394-403. doi:10.1016/j.jsb.2013.05.022
- Stockli, J., Fazakerley, D. J., & James, D. E. (2011). GLUT4 exocytosis. *J Cell Sci*, 124(Pt 24), 4147-4159. doi:10.1242/jcs.097063
- Sun, K., Kusminski, C. M., & Scherer, P. E. (2011). Adipose tissue remodeling and obesity. *J Clin Invest*, 121(6), 2094-2101. doi:10.1172/JCI45887
- Sun, K., Li, X., & Scherer, P. E. (2023). Extracellular Matrix (ECM) and Fibrosis in Adipose Tissue: Overview and Perspectives. *Compr Physiol*, 13(1), 4387-4407. doi:10.1002/cphy.c220020
- Sun, K., Park, J., Gupta, O. T., Holland, W. L., Auerbach, P., Zhang, N., . . . Scherer, P. E. (2014). Endotrophin triggers adipose tissue fibrosis and metabolic dysfunction. *Nat Commun*, 5, 3485. doi:10.1038/ncomms4485
- Sun, K., Tordjman, J., Clement, K., & Scherer, P. E. (2013). Fibrosis and adipose tissue dysfunction. *Cell Metab*, 18(4), 470-477. doi:10.1016/j.cmet.2013.06.016
- Svensson, L., Narlid, I., & Oldberg, A. (2000). Fibromodulin and lumican bind to the same region on collagen type I fibrils. *FEBS Lett*, 470(2), 178-182. doi:10.1016/s0014-5793(00)01314-4
- Takahashi, T., Cho, H. I., Kublin, C. L., & Cintron, C. (1993). Keratan sulfate and dermatan sulfate proteoglycans associate with type VI collagen in fetal rabbit cornea. *J Histochem Cytochem*, 41(10), 1447-1457. doi:10.1177/41.10.8245404
- Taniguchi, C. M., Emanuelli, B., & Kahn, C. R. (2006). Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 7(2), 85-96. doi:10.1038/nrm1837
- Tchkonia, T., Tchoukalova, Y. D., Giorgadze, N., Pirtskhalava, T., Karagiannides, I., Forse, R. A., . . . Kirkland, J. L. (2005). Abundance of two human preadipocyte subtypes with distinct capacities for replication, adipogenesis, and apoptosis varies among fat depots. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 288(1), E267-277. doi:10.1152/ajpendo.00265.2004
- Theocharis, A. D., & Karamanos, N. K. (2019). Proteoglycans remodeling in cancer: Underlying molecular mechanisms. *Matrix Biol*, 75-76, 220-259. doi:10.1016/j.matbio.2017.10.008
- Theocharis, A. D., Manou, D., & Karamanos, N. K. (2019). The extracellular matrix as a multitasking player in disease. *FEBS J*, 286(15), 2830-2869. doi:10.1111/febs.14818
- Theocharis, A. D., Skandalis, S. S., Gialeli, C., & Karamanos, N. K. (2016). Extracellular matrix structure. *Adv Drug Deliv Rev*, 97, 4-27. doi:10.1016/j.addr.2015.11.001

- Vakaloglou, K. M., Chrysanthis, G., Rapsomaniki, M. A., Lygerou, Z., & Zervas, C. G. (2016). IPP Complex Reinforces Adhesion by Relaying Tension-Dependent Signals to Inhibit Integrin Turnover. *Cell Rep*, *14*(11), 2668-2682. doi:10.1016/j.celrep.2016.02.052
- Vila, I. K., Badin, P. M., Marques, M. A., Monbrun, L., Lefort, C., Mir, L., . . . Langin, D. (2014). Immune cell Toll-like receptor 4 mediates the development of obesity and endotoxemia-associated adipose tissue fibrosis. *Cell Rep*, *7*(4), 1116-1129. doi:10.1016/j.celrep.2014.03.062
- Voiles, L., Lewis, D. E., Han, L., Lupov, I. P., Lin, T. L., Robertson, M. J., . . . Chang, H. C. (2014). Overexpression of type VI collagen in neoplastic lung tissues. *Oncol Rep*, *32*(5), 1897-1904. doi:10.3892/or.2014.3438
- Walther, T. C., & Farese, R. V., Jr. (2012). Lipid droplets and cellular lipid metabolism. *Annu Rev Biochem*, *81*, 687-714. doi:10.1146/annurev-biochem-061009-102430
