

Examination of ICER Level in Adipose Tissues of Obesity Patients

Vanessa Miguel¹, Ferreira José², Kleber Vanessa³

¹Facultad de Biología, Universidad Católica del Norte, Chile

²Facultad de Medicina, Universidad de Tarapacá de Arica, Chile

³Facultad de ciencias medicas, Universidad de La Serena, Chile

Abstract

Increased adiposity is associated with impairment in glucose uptake in adipocytes, which in part result from the diminished expression of GLUT4. Parallel to defective glucose metabolism, adipocytes display reduced production of the insulin-sensitizer adiponectin. An important mechanism responsible for decreased level of Glut4 and Adipoq in obesity is now advanced.

Keywords: Obesity, Adipocyte Function, Creb Activity, Adipose

Examen del Nivel de ICER en Tejidos Adiposos de Pacientes con Obesidad

Resumen

El aumento de la adiposidad se asocia con un deterioro en la absorción de glucosa en los adipocitos, que en parte se debe a la disminución de la expresión de GLUT4. Paralelamente al metabolismo defectuoso de la glucosa, los adipocitos muestran una producción reducida del adiponectina sensibilizador de insulina. Se ha avanzado un mecanismo importante responsable de la disminución del nivel de Glut4 y Adipoq en la obesidad.

Palabras clave: Obesidad, Función Adipocitaria, Actividad de la Crep, Adiposo

1. Introducción

La acumulación de grasa visceral en la obesidad es un fuerte factor de riesgo para enfermedades potencialmente mortales, como diabetes tipo 2, aterosclerosis, ovario-poliquístico síndrome, enfermedad del hígado graso no alcohólico y ciertos tipos de cáncer [1]. El aumento de la adiposidad está asociado con deterioro en la captación de glucosa en adipocitos, que en parte resultan de la expresión disminuida de GLUT4. Paralelo al metabolismo defectuoso de la glucosa, adipocitos mostrar una producción reducida del sensibilizador a la insulina adiponectina (Adipoq) [2]. Esta desregulación se considera como parte de una conversación cruzada que vincula la adiposidad con la insulina general resistencia en obesidad. Un mecanismo importante responsable para disminuir el nivel de Glut4 y Adipoq en obesidad ahora está avanzado. Esto implica que el cAMP responde a factores transcripcionales de la proteína de unión al elemento (CREB) [3]. La actividad transcripcional de Creb está normalmente elevada en adipocitos de ratones obesos alimentados con una dieta alta en grasas (HFD), resultando en la elevación de la expresión de su gen objetivo, Atf3. A su vez, Atf3 suprime la expresión de Glut4 y Adipoq y, por lo tanto, interrumpe la acción de la insulina en los adipocitos y causa resistencia sistémica a la insulina [4]. El impacto de mayor actividad de Creb se ha validado aún más al sobreexpresar una forma dominante negativa de Creb en adipocitos. Ratones con inactivación de Creb en adipocitos han mejorado la sensibilidad a la insulina y la glucosa en todo el cuerpo homeostasis pero masa grasa similar y peso corporal para controlar animales [5]. La actividad de los factores CREB es finamente sintonizado por el nivel del represor temprano cAMP inducible (ICER). ICER reprime la transcripción génica uniéndose a la secuencia CRE dentro de los promotores. Típicamente, ICER juega un papel dominante negativo al competir con todos los activadores transcripcionales sensibles a cAMP de CREB, Modulador CRE (CREM) y factor de transcripción activador familias para la unión a CRE [6]. La elevación de los niveles de ICER es normalmente transitoria, y desregulación en la expresión de este represor conduce a diversas patologías. En este artículo, probamos la hipótesis de que la transcripción activadora factor 3 (ATF3): reducción mediada de GLUT4 y ADIPOQ en adipocitos es la consecuencia de la disminución de ICER [7].

