



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR

**"FAM129B es una proteína colaborativa que regula la
adipogénesis"**

TESIS

Que presenta:

M. EN C. JOSÉ ALFREDO VÁZQUEZ SANDOVAL

Para obtener el grado de
DOCTOR EN CIENCIAS

En la especialidad de
BIOLOGÍA CELULAR

Director de tesis

DR. WALID KURI HARCUC

Director de tesis

Dr. Walid Kuri Harcuch

Profesor Investigador del Departamento de Biología Celular

Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional

Asesores

Dr. Emiliano Fernando Navarro García

Profesor Investigador del Departamento de Biología Celular

Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional

Dr. Juan Pedro Luna Arias

Profesor Investigador del Departamento de Biología Celular

Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional

Dr. José Federico Bernardo Castro Muñoz Ledo

Profesor Investigador del Departamento de Biología Celular

Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional

Dr. Luis Antonio Salazar Olivo

Profesor Investigador de la División de Biología Molecular

Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica A.C

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo de investigación fue realizado en el laboratorio que dirige el Dr. Walid Kuri Harcuch en el Departamento de Biología Celular del Centro de Investigaciones y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, CINVESTAV-IPN.

El M. en C. José Alfredo Vázquez Sandoval fue apoyado con la beca número 338277 otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, CONACyT, para realizar los estudios de Doctorado en el programa Doctorado en Ciencias en la Especialidad de Biología Celular. A demás de contar con el Apoyo Extraordinario BC-EX-2020-673 y BC-EX-2022-342 que brinda el Departamento de Becas y Estímulos del CINVESTAV-IPN. Así mismo, se contó con el apoyo del programa Ayudante de Investigador con el número de expediente 19789, otorgado por CONACyT.

Este trabajo de investigación fue financiado con los recursos asignados por el proyecto CB-238719 y el proyecto ciencia de frontera no. CF-2019/2039 otorgados por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, CONACyT.

AGRADECIMIENTOS

A mi tutor el Dr. Walid Kuri Harcuch por permitirme incorporarme a su grupo de trabajo, por todo su apoyo y por todas las lecciones que me permitieron formarme dentro de la investigación científica.

A mi comité asesor, el Dr. José Federico Bernardo Castro Muñoz Ledo, el Dr. Emiliano Fernando Navarro García, el Dr. Juan Pedro Luna Arias y el Dr. Luis Antonio Salazar Olivo por su participación en este proyecto, por su paciencia, por las sugerencias y críticas realizadas con el fin de lograr un trabajo de excelencia.

A las auxiliares, la Dra. Ma. Cristina Amada Vélez del Valle y la Dra. Claudia Patricia Hernández Mosqueira por su apoyo técnico en el desarrollo del proyecto, así como todos sus consejos y sus enseñanzas.

A la técnico en enfermería Gloria Lazo Vázquez por su amabilidad y apoyo técnico en la preparación del material y soluciones de trabajo.

A la C. Miriam Karina Molina García por todo su apoyo y su asistencia secretarial.

Un agradecimiento especial a la Lic. Clara Hernández Chávez, por su apoyo incondicional, por su excelente asistencia secretarial, por toda su paciencia y por su amistad.

Al Dr. Jorge Enrique Morfín Galván por su profesionalismo y su apoyo técnico.

Al M. en C. Víctor Hugo Rosales García de la unidad de Citometría de Flujo por toda su paciencia, por sus enseñanzas y su apoyo técnico. Al M. en C. Emmanuel Ríos Castro y al C. Gustavo Félix Toyos Sánchez de la Unidad de Genómica, Proteómica y Metabolómica (UGPM) por su excelente apoyo técnico, por su paciencia y por la confianza que me brindaron. Ambas unidades dentro del Laboratorio Nacional de Servicios Experimentales (LaNSE).

A la M. en C. María Guadalupe Aguilar González por su apoyo en la secuenciación de productos de PCR. Al D.G. Juan Alberto Arvizu Montaña por su apoyo en la obtención de imágenes de los cultivos celulares.

DEDICATORIAS

A mi pareja Juan José Núñez Jiménez, por acompañarme a lo largo de estos años, por su apoyo incondicional, por sus palabras de aliento, por las llamadas de atención que necesité para retomar el rumbo correcto, por enseñarme a valorar las cosas que realmente importan en la vida, por ser un pilar fundamental en los momentos más difíciles. Por todo su amor, mil gracias.

A mi familia; mi mamá Ma. Eugenia Sandoval, por todo su amor y porque nunca hicieron falta sus palabras de motivación; a mis hermanos, Eugenia, Alejandra, Oscar y Sofía; y a mis sobrinos, Enrique, Alondra, María José, Ema y Emilio. Gracias por ser parte de mi familia.

A mi segunda familia; Guadalupe Núñez y Georgina Ávila, por recibirme en casa como su propio hijo; a Mariela y Yesi Núñez, por todo su cariño, apoyo y confianza; a Daniel Bahena y Amairany García por todo su apoyo.

A mis más grandes amigos; Itzel Castro, Alejandra Hernández, Paz Durán, Luis Díaz y Carlos Martínez, por ser una luz en el camino, por todos sus consejos, por su apoyo incondicional en los momentos más duros y por todas las experiencias que hicieron más ameno este viaje.

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	I
ÍNDICE DE TABLAS	II
RESUMEN	1
SUMMARY	2
INTRODUCCIÓN	3
Obesidad y sobrepeso, problema de salud en México	3
Disfuncionalidad del tejido adiposo.....	4
El tejido adiposo	5
Modelos de estudio.....	8
Diferenciación adiposa	10
FAM129B, panorama general.....	16
JUSTIFICACIÓN	23
HIPÓTESIS	24
OBJETIVOS.....	24
Objetivo general.....	24
Objetivos específicos.....	24
MATERIALES Y MÉTODOS	25
Materiales	25
Cultivo celular	25
Evaluación de la conversión adiposa.....	26
Extracción de RNA y síntesis de cDNA	27
Análisis de la expresión génica mediante PCR en tiempo real.....	28
Extracción de proteína total	28