- Walther, T. C., Kim, S., Arlt, H., Voth, G. A., & Farese, R. V., Jr. (2023). Structure and function of lipid droplet assembly complexes. *Curr Opin Struct Biol*, *80*, 102606. doi:10.1016/j.sbi.2023.102606
- Ward, A. V., Anderson, S. M., & Sartorius, C. A. (2021). Advances in Analyzing the Breast Cancer Lipidome and Its Relevance to Disease Progression and Treatment. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, *26*(4), 399-417. doi:10.1007/s10911-021-09505-3
- Wei, L., & Shi, J. (2022). Insight Into Rho Kinase Isoforms in Obesity and Energy Homeostasis. *Front Endocrinol (Lausanne)*, *13*, 886534. doi:10.3389/fendo.2022.886534
- Wen, X., Zhang, B., Wu, B., Xiao, H., Li, Z., Li, R., . . . Li, T. (2022). Correction To: Signaling pathways in obesity: mechanisms and therapeutic interventions. *Signal Transduct Target Ther*, *7*(1), 369. doi:10.1038/s41392-022-01188-4
- Wernig, G., Chen, S. Y., Cui, L., Van Neste, C., Tsai, J. M., Kambham, N., . . . Weissman, I. L. (2017). Unifying mechanism for different fibrotic diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *114*(18), 4757-4762. doi:10.1073/pnas.1621375114
- Wernstedt Asterholm, I., & Scherer, P. E. (2016). Fibrosis-streaks and splatters: Some things are not always what they seem to be. *Obesity (Silver Spring)*, *24*(3), 552-553. doi:10.1002/oby.21430
- Wilfling, F., Wang, H., Haas, J. T., Kraemer, N., Gould, T. J., Uchida, A., . . . Walther, T. C. (2013). Triacylglycerol synthesis enzymes mediate lipid droplet growth by relocalizing from the ER to lipid droplets. *Dev Cell*, *24*(4), 384-399. doi:10.1016/j.devcel.2013.01.013
- Williams, A. S., Kang, L., & Wasserman, D. H. (2015). The extracellular matrix and insulin resistance. *Trends Endocrinol Metab*, *26*(7), 357-366. doi:10.1016/j.tem.2015.05.006
- Wolff, G., Taranko, A. E., Meln, I., Weinmann, J., Sijmonsma, T., Lerch, S., . . . Vegiopoulos, A. (2019). Diet-dependent function of the extracellular matrix proteoglycan Lumican in obesity and glucose homeostasis. *Mol Metab*, *19*, 97-106. doi:10.1016/j.molmet.2018.10.007
- Xiong, S., Tan, J., Wang, Y., He, J., Hu, F., Wu, X., . . . Mao, R. (2022). Fibrosis in fat: From other diseases to Crohn's disease. *Front Immunol*, *13*, 935275. doi:10.3389/fimmu.2022.935275

- Yamamoto, T., Matsuda, Y., Kawahara, K., Ishiwata, T., & Naito, Z. (2012). Secreted 70kDa lumican stimulates growth and inhibits invasion of human pancreatic cancer. *Cancer Lett*, 320(1), 31-39. doi:10.1016/j.canlet.2012.01.023
- Yu, F. X., Zhang, Y., Park, H. W., Jewell, J. L., Chen, Q., Deng, Y., . . . Guan, K. L. (2013). Protein kinase A activates the Hippo pathway to modulate cell proliferation and differentiation. *Genes Dev*, 27(11), 1223-1232. doi:10.1101/gad.219402.113
- Zaragosi, L. E., Wdziekonski, B., Fontaine, C., Villageois, P., Peraldi, P., & Dani, C. (2008). Effects of GSK3 inhibitors on in vitro expansion and differentiation of human adipose-derived stem cells into adipocytes. *BMC Cell Biol*, 9, 11. doi:10.1186/1471-2121-9-11
- Zmora, N., Bashirdes, S., Levy, M., & Elinav, E. (2017). The Role of the Immune System in Metabolic Health and Disease. *Cell Metab*, 25(3), 506-521. doi:10.1016/j.cmet.2017.02.006
- Zong, H., Bastie, C. C., Xu, J., Fassler, R., Campbell, K. P., Kurland, I. J., & Pessin, J. E. (2009). Insulin resistance in striated muscle-specific integrin receptor beta1-deficient mice. *J Biol Chem*, 284(7), 4679-4688. doi:10.1074/jbc.M807408200