Todos los procedimientos en ratones se realizaron de acuerdo con la legislación suiza para la experimentación animal. Macho C57Bl6-Rj de seis semanas de edad los ratones se obtuvieron del Centro de cría de Janvier (Le Genest-Saint-Isle, Francia)[8]. Las dietas y las pinzas hiperinsulémicas-euglucémicas se realizaron como anteriormente descrito. Se extrajo tejido adiposo visceral epididimario (IVA) para la preparación total de ARN y proteínas en animales muertos[9].

2. Revisión de literature

Se obtuvieron aproximadamente 5 cm³ de IVA a nivel del epiplón de cinco mujeres blancas obesas (IMC .35 kg / m²) que fueron derivadas para cirugía de reducción de peso y cinco blancas no obesas mujeres (24, IMC, 28 kg / m²). Todos los pacientes dieron su consentimiento informado, y el estudio fue aprobado por la junta de revisión institucional[10]. El criterio para exclusión y fenotipado son los descritos previamente. ARN total se aisló de tejidos adiposos y diferentes fracciones celulares con TriPure reactivo de aislamiento (Roche) como se describió anteriormente[11]. El procedimiento para se realizó la preparación de adipocitos y la fracción vascular del estroma (SVF) como se describió anteriormente[12].

Se proporcionaron los anticuerpos contra CREM que reconocen ICER por E. Lalli (Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire, Universidad de Niza, Valbonne, Francia). Los anticuerpos contra los peludos y potenciadores de Split-1 (HES-1), CREB1, ATF3 e histona acetilasa 1 (HDAC1) se obtuvieron de Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA)[13].

Cultivo y diferenciación de células 3T3-L1 se llevaron a cabo como se describió anteriormente. La pequeña interferencia de 19 nucleótidos Mycosynth AG sintetizó el dúplex de ARN (siRNA) (siICER) (Balgach, Suiza). Para la sobreexpresión y el silenciamiento de Icer, adipocitos 3T3-L1 el día 7 postdiferenciación fueron electroporados con cualquiera de los plásmido que codifica Icer Ig (ICER) o siRNAs utilizando Gene Pulser XCell (Bio-Rad)[14].

Extractos de proteínas nucleares, occidentales la transferencia, EMSA y PCR en tiempo real se realizaron como se describió anteriormente. Los ensayos de PCR se llevaron a cabo en una PCR en tiempo real de un solo color Bio-Rad MyiQ sistema de detección utilizando Bio-Rad iQ SYBR Green Supermix, con 100 nmol / L cebadores y 1 ml de plantilla por 20 ml de PCR y una temperatura de recocido de 60 ° C. Las secuencias del cebador están disponibles en los Datos suplementarios[15].

3. Metodología

Los ensayos de absorción de 2-desoxiglucosa (2-DOG) fueron realizados en adipocitos 3T3-L1 completamente diferenciados (días 7 y 8) como anteriormente descrito. Los adipocitos fueron tratados sin (basal) o con insulina (100 pmol / L) durante 10 min. 2- [3H] DOG (0.1 mCi; concentración final, 0.01 mmol / L) y luego se añadieron 5 mmol / L de 2-DOG frío durante 10 minutos adicionales a 37 ° C. Análisis estadístico[16]. Los experimentos que incluyen dos grupos fueron analizados por Prueba t de Student o con el equivalente no paramétrico Wilcoxon[17].