Detección de proteínas por <i>Western Blot</i>	29
Silenciamiento y transfección	30
Tratamiento con fosfatasa	31
Inmunofluorescencia.....	31
Análisis estadístico	32
RESULTADOS.....	33
Expresión temprana y transitoria de <i>Fam129b</i> durante la adipogénesis ..	33
El silenciamiento de <i>Fam129b</i> bloquea la adipogénesis	35
<i>Fam129b</i> se expresa río abajo de <i>Cebpb</i> y río arriba de <i>Pparg2</i>	37
GSK3 β regula la expresión del gen <i>Fam129b</i>	37
GSK3 β regula la fosforilación de la proteína FAM129B	39
ERK1/2 fosforila a FAM129B para regular la adipogénesis.....	42
FAM129B se localiza en el citoplasma durante la adipogénesis	45
FAM129B regula la expansión clonal	48
DISCUSIÓN	53
BIBLIOGRAFÍA	63
ANEXO I	68
ANEXO II.....	68
ANEXO III.....	69

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura de la proteína FAM129B	20
Figura 2. Expresión del gen <i>Fam129b</i> durante la adipogénesis	34
Figura 3. Expresión de la proteína FAM129B durante la adipogénesis	35
Figura 4. El silenciamiento de <i>Fam129b</i> bloquea la adipogénesis.....	36
Figura 5. El silenciamiento de <i>Fam129b</i> sólo afecta la expresión de los genes tardíos de la adipogénesis	38
Figura 6. La inhibición de GSK3 β bloquea la adipogénesis y disminuye los niveles de <i>Fam129b</i>	39
Figura 7. GSK3 β regula la fosforilación de FAM129B durante la adipogénesis	41
Figura 8. El inhibidor U0126 bloquea la adipogénesis	43
Figura 9. ERK1/2 regula la fosforilación de FAM129B durante la inducción adipogénica.....	44
Figura 10. Localización de FAM129B durante el compromiso adipogénico	46
Figura 11. FAM129B no se asocia con el citoesqueleto de actina	47
Figura 12. FAM129B regula el tamaño de los clústeres.....	49
Figura 13. La expresión de <i>Fam129b</i> y la actividad de su proteína se encuentran incrementadas en células en crecimiento exponencial	51
Figura 14. Diagrama representativo de la participación del gen <i>Fam129b</i> como un elemento que regula positivamente la adipogénesis.....	57

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Lista de cebadores utilizados para RT-PCR	28
Tabla 2. Lista de anticuerpos	30
Tabla 3. Análisis <i>in silico</i> de la proteína FAM129B, con posibles sitios regulados por GSK3 β	40

RESUMEN

La proteína FAM129B, también conocida como proteína 1 parecida a Niban o MINERVA, está relacionada con una gran variedad de procesos, la mayoría de ellos en células neoplásicas. Algunos de estos procesos son la supresión de apoptosis, la migración y la respuesta antioxidante, dependiendo del contexto celular en el que ocurren, todos ellos también dependen directamente del estado de fosforilación de la proteína. En el presente trabajo demostramos que FAM129B es indispensable para la adipogénesis en la línea de preadipocitos 3T3-F442A. Nuestras evidencias mostraron que el gen *Fam129b* tuvo una expresión transitoria durante el compromiso de la diferenciación adiposa y se encuentra río abajo de los genes tempranos de la adipogénesis, como *Cebpb*, *Klf4*, *Klf5* y *Srebf1a*; sin embargo, se expresa río arriba de *Pparg2*, *Srebf1c*, *Fabp4* y *Gpdh*, genes que regulan la expresión del fenotipo. La cinasa ERK1/2 fosforiló a FAM129B durante los primeros minutos del compromiso, facilitando que GSK3 β , una cinasa crucial que dirige la ruta adipogénica, reconociera y fosforilara a FAM129B, reclutándola en la diferenciación adiposa. FAM129B no sólo se relacionó con el compromiso, sino también con la expansión clonal, ya que al eliminar al mensajero de *Fam129b* o inhibir la fosforilación de la proteína, se bloqueó la formación de cúmulos adiposos y su tamaño se vió limitado. El gen *Fam129b* también se expresó en tejido adiposo pardo, inguinal y epididimal, lo cual sugiere que juega una función importante en el desarrollo del tejido adiposo. Por lo tanto, concluimos que FAM129B es una proteína colaborativa que regula la adipogénesis.

SUMMARY

FAM129B, also known as Niban-like protein 1 or MINERVA, has been described in a wide variety of processes, most of them in neoplastic cells. Apoptosis suppression, cell migration, and the antioxidative response are some functions in which FAM129B has been implicated; depending on the cell context, all of them are supported by FAM129B phosphorylation. We show that FAM129B is required for adipogenesis in the 3T3-F442A preadipocytes. Our data show that *Fam129b* gene was transiently expressed during the commitment of adipose cell differentiation and is downstream of the early adipogenic genes like *Cebpb*, *Klf4*, *Klf5*, and *Srebf1a*, but upstream of *Pparg2*, *Srebf1c*, *Fabp4*, and *Gpdh*, genes that regulate phenotypic expression. The kinase ERK1/2 phosphorylated FAM129B in the first minutes of cell commitment, facilitating that GSK3 β , a crucial kinase that drives the adipogenic pathway, to recognize and phosphorylate FAM129B, recruiting it to participate in adipose cell differentiation. FAM129B was involved not only during the commitment stage but also in clonal expansion regulation since *Fam129b* knockdown or inhibiting its phosphorylation blocked adipocyte cluster formation and limited their size. The *Fam129b* gene was also expressed in BAT, inguinal, and epididymal fat, suggesting that it may play a very important role in adipose tissue development. We conclude that FAM129B is a cooperative protein that regulates differentiation during the early stages of adipogenesis.

INTRODUCCIÓN

Obesidad y sobrepeso, problema de salud en México

La obesidad y el sobrepeso son enfermedades crónicas multifactoriales que se originan por el incremento en los depósitos de grasa corporal. La genética de cada individuo, la salud mental, el acceso a servicios de salud, factores socioeconómicos, condiciones medioambientales, la dieta y los patrones de actividad física son los principales determinantes que permiten el desarrollo de obesidad y sobrepeso (Lobstein et al., 2022; WHO, 2021).

Estas enfermedades pueden ser evaluadas a través del Índice de Masa Corporal (BMI, por sus siglas en inglés). Esta variable depende de la proporción entre la masa y la altura del individuo, de manera que un BMI mayor o igual a 25 kg/m^2 determina que una persona tiene sobrepeso, mientras que un BMI igual o mayor a 30 kg/m^2 indica obesidad (WHO, 2021). Además, la obesidad puede ser evaluada de acuerdo a su severidad en tres clases: la clase I con un BMI mayor o igual a 30 kg/m^2 ; la clase II presenta índices mayores o iguales a 35 kg/m^2 ; y la clase III es para valores mayores o iguales a 40 kg/m^2 (WHO, 2000).

Este problema de salud incrementa el factor de riesgo para desarrollar algunas patologías como la diabetes, enfermedades cardiovasculares, hepatopatías, desórdenes músculo-esqueléticos e incluso cáncer (WHO, 2021). Durante la pandemia ocasionada por COVID-19, la obesidad ha sido el segundo marcador más importante de comorbilidad, por detrás de la edad, para

determinar un mayor riesgo de complicaciones y una tasa de mortalidad elevada (Lobstein et al., 2022).

En México, más del 70% de la población vive con obesidad o sobrepeso (World-Obesity, 2022) y se prevé que en los siguientes años, la obesidad presente una tasa de aumento del 1.6% en adultos y 2.5% en niños (Lobstein et al., 2022). Mientras tanto, las consecuencias de padecer obesidad y sobrepeso en México, se ven reflejadas claramente en las principales causas de fallecimiento, donde las enfermedades cardiovasculares ocupan el segundo lugar, detrás de los decesos por COVID-19, mientras que los relacionados a la diabetes ocupan el tercer lugar (INEGI, 2022).

Para hacer frente a este problema de salud en México, en los últimos años se han utilizado estrategias como la concientización de la población, etiquetado de alimentos para indicar exceso de grasas, azúcares y sodio, programas alimentarios, programas de servicios de salud y programas fiscales (World-Obesity, 2022). Sin embargo, aún queda mucho camino por delante para desarrollar programas efectivos que permitan disminuir las tasas de obesidad y sobrepeso en el país.

Disfuncionalidad del tejido adiposo

La obesidad es la principal consecuencia de la disfuncionalidad del tejido adiposo, que se desarrolla en el organismo debido a un consumo crónico y excesivo de calorías que ocasiona un aumento en el tamaño de los adipocitos debido al exceso de lípidos intracelulares acumulados; a este proceso se le

conoce como hipertrofia (Richard et al., 2020). De manera consecuente, los adipocitos secretan diversas citocinas, denominadas adipocinas, que favorecen el reclutamiento de preadipocitos y su diferenciación en adipocitos maduros, con el fin de compensar el estrés metabólico. Al incremento desmedido en el número de adipocitos se le conoce como hiperplasia (Chait and den Hartigh, 2020). No obstante, en el momento en que la hipertrofia y la hiperplasia se ven rebasadas, la grasa comienza a acumularse de forma ectópica en las vísceras, el hígado, los músculos o el páncreas, facilitando el desarrollo del síndrome metabólico, la inflamación crónica, la resistencia a insulina y/o problemas de hipertensión (Chait and den Hartigh, 2020).

El tejido adiposo

El tejido adiposo es uno de los órganos más abundantes en el organismo; en un adulto sano representa aproximadamente el 20% de su masa corporal y desempeña una función muy importante en la homeostasis de lípidos y glucosa, en el almacén de energía, la comunicación endocrina y la respuesta inmune, por mencionar algunos ejemplos (Fantuzzi and Mazzone, 2007; Richard et al., 2020). De acuerdo con su distribución, podemos distinguir dos tipos de depósitos, el tejido adiposo subcutáneo y el tejido adiposo visceral. El depósito subcutáneo comprende cerca del 80% de todo el tejido adiposo, en adultos sanos, y tiene como funciones principales almacenar energía en forma de triglicéridos, ser un aislante térmico, funcionar como barrera ante infecciones dérmicas y funge como protector contra el estrés mecánico externo. Asimismo, podemos subdividirlo en región alta (localizada en el tronco) y en región baja

(localizada en glúteos y femorales) (Chait and den Hartigh, 2020; Kwok et al., 2016). Por otra parte, el depósito visceral se encuentra en la cavidad abdominal y torácica, envolviendo los órganos internos. Dependiendo del órgano al que están asociados, podemos distinguir tejidos epicárdicos, situados junto al corazón; el tejido perivascular, que rodea a los vasos sanguíneos; o el omental, que se encuentra junto al estómago (Chait and den Hartigh, 2020).

El órgano adiposo está conformado, además de adipocitos y células troncales mesenquimales, por distintos tejidos como el vascular y el nervioso; también es posible encontrar fibroblastos y diversas células del sistema inmune (Fantuzzi and Mazzone, 2007).

Dependiendo de su origen y de las funciones que desempeña el tejido adiposo, podemos distinguir tres tejidos distintos: el tejido adiposo blanco (WAT, por sus siglas en inglés) el tejido adiposo pardo (BAT, por sus siglas en inglés) y el tejido adiposo beige (en inglés Brite, por la contracción de Brown in White).

Los adipocitos blancos tienen una morfología esférica y acumulan lípidos en una gran gota que desplaza al resto de los organelos y el núcleo, a la periferia de la célula (Richard et al., 2020). Las principales funciones del tejido adiposo blanco son mantener un balance energético acumulando el exceso de lípidos y carbohidratos en forma de triglicéridos y liberando ácidos grasos no esterificados cuando el organismo aumenta su demanda energética. También regula el metabolismo de glucosa, la ingesta de alimentos o la sensibilidad hacia la insulina (Chait and den Hartigh, 2020; Kwok et al., 2016).

Los adipocitos pardos tienen una morfología más elipsoidal y acumula en su interior múltiples gotas de lípidos de tamaño menor a la gota lipídica formada en los adipocitos blancos. Así mismo, cuenta con un número mayor de mitocondrias, lo que brinda un aspecto marrón al tejido adiposo pardo (Fantuzzi and Mazzone, 2007; Richard et al., 2020). En un humano sano el tejido pardo representa del 1 al 2% del tejido adiposo total, es ligeramente más abundante en mujeres; su actividad y abundancia varían con la edad y con los cambios de estación invierno-verano (Chait and den Hartigh, 2020; Richard et al., 2020). Su función principal está relacionada con la regulación de la temperatura corporal, produciendo calor a través del desacople de la producción de ATP en las mitocondrias (Chait and den Hartigh, 2020). Asimismo, también tiene capacidad endócrina al secretar algunas adipocinas cuyas funciones han sido poco estudiadas (Chait and den Hartigh, 2020).