Los ratones obesos alimentados con HFD presentan trastornos metabólicos similares a los observados en humanos[18]. La dieta de hecho condujo a un aumento del peso corporal del ratón, hiperinsulinemia, hiperglucemia y resistencia a la insulina, como lo indica una disminución marcada en la velocidad de infusión de glucosa en comparación con compañeros de camada alimentados con dieta de comida. En este modelo, elevación en la actividad transcripcional de Atf3 regula a la baja la expresión de Glut4 y Adipoq en tejido adiposo blanco (WAT), lo que contribuye a la sistémica resistencia a la insulina[19]. De acuerdo con estos datos, encontramos un aumento en la abundancia de Atf3 y disminución de expresión de Glut4 y Adipoq en WAT de ratones obesos en comparación con los animales de control[20]. El aumento de Atf3 se asoció con una sorprendente caída en Icer contenido en WAT de ratones obesos en comparación con el control animales tanto en ayunas como en condiciones de alimentación (datos no mostrados), lo que indica que la reducción en Icer en ratones obesos inducidos por HFD es independiente de los estados nutricionales. Para confirmar los datos obtenidos en ratones, analizamos tejidos adiposos de humanos no obesos y sujetos obesos. De acuerdo con los datos en control de animales, detectamos una cantidad menor de ARNm de ICER en el IVA de sujetos obesos. En contraste, la expresión de ICER se incrementó significativamente en subcutáneo tejido adiposo de individuos obesos. Estos resultados indican que el IVA y el tejido adiposo subcutáneo[21]. Es probable que las disfunciones isletarias dependan de mecanismos distintos. Como es el exceso de grasa visceral en lugar de subcutánea que está más asociado con un mayor riesgo de desarrollar enfermedad cardiovascular y síndrome metabólico, elegimos concentrar nuestro estudio en el IVA. Reducción de El ARNm de ICER en el IVA

de individuos obesos se asoció con un aumento en la expresión del objetivo CREB gen ATF3 y niveles disminuidos de ADIPOQ y GLUT4. Los EMSA se hicieron luego para confirmar los cambios en actividades vinculantes de Icer y Creb. Proteínas nucleares de WAT de ratones obesos se incubaron con un oligonucleótido marcado correspondiente al elemento de respuesta cAMP (CRE)[22]. Se observó una banda de migración rápida en WAT de ratones de control, que se redujo notablemente en ratones obesos. Por otro lado, un patrón de migración más lento apareció en WAT de ratones obesos que es casi indetectable en animales control. Se identificó la banda inferior como Icer porque combina con expresión exógena ICER-Ig, y la formación de este complejo fue selectivamente abrogado por la adición de un anticuerpo anti-CREM[23]. En presencia de un anticuerpo anti-Creb1, la migración de la banda superior observada en WAT de ratones obesos fue más lenta. Este resultado indica que los extractos nucleares de WAT de ratones obesos muestran un aumento en la actividad de unión de Creb. Este resultado, aunque el patrón de enlace correspondiente a ICER en IVA era diferente de WAT, la actividad de este factor se redujo en individuos obesos. La disminución en la actividad de ICER se asoció con una migración más lenta del complejo en el IVA de personas obesas, que era identificado como el factor CREB. Varios estímulos, incluida la insulina, pueden provocar la actividad de Creb. En línea con esto, encontramos que la infusión de insulina provocó un aumento de 16 veces en la expresión de Icer en ratones control[24]. Como se anticipó, la expresión de Icer inducida por insulina fue abolida en WAT resistente a la insulina de ratones obesos, indicando que la inducción de Icer también es defectuosa en animales obesos.

La caída de Icer en IVA y WAT de obesos humanos y los ratones, respectivamente, se restringieron a la fracción de adipocitos. De hecho, la expresión de ICER fue mayor en SVF de sujetos obesos mientras que no se modificó en SVF de ratones obesos. Las diferencias en SVF de ratones obesos y ratones posiblemente pueden indicar un diferencial de regulación entre especies asociadas a la obesidad. Como se anticipó, la disminución del nivel de Icer / ICER en los adipocitos paralelo al aumento en el nivel de ARNm de Atf3 / ATF3 y la disminución en Adipoq / ADIPOQ y Niveles de Glut4 / GLUT4[25].