El tejido adiposo beige, se encuentra principalmente dentro de los depósitos del tejido blanco, ya que ambos provienen de un progenitor común (progenitor que no expresa el marcador Myf-5); no obstante, este tejido muestra una morfología y función intermedia entre el tejido blanco y el tejido pardo (Cereijo et al., 2015). El tejido beige tiene una tasa elevada en su actividad metabólica bajo condiciones muy particulares, como la exposición al frío, el ejercicio o cambios en la dieta, por mencionar algunos ejemplos (Chait and den Hartigh, 2020).

Modelos de estudio

Las principales estrategias para abordar el tema se basan en modelos *in vivo* (modelos animales) y modelos *in vitro* (modelos de líneas celulares), con la finalidad de reproducir distintas características propias del tejido adiposo que permitan manipular, analizar y comprender los distintos mecanismos relacionados con este tejido y sus enfermedades. Los modelos *in vivo* se abordan a partir de dos perspectivas, los genéticos y los no genéticos. En los primeros se utilizan mutaciones inducidas o endógenas para evaluar su efecto en el desarrollo de la obesidad (Suleiman et al., 2020). Los modelos no genéticos se basan en diversas estrategias, como cambios en la dieta, los fotoperíodos o las intervenciones quirúrgicas, con el fin de generar problemas de obesidad en los animales y evaluar sus consecuencias en el tejido adiposo (Suleiman et al., 2020).

Las estrategias de estudio a través de modelos *in vitro* son muy diversas y están relacionadas con distintas especies, siendo las más comunes las líneas celulares de ratón. A partir de ellas podemos analizar desde el proceso de diferenciación adiposa hasta la respuesta de los adipocitos maduros. Dada la gran variedad de líneas celulares disponibles, es necesario conocer los atributos que debe tener una línea celular para que sea considerada como un modelo confiable. Aquellas líneas constituidas por poblaciones homogéneas, estables a lo largo de múltiples pasajes, alta susceptibilidad a estímulos adipogénicos, una tasa elevada de diferenciación adiposa y su similitud con el

tejido adiposo, son características que distinguen a una línea celular como un buen modelo de estudio (Ruiz-Ojeda et al., 2016).

Entre los mejores modelos para abordar la diferenciación adiposa se encuentran los derivados de la línea celular de fibroblastos 3T3. Esta línea celular se obtuvo de embriones de ratón suizo de 17-19 días (Todaro and Green, 1963) y a partir de ella se obtuvieron las subclonas 3T3-L1 y 3T3-F442A, que sobresalen por su capacidad de responder ante condiciones adipogénicas y dar lugar a adipocitos maduros (Green and Kehinde, 1974; Green and Kehinde, 1976). La subclona 3T3-F442A destaca por su elevada tasa de conversión adiposa y su capacidad de responder a señales fisiológicas, ya que al introducir esta línea dentro de ratones atímicos da lugar a la formación de cojinetes de grasa blanca idénticos a los del hospedero (Green and Kehinde, 1979; Mandrup et al., 1997).

A pesar de ser consideradas preadipocitos, las líneas celulares 3T3-L1 y 3T3-F442A no se encuentran totalmente restringidas, y es posible diferenciarlas a otros linajes celulares, como son los macrófagos en el caso de 3T3-L1 (Charriere et al., 2003) u osteoblastos por parte de la línea 3T3-F442A (Skillington et al., 2002). Su capacidad de diferenciación adiposa ha facilitado el estudio intensivo de la adipogénesis por décadas, lo que ha permitido identificar diversos factores que inducen la diferenciación adiposa, como la hormona de crecimiento (Morikawa et al., 1982), el suero de ternera (Kuri-Harcuch and Green, 1978) y la estaurosporina (St) (Diaz-Velasquez et al., 2008). Incluso, existen moduladores que ayudan a potenciar la respuesta adipogénica en

ambas líneas, tales como prostaglandina F₂ α , 1-metil-3-isobutil xantina (Mix) (Russell and Ho, 1976), dexametasona (Dex) (Rubin et al., 1978) o la indometacina (Williams and Polakis, 1977).

El presente trabajo se desarrolló en la línea celular 3T3-F442A, pues como se expuso anteriormente, tiene diversas características que la convierten en uno de los mejores modelos para estudiar la adipogénesis en tejido adiposo blanco.

Diferenciación adiposa

La diferenciación adiposa es un proceso complejo que puede ser inducido a través de distintos estímulos, la mayoría de ellos requieren de al menos 48 horas para lograr establecer el compromiso hacia el linaje adiposo. Previo al inicio de la adipogénesis, es necesario que los cultivos hayan alcanzado un estado de reposo para que aumenten la susceptibilidad al estímulo adipogénico, esto se logra llevándolos hasta 2 días posteriores a la confluencia (Pairault and Green, 1979).

Durante el proceso de diferenciación se distinguen claramente tres etapas: el compromiso, la expansión clonal y la expresión del fenotipo (Diaz-Velasquez et al., 2008). En la primera etapa, se recluta a las células susceptibles a los estímulos adipogénicos, iniciando una cascada de señalización que coordina cambios de expresión genética orientados hacia la adipogénesis.

La segunda etapa del proceso de diferenciación es la expansión clonal, donde cada una de las células que se ha comprometido en la ruta adipogénica lleva a cabo de 2 a 5 rondas de división celular para dar lugar a un conjunto de adipocitos denominado cúmulo o clúster; el número total de clústeres nos refleja el potencial adipogénico del cultivo (Diaz-Velasquez et al., 2008). Esta etapa inicia alrededor de las 36 horas posteriores al inicio del estímulo adipogénico (Castro-Muñozledo et al., 2003).

Finalmente, durante la tercera etapa, podemos observar las características distintivas de los adipocitos como la acumulación de grandes gotas de lípidos, un metabolismo muy activo y la expresión de una serie de marcadores que regulan dicho proceso como *Pparg2* (Peroxisome proliferator-activated receptor gamma isoform-2), *C/EBPα* (CCAAT/enhancer binding protein alpha) o *Srebf1c* (Sterol-regulatory element binding protein-1c) (Bommer and MacDougald, 2011; Cao et al., 1991; Tontonoz et al., 1994).

En contraste con los modelos con estímulos de 48 horas, el modelo de Estaurosporina-Dexametasona (St/Dex) requiere un período corto de inducción de 4 horas para reclutar a los preadipocitos en la ruta de la adipogénesis. Una de las principales características de este modelo es que, durante la etapa del compromiso, se reconocen dos eventos: la inducción mediante el estímulo con St por 4 horas, seguido de un período de estabilización que va de las 4 a las 48 horas una vez iniciado el estímulo adipogénico. Durante el período de estabilización es posible detener el compromiso adipogénico mediante algunos

inhibidores como el ácido retinoico (Diaz-Velasquez et al., 2008) o TNF α (Castro-Muñozledo et al., 2003).

A nivel molecular, la diferenciación adiposa es un proceso muy complejo; distintas rutas de señalización se conjugan a través de una regulación muy fina que permite que el proceso se lleve a cabo. Al iniciar el estímulo con St/Dex se genera un incremento en el flujo de calcio intracelular mediado por canales de calcio dependientes de voltaje tipo-T, que favorecen junto con St a la activación de la cinasa GSK3 β (glycogen synthase kinase 3 β) (Diaz-Velasquez et al., 2008). La St es un inhibidor de proteínas cinasas, que tiene la capacidad de activar a GSK3 β favoreciendo su fosforilación en el aminoácido Tyr²¹⁶, el cual sólo es un prerrequisito para su activación (Koivisto et al., 2003). Para que GSK3 β complete su estado de activación, es necesario que disminuya la fosforilación en el aminoácido Ser⁹, residuo que determina la inactividad de la cinasa, en cuyo caso, la St también tiene la capacidad de promover este cambio en el estado de fosforilación de GSK3 β (Koivisto et al., 2003).

La cinasa GSK3 β tiene una función central en la ruta de señalización de la diferenciación adiposa. Una vez activa, es responsable de inhibir la ruta de Wnt/ β -catenina a través del complejo de destrucción, formado por Axina, APC y CK1, que promueve la fosforilación y consecuentemente la ubiquitinación y degradación de β -catenina (MacDonald et al., 2009). Durante la adipogénesis la regulación de la vía Wnt/ β -catenina es esencial, ya que al encontrarse activa bloquea la expresión de C/EBP α y PPAR γ 2, dos proteínas centrales que regulan la expresión del fenotipo adiposo (Bennett et al., 2002).

Además de regular la actividad de la vía Wnt/ β -catenina, GSK3 β dirige la ruta principal de la adipogénesis, iniciando con la fosforilación de C/EBP β (CCAAT/enhancer-binding protein beta) en su residuo Ser¹⁸⁴ y Thr¹⁷⁹ (Tang et al., 2005). Sin embargo, para que este factor de transcripción sea activado por GSK3 β , es necesario que previamente sea fosforilado por la cinasa ERK1/2 (extracellular signal-regulated kinase 1/2) en su residuo Thr¹⁸⁸ (Tang et al., 2005). Esta activación mediada por ERK1/2 es indispensable para activar el sitio consenso de reconocimiento para GSK3 β , cuya secuencia requiere de la estructura SXXXpS, donde S representa al aminoácido de serina que será susceptible de ser fosforilado por GSK3 β , siempre y cuando a cuatro aminoácidos de distancia esté presente una serina previamente fosforilada (pS); X representa cualquier aminoácido (Fiol et al., 1987).

Al encontrarse activo C/EBP β , se transloca al núcleo y participa en la regulación de la expansión clonal (Guo et al., 2015), así como también favorece la expresión de algunos genes cruciales para la expresión del fenotipo adiposo, tales como *Srebf1a* (Sterol-regulatory element binding protein-1a), *Klf5* (Krüppel-like factor 5), *Cebpa* y *Pparg2* (Ayala-Sumuano et al., 2011; Oishi et al., 2005; Tang and Lane, 1999; Wu et al., 1996). Así mismo, a nivel transcripcional, el gen *Cebpb* se encuentra muy activo durante la inducción adipogénica mostrando una expresión transitoria que inicia a los 30 minutos y alcanza sus niveles más altos a las 2 horas posteriores al estímulo con St/Dex (Ayala-Sumuano et al., 2011). La expresión de *Cebpb* está regulada por KLF4 (Krüppel-like factor 4) (Birsoy et al., 2008).

Dentro de la etapa del compromiso también participan otros elementos en la cascada de la adipogénesis. Los factores de transcripción KLF4 y KLF5 muestran una actividad transitoria, ambos elevan sus niveles de transcripción a partir de los 30 minutos postinducción, alcanzando niveles máximos a las 2 y 3 horas respectivamente (Cervantes-Camacho et al., 2015). Es posible que KLF4 se encuentre regulado a través de la cascada de las MAPK (mitogen-activated protein kinases); esta cascada se activa durante las primeras 2 horas del proceso de diferenciación a través de la insulina presente en el medio no adipogénico (Prusty et al., 2002). Al encontrarse activa la ruta de las MAPK, se favorece la activación del factor de transcripción E2F1, responsable directo de la transcripción del gen *Klf4* (Riverso et al., 2017). Por otra parte, una ruta alterna para la activación del gen *Klf4* es mediada por cAMP (cyclic adenosine monophosphate) (Birsoy et al., 2008). Mientras tanto, KLF5 está regulado a través de C/EBP β/δ y favorece directamente la expresión de *Pparg2* (Oishi et al., 2005).

Otro gen que participa en las primeras horas del compromiso adipogénico es *Srebf1a*, el cual incrementa sus niveles de expresión alrededor de 1 hora posterior al estímulo adipogénico, alcanzando sus niveles más altos a las 24 horas y manteniendo una expresión estable durante el resto del proceso de diferenciación (Ayala-Sumuano et al., 2011). Este gen desempeña una función importante al favorecer la expresión de *Pparg2* (Ayala-Sumuano et al., 2011).