Para confirmar la regulación de Atf3 por Icer, un plásmido de codificación de Icer-Ig se introdujo por electroporación en adipocitos 3T3-L1. Western blot y experimentos EMSA reveló una alta expresión de Icer. La sobreexpresión de Icer-Ig condujo a la reducción de Atf3 ARNm y, en consecuencia, un aumento de Glut4 y niveles de Adipoq[26]. Por otro lado, silenciar de Icer por interferencia de ARN elevó el contenido de Atf3 y disminuyó la abundancia de Glut4 y Adipoq tanto en adipocitos 3T3-L1 y fibroblastos. Como se esperaba, la desregulación génica evocada por silenciamiento de Icer resultó en deterioro de la insulina inducida. Captación de 2-DOG en adipocitos 3T3-L1.

4. Discusión

El aumento de la actividad de Creb en los adipocitos es responsable para la elevación en la expresión de Atf3 en obesos inducidos por HFD ratones. A su vez, el aumento de Atf3 reduce Adipoq y Glut4 contenidos, promoviendo así la resistencia a la insulina sistémica. En este informe, proporcionamos evidencia de que la expresión defectuosa de ICER, un antagonista natural de la transcripción CREB la actividad es responsable del aumento de la expresión de ATF3 y disfunción adipocitaria causada por CREB en obesidad. Encontramos que la disminución de ICER / Icer se correlaciona con un aumento en la actividad y expresión de Creb / CREB de Atf3 / ATF3 en tejidos adiposos inducidos por HFD ratones obesos e individuos obesos humanos. La reducción adiposa de Icer / ICER era específica de los adipocitos, lo que indica que el aumento de Atf3 en esta fracción es causado por la pérdida de represor. Manipulación in vitro del nivel de represor en adipocitos 3T3-L1 validado Atf3 como un objetivo gen de Icer y la posterior modificación en la expresión de Adipoq y Glut4. Finalmente, silenciando la expresión de Icer obstaculizó la absorción de grasas, lo que confirma el requisito de niveles de Icer apropiados para la función adipocitaria. A diferencia de los adipocitos, la expresión de Icer aumentó en SVF de individuos obesos humanos en comparación con individuos de control. Esta observación sugiere que la regulación de ICER difiere entre los tipos de células, posiblemente conduciendo a una modulación diferente de la actividad CREB en otras células ubicadas dentro de los tejidos adiposos. Adicionalmente se necesitarán estudios para determinar qué célula del estroma muestra mayores niveles de ICER y para investigar el potencial impacto funcional de esta elevación.

5. Conclusión

Actividad de la crep, y en consecuencia la expresión de Icer, puede ser inducido por diversos estímulos, incluida la insulina. En este respecto, encontramos que la insulina provocó un aumento en la expresión de Icer en animales control mientras que la insulina inducida la expresión del represor fue anulada en resistente a la insulina WAT de ratones obesos. El hecho de que la expresión de Icer en WAT de animales obesos se reduce tanto

en alimentos como en animales condiciones de ayuno, apoya una inducción deteriorada de Icer y, por lo tanto, un control negativo anormal de la actividad de Creb bajo condiciones estimulantes. Estados de regulación podría resultar en una actividad CREB persistentemente incrementada, que a su vez conduce a la expresión constitutivamente elevada de Atf3 y disminuida Glut4 y niveles de Adipoq. Se necesitan más estudios ahora para identificar el mecanismo que conduce a la expresión alterada de Icer en adipocitos en obesidad. Creemos que tal las investigaciones pueden allanar el camino para el diseño de nuevas estrategias terapéuticas o para mejorar los enfoques existentes para recuperar la función adiposa normal y la insulina sensibilidad.