Durante la segunda parte del compromiso adipogénico, ocurre la remodelación del citoesqueleto. La cantidad de actina total presente en los adipocitos disminuye un 90%, mientras que la α/β -tubulina y la vimentina se reducen hasta un 95% (Spiegelman and Farmer, 1982). Estos cambios en el contenido de la proteína también se observan a nivel de RNA mensajero (Spiegelman and Farmer, 1982). Si bien, la remodelación del citoesqueleto no es la consecuencia de la acumulación de triglicéridos en el interior de los adipocitos, ya que, al inducir la diferenciación adiposa en un medio libre de biotina, la expresión del fenotipo se lleva a cabo de manera exitosa, pero con una acumulación de lípidos muy baja (Kuri-Harcuch and Green, 1978), sugiriendo que los cambios que le ocurren al citoesqueleto son propios del programa de diferenciación (Castro-Munozledo et al., 1987). Por lo tanto, la remodelación del citoesqueleto, está relacionada con la expresión de enzimas lipogénicas y es necesario que ocurra una disminución en su expresión y su despolimerización para que se abra paso a la traducción de enzimas encargadas de sintetizar las gotas de lípidos, como GPD (glycerophosphate dehydrogenase) o la enzima málica (Castro-Munozledo et al., 1987), siendo permisiva la remodelación del citoesqueleto para la acumulación de lípidos y no una consecuencia.

Durante la expansión clonal, C/EBP β regula la expresión de algunos genes que participan en el inicio de la replicación del DNA, como *Cdc45l*, *Mcm3* y *Gins1* que controlan la progresión del ciclo celular en la fase S (síntesis de DNA), y de genes asociados a la fase M (mitosis) como *Cdc25c*; algunas

histonas como *H4c1*. Así también participa en la modulación de enzimas reguladoras de histonas como KDM4B o G9A; y está involucrada en la expresión de otras proteínas que regulan la expansión clonal pero su papel no está del todo claro, como el caso de *Pkm2* (pyruvate kinase M2) (Guo et al., 2015).

Dentro de la etapa de la expansión clonal también se han identificado distintos moduladores que favorecen este proceso, tales como IGF-1 (Insulin-like growth factor type 1) (Green et al., 1985), la insulina (Castro-Muñozledo et al., 2003) y la T3 (Triyodotironina) (Flores-Delgado et al., 1987).

Finalmente, durante la última etapa del proceso de diferenciación se expresan de forma estable una serie de marcadores que regulan la síntesis de triglicéridos, la homeostasis de glucosa, la beta oxidación de ácidos grasos o el transporte de lípidos. A partir de 7 horas postinducción, los niveles de *Pparg2* incrementan, seguidos por la expresión de *Cebpa* hasta las 15 horas, mientras que *Sreb1c* y *Fabp4* (Fatty acid binding protein 4) incrementan a partir de las 30 horas. Todos estos genes alcanzan sus niveles máximos de expresión hasta las 72 horas (Ayala-Sumuano et al., 2011).

FAM129B, panorama general

La proteína FAM129B (family with sequence similarity 129, member B) pertenece a una pequeña familia de tres elementos. También se le conoce como *Niban-like protein 1* o Niban 2 relacionándola con el miembro A de su familia, FAM129A o Niban, nombre acuñado por el grupo de trabajo de Majima

(2000), que significa “segundo” en japonés, dado que fue el segundo gen descrito por su grupo de trabajo relacionado con cáncer renal (Majima et al., 2000). FAM129B y Niban comparten una similitud de un 40%, ambos poseen un dominio PH (homólogo a Plekstrina); mientras que comparado con el tercer componente de la familia, FAM129C, sólo existe un 27% de identidad (Old et al., 2009). Otro nombre que se ha propuesto para esta proteína es MINERVA (melanoma invasion by ERK), propuesto por Old y sus colaboradores, quienes aportaron el primer trabajo que sugirió la función que desempeña FAM129B en neoplasias (Old et al., 2009).

FAM129B es una proteína poco estudiada y tiene una masa molecular de 85 kDa; los ortólogos de humano y ratón comparten una similitud del 90% (UniProt, 2021). Cerca del extremo amino terminal, FAM129B contiene un dominio PH entre los residuos Arg⁶⁸-Arg¹⁹² (Figura 1a) (UniProt, 2021). Este dominio favorece la interacción con fosfolípidos de membrana; en el caso puntual de FAM129B, le permite unirse a PI3P (phosphatidylinositol 3-phosphate) (Catimel et al., 2013) y al ácido fosfatídico, donde el extremo carboxilo terminal de la proteína y el residuo Gly², regulado por miristilación, tienen un papel muy importante coordinando la afinidad del dominio PH por los fosfolípidos y su localización en la membrana (Hahn et al., 2020). Asimismo, el dominio PH también confiere a FAM129B la capacidad de interactuar con receptores de membrana o GEFs (guanine nucleotide exchange factor) (Ji et al., 2016).

Subsecuente al dominio PH, se encuentra una región compuesta por un conjunto de α -hélices, cuya estructura terciaria tiene una arquitectura que no se observa en ninguna otra proteína conocida, lo que permite conformar dos cavidades en la estructura globular de la proteína que posiblemente le permiten fungir como una plataforma de unión para interactuar con otras proteínas (Figura 1b) (Hahn et al., 2020).

Finalmente, en el extremo C-terminal, la proteína presenta una región flexible entre los residuos Asp⁵⁷⁵-Phe⁷⁴⁶ (Hahn et al., 2020). Se le denomina región flexible porque la estructura terciaria es desordenada, lo que impide su análisis por cristalografía (Hahn et al., 2020) e incluso los programas computacionales más potentes de los que disponemos para predecir estructuras de proteínas como AlphaFold, arrojan modelos de predicción con márgenes de confianza menores al 50% (Figura 1c) (Jumper et al., 2021; Varadi et al., 2022).

Dentro del extremo C-terminal de la proteína se encuentran regiones de regulación muy interesantes, iniciando por el residuo Tyr⁵⁹³, que es susceptible de ser fosforilado por EGFR (epidermal growth factor receptor), permitiéndole a FAM129B interactuar con Ras y consecuentemente activar la cascada de las MAPK (Ji et al., 2016). Además, en el ortólogo de humano encontramos un dominio rico en prolinas entre los aminoácidos Pro⁶³⁹-Pro⁶⁹⁷ (Pro⁶⁴⁵-Pro⁷⁰⁰ en el ortólogo de ratón) (UniProt, 2021). Este tipo de dominios son muy comunes en las proteínas que participan en procesos de señalización, brindando la capacidad de interactuar con una enorme variedad de proteínas que posean los

dominios SH3 (Src homology 3), WW (por su motivo conservado de Trp-Trp), EVH1 (Enabled/VASP homology) y GYF (por su dominio Gly-Tyr-Phe). Este dominio permite la participación en procesos como proliferación, reorganización del citoesqueleto o señalización postsináptica, por mencionar algunos ejemplos (Zarrinpar et al., 2003). En el caso de FAM129B, el dominio rico en prolinas le permite interactuar con la cinasa ERK1/2, facilitando que FAM129B sea fosforilado en diversos residuos de serina que se encuentran dentro de este dominio. El trabajo de Old (2009), demostró que existen 6 residuos de serina que pueden ser fosforilados dentro del dominio rico en prolinas, donde los residuos Ser⁶⁴¹, Ser⁶⁴⁶, Ser⁶⁹² y Ser⁶⁹⁶ son fosforilados directamente por ERK1/2; la Ser⁶⁶⁵ es fosforilada sólo cuando ERK1/2 se encuentra inactivo y la fosforilación en Ser⁶⁸¹ es independiente de la regulación mediada por ERK1/2.

A una distancia de pocos aminoácidos posteriores al dominio rico en prolina, se encuentra un pequeño motivo denominado DLG-ETGE (por la secuencia de aminoácidos que lo conforman) entre los residuos Asp⁷⁰⁸-Glu⁷²¹ (UniProt, 2021). El motivo DLG-ETGE le da la capacidad a FAM129B de interactuar con el dominio Kelch de la proteína KEAP1 (Kelch-like ECH-associated protein 1) adaptadora para ubiquitin E3 ligasas, con el objetivo de evitar la degradación del factor NRF2 (Nuclear factor-erythroid 2-related factor 2) (Cheng et al., 2019).

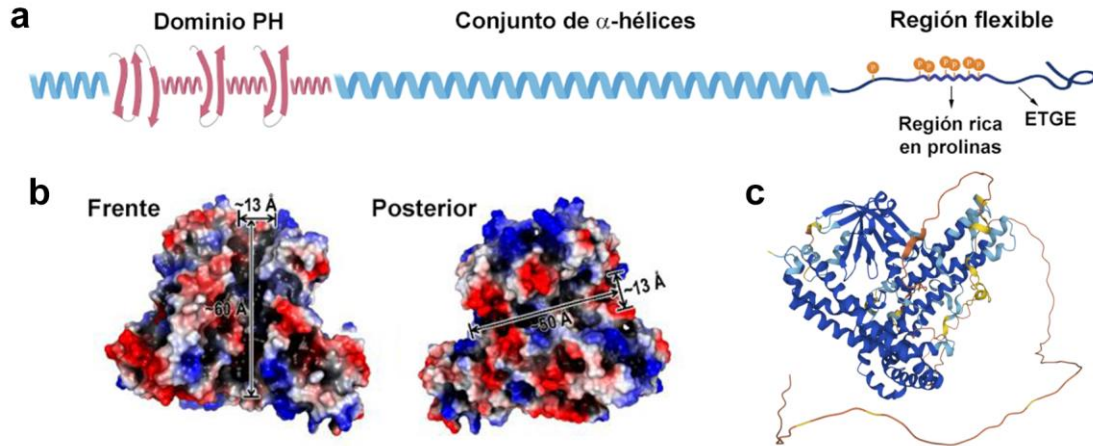


Figura 1. Estructura de la proteína FAM129B. (a) Estructura secundaria de la proteína FAM129B. (b) Representación de la estructura terciaria de la superficie de FAM129B, excluyendo la región flexible, imagen modificada de Hahn et al. (2020). (c) Modelo de la estructura terciaria de FAM129B desarrollado por AlphaFold, Q8R1F1 (NIBA2_MOUSE).

FAM129B participa en distintos procesos dependiendo del contexto celular en el que se encuentre (Zhou et al., 2018). En células de melanoma, FAM129B regula la migración celular a través de su activación por fosforilación mediada por ERK1/2 (Old et al., 2009) y está involucrada en la transcripción de *Axin2*, posiblemente a través de la vía Wnt/ β -catenina (Conrad et al., 2013). En células HeLa, FAM129B tiene un rol antiapoptótico ante la muerte celular programada inducida por TNF α /CHX (Chen et al., 2011). En células de glioblastoma y adenocarcinoma de pulmón, FAM129B regula la fosforilación de PKM2 (pyruvate kinase muscle isozyme), α -catenina y FAK (Focal Adhesion Kinase 1) y también participa en la modulación de la expresión de genes como *c-Myc* y *Ccnd1* (Ciclina D1) (Ji et al., 2016; Zhou et al., 2018).

Tanto en la línea HEK293 así como en cardiomiocitos, se demostró que FAM129B es una pieza clave en la ruta antioxidante mediada por NRF2, y

requiere de ERK1/2 para facilitar su fosforilación, y consecuentemente favorecer la transcripción de *Nrf2* para evitar su degradación, permitiendo que pueda translocarse al núcleo y activar la respuesta antioxidante, además de favorecer otras rutas como migración, disminución de la apoptosis o la reducción de citocinas proinflamatorias (Schmidlin et al., 2021; Zeng et al., 2022).

FAM129B es una proteína citoplasmática (Chen et al., 2011), no obstante, su localización varía del citoplasma a la membrana dependiendo de su estado de fosforilación (Chen et al., 2011; Old et al., 2009). Con la generación de un ratón knock-out incapaz de expresar a FAM129B, no se observó ningún problema en el desarrollo del ratón, el único cambio notable fue un retraso en su capacidad de “cierre de herida”, sugiriendo que FAM129B tiene un papel importante en regular procesos de movilidad celular (Oishi et al., 2012).

Como puede apreciarse, la mayoría de los trabajos publicados sobre FAM129B se llevaron a cabo en distintas líneas celulares transformadas, pero ninguna relacionada con procesos de diferenciación o con el tejido adiposo.

A partir de los resultados que obtuve durante el desarrollo de mi proyecto de maestría, en conjunto con el trabajo desarrollado en el laboratorio del Dr. Walid Kuri Harcuch, determinamos que el gen *Fam129b* se expresa en las primeras horas del compromiso adiposo. La actividad de *Fam129b* se puede observar bajo dos modelos de inducción distintos, utilizando el estímulo de suero de ternera o a través del modelo de St/Dex, lo que sugiere que el gen

responde a la inducción adipogénica y no es una consecuencia indirecta del estímulo con estaurosporina. Además, se realizaron ensayos preliminares de silenciamiento del mRNA de *Fam129b* y se observó una caída en la diferenciación adiposa.