Referencias

- [1] Cataño, J.G., Ramos-Hernández, A., Bravo-Balado, A., Mariño-Álvarez, Á.M., Caicedo, J.I., Trujillo, C.G., Plata, M. (2018) "Obesity and radical prostatectomy: The enigma continues", *Archivos Espanoles de Urologia*, 71(6), pp. 517-522.
- [2] Sánchez Naranjo, J.C., López Zapata, D.F., Duque, O.A.P. (2014) "Osteoarthritis, obesity and the metabolic syndrome", *Revista Colombiana de Reumatología*, 21(3), pp. 146-154.
- [3] Berzigotti, A., Abalde, J.G. (2013) "Impact of obesity and insulin-resistance on cirrhosis and portal hypertension", *Gastroenterología y Hepatología*, 36(8), pp. 527-533.
- [4] Unger, G., Benozzi, S.F., Perruzza, F., Pennacchiotti, G.L. (2013) "Cardiovascular risk in patients with Overweight or Obesity and mild decrease in glomerular filtration rate", *Revista Argentina de Endocrinología y Metabolismo*, 50(3), pp. 176-183.
- [5] Ruiz Morales, Ó.F., Otero Regino, W., Gómez Zuleta, M.A., Castro Soteldo, D. (2014) "Abdominal obesity increases the risks of colorectal polyps", *Revista Colombiana de Gastroenterología*, 29(4), pp. 376-382.
- [6] Mena-Ramírez, J.R., Franco-Marín, A.C., Proy-Trujillo, H., Eljure-López, N., González-Losa, M.R. (2014) "Frequent dermatoses observed in pediatric patients and its relationship with overweight and obesity in a rural area of southern of Mexico", *Dermatología Revista Mexicana*, 58(5), pp. 411-416.
- [7] Paredes Gómez, L., Gutierrez, J.M., Santiago, J.M.M., De Miguel Rodríguez, M.A., De Juana, A.M., Martos, C.O. (2018) "Evaluation of the effectiveness of a non-pharmacologic intervention based on worksite nutrition and physical activity for controlling employee overweight and obesity", *Revista de la Asociación Española de Especialistas en Medicina del Trabajo*, 27(1), pp. 9-16.
- [8] Delgado-López, P.D., Castilla-Díez, J.M. (2018) "Impact of obesity in the pathophysiology of degenerative disk disease and in the morbidity and outcome of lumbar spine surgery", *Neurocirugía*, 29(2), pp. 93-102.
- [9] Loera-Barragán, A., Sánchez-Nicolat, N., Flores-Escartín, M.H., Torres-Martínez, J.A., Serrano-Lozano, J.A., Lozano-Corona, R., Romero-Espinosa, L. (2017) "Prevalence of venous reflux by Doppler ultrasound in patients diagnosed with obesity in the Angiology and Vascular Surgery Department of the "Lic. Adolfo Lopez Mateos Regional Hospital" of the ISSSTE", *Revista Mexicana de Angiología*, 45(3), pp. 121-126.
- [10] Martín-Castellanos, A., Barca, F.J., Cabañas, M.D., Martín, P., García, M., Muñoz, M.A., Hoyos-Peña, C., Monago, P. (2015) "Obesity and anthropometric indicators in a sample of males with Acute Coronary Syndrome in a health area with inclusion of inmates: case-control study", *Revista española de sanidad penitenciaria*, 17(1), pp. 20-29.
- [11] López Facundo, N.A., Tejocote Romero, I., Rodríguez Castillejos, C., Jaimes García, Y. (2015) "Impact of obesity on survival and relapse prognosis in children with Acute Lymphoblastic Leukaemia in México State", *Gaceta Mexicana de Oncología*, 14(5), pp. 242-249.
- [12] Molina, H.S., Pérez, I.A., Alonso, A.A., Martínez, J.P.D., Castellanos, M.P., del Valle Laisequilla, C.F., García, J.G.R., Estrada, B.B., Alonso, A.A. (2015) "Economic burden of obesity and its comorbidities in adult patients in Mexico", *Pharmacoconomics - Spanish Research Articles*, 12(4), pp. 115-122.
- [13] Arroyo-López, P.E., Carrete-Lucero, L. (2015) "Scope of the actions to prevent overweight and obesity in teenagers. the Mexican public schools case", *Revista Gerencia y Políticas de Salud*, 14(28), pp. 142-160.
- [14] Navas López, J., Palacios Ramírez, J., Roca Gea, A. (2015) "An anthropological-social approach to childhood obesity: A case study in two schools in Valencia (Spain)", *Revista de Nutricao*, 28(2), pp. 155-163.
- [15] Soriano-Sánchez, T., Romero-Salinas, G., Viveros Alcaraz, M., Villanueva Reynoso, C., Shea McQuade, M., Gutiérrez Cárdenas, M.E. (2014) "A semiautomatic retractor for surgical interventions in obstetrics and gynecology: Usefulness inpatients with normal weight vs morbid obesity", *Clinica e Investigacion en Ginecología y Obstetricia*, 41(4), pp. 146-150.
- [16] Trujano Ruiz, P., De Gracia Blanco, M., Nava Quiroz, C., Limón Arce, G.R. (2014) "Overweight and obesity in Mexican preadolescents: A descriptive study, correlated variables and prevention guidelines", *Acta Colombiana de Psicología*, 17(1), pp. 119-130.