En resumen, estos resultados nos sugieren que *Fam129b* podría estar relacionado con la regulación de la adipogénesis. El presente trabajo describe la participación de FAM129B como una proteína indispensable en el compromiso adiposo.

JUSTIFICACIÓN

En los últimos años los niveles de obesidad han sido declarados un problema de salud mundial, pronosticando un aumento alarmante en el número de personas que padecen esta enfermedad, especialmente en las personas menores de 18 años. En consecuencia, es de suma importancia desarrollar nuevas estrategias que nos permitan hacer frente a este problema de salud.

Entender con mayor precisión las características del tejido adiposo y su funcionamiento nos permite generar nuevas herramientas para abordar dicho problema desde distintos ángulos. Utilizando a la línea celular 3T3-F442A, así como al inductor St/Dex que nos aporta la ventaja de un periodo corto de inducción y la identificación clara de las etapas de la adipogénesis, podemos develar la participación de nuevos elementos que participan en la ruta de señalización que regula el proceso de diferenciación adiposa.

FAM129B es un excelente candidato como regulador positivo en la adipogénesis. Por lo tanto, es necesario identificar el papel que desempeña y enriquecer nuestro conocimiento sobre el proceso de diferenciación adiposa, lo cual nos permitirá abordar el problema de la obesidad desde una perspectiva distinta.

HIPÓTESIS

FAM129B es necesaria para que se lleve a cabo la diferenciación adiposa en la línea celular 3T3-F442A y su participación está regulada a través de la cinasa GSK3 β , proteína central que regula la cascada de señalización que dirige la adipogénesis.

OBJETIVOS

Objetivo general

Estudiar el mecanismo por el cual el gen *Fam129b* regula la diferenciación adiposa usando como modelo a la línea de fibroblastos 3T3-F442A, estimulados con St/Dex para inducir la adipogénesis.

Objetivos específicos

1. Determinar el perfil de expresión del gen *Fam129b* en la línea 3T3-F442A durante la diferenciación adiposa.
2. Evaluar la importancia del gen *Fam129b*, a través de ensayos de silenciamiento y su efecto sobre la cascada transcripcional adipogénica.
3. Identificar la ruta de señalización en la que participa la proteína FAM129B durante la adipogénesis.
4. Establecer la distribución y localización de la proteína FAM129B durante la diferenciación adiposa.
5. Determinar su probable función durante la adipogénesis.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

El medio Eagle's modificado por Dulbecco-Vôgt (DMEM), la agarosa (Ultra-Pure™ Agarose), la enzima Taq DNA polimerasa, la enzima transcriptasa reversa Super-Script® II, el fenol saturado en Tris pH 8.0 y la solución de Trizol® se obtubieron de Invitrogene-Life Technologies (Carlsbad, CA). El suero bovino adulto fue de HyClone Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA). El suero de gato adulto se obtuvo por el sangrado de animales domésticos, siguiendo los lineamientos de la Norma Oficial NOM-062-ZOO-1999 de acuerdo con la regulación federal para el buen manejo de animales de laboratorio para el bienestar de los animales y protocolos aprobados por el comité de cuidado y manejo de animales de laboratorio del CINVESTAV-IPN (CICUAL). El factor de crecimiento epidermal fue adquirido de Upstate (Millipore Corporation, Billerica, MA). La insulina, D-biotina, la transferrina humana, triyodotironina, la estaurosporina, dexametasona, β-mercaptoetanol, Rojo Oleoso O, dimetil sulfóxido, SB-415286 y la albúmina sérica bovina se obtuvieron de Sigma Chemical Co. (Saint Louis, MO). El inhibidor U0126 se obtuvo de InvivoGen (San Diego, California). El resto de los reactivos utilizados fueron de grado analítico.

Cultivo celular

Las células 3T3-F442A se sembraron a una densidad de 2.25×10^3 células/cm² en medio DMEM suplementado con 6% (v/v) de suero

bovino adulto, manteniéndolas a 37°C y en una atmósfera con 10% de CO₂. Dos días posteriores al inóculo, las células se mantuvieron en medio no adipogénico (N. Ad.), el cual consiste en DMEM suplementado con 5% (v/v) de suero de gato adulto, 0.15% (v/v) de suero bovino adulto, 5 µg/mL de insulina y 1 µM de D-biotina, se mantuvieron a 37°C y en una atmósfera con 10% de CO₂ con cambios de medio cada tercer día.

A los dos días postconfluencia se indujo la adipogénesis con 10 nM de estaurosporina y 250 nM de dexametasona (St/Dex) durante 4 horas (Ayala-Sumuano et al., 2008) en medio no adipogénico (N. Ad.), que consta de suero de gato adulto al 5% (v/v), 0.15% (v/v) de suero bovino adulto, 5 µg/mL de insulina, 1 µM de D-biotina, 5 µg/mL de transferrina, 2 nM de triyodotironina, 40 µM de β-mercaptoetanol y 0.01 ng/mL de factor de crecimiento epidermal (EGF) (Morikawa et al., 1984). Al término de la inducción, se retiró el estímulo adipogénico con un cambio de medio, manteniendo los cultivos en medio N. Ad. hasta las 144 horas. Se colectaron cultivos a diferentes tiempos postinducción, para su evaluación a lo largo del proceso de diferenciación, lavando un par de veces con PBS 1x y congelando a -70°C.

Evaluación de la conversión adiposa

Para evaluar la eficiencia del estímulo adipogénico, se mantuvieron cultivos paralelos llevados hasta las 144 horas y posteriormente fijados con formaldehído al 3.5% en PBS 1x (Phosphate-buffered saline) durante toda la noche (aproximadamente 16 horas) a 4°C. Una vez fijadas, se lavaron con agua

bidestilada y se tiñeron con una solución de 2.1 mg/mL de Rojo Oleoso O en isopropanol al 60% (p/v) por 2 horas. Este colorante tiene afinidad por triglicéridos neutros que forman las gotas de lípidos en los adipocitos, lo que nos permite evaluar la cantidad de lípidos acumulados por las células (Ramirez-Zacarias et al., 1992). Para determinar la eficiencia