- [17] Calderón, D.I., Fernández, J.I. (2017) “Gymnema sylvestre in cases of overweight and obesity with diabetes mellitus type II, not adequately controlled with oral anti diabetic”, *Revista de Fitoterapia*, 17(2), pp. 117-131.
- [18] Abadía-Espés, N. (2017) “Breastfeeding and childhood obesity prevention. Review”, *Medicina Naturista*, 11(1), pp. 47-54.
- [19] Urrego, T., Vásquez, G.M., Gómez-Puerta, J.A. (2016) “Relationship between Obesity, Adipokines and Systemic Lupus Erythematosus”, *Revista de la Facultad de Ciencias Medicas (Cordoba, Argentina)*, 73(1), pp. 32-39.
- [20] López, J.N., Ramírez, J.P., Sánchez, P.M. (2014) “The other side of obesity: Reflections for a sociocultural approach”, *Ciencia e Saude Coletiva*, 19(6), pp. 1721-1729.
- [21] Álvarez Castaño, L.S., Estrada Restrepo, A., Goetz Rueda, J.D., Carreño Aguirre, C., Mancilla López, L.P. (2013) “The effects of socioeconomic status and short stature on overweight, obesity and the risk of metabolic complications in adults”, *Colombia Medica*, 44(3), pp. 146-154.
- [22] de Castro, M.L., Morales, M.J., Martínez-Olmos, M.A., Pineda, J.R., Cid, L., Estévez, P., del Campo, V., Rodríguez-Prada, J.I. (2013) “Safety and effectiveness of gastric balloons associated with a hypocaloric diet for the treatment of obesity”, *Revista Espanola de Enfermedades Digestivas*, 105(9), pp. 529-536.
- [23] Pulido-Castelblanco, D.P., Novoa-Gómez, M., Muñoz-Martínez, A.M. (2013) “Metacontingencial analysis to morbid obesity public health problema”, *Terapia Psicologica*, 31(2), pp. 239-247.
- [24] Leyva-Jiménez, R., Montesano-Delfín, J.R. (2011) “Management of obesity in medical units: A reflection on leadership in nutritional surveillance programs”, *Revista de Investigacion Clinica*, 63(1), pp. 104-105.
- [25] Sandoval-Salazar, C., Ramírez-Emiliano, J., Solís-Ortiz, S. (2013) “GABAergic inhibition system involved in the regulation of food intake and obesity”, *Revista Mexicana de Neurociencia*, 14(5), pp. 262-271.
- [26] Carral San Laureano, F., Cabo Navarro, D., Ayala Ortega, C., Gómez Rodríguez, F., Piñero Zaldivar, A., Prieto Ferrón, M., Jiménez Millán, A.I., Sanz Sanz, A., García Calzado, C. (2013) “Effectiveness of lifestyle intervention program in persons with obesity treated in a day hospital”, *Revista de Calidad Asistencial*, 28(5), pp. 285-290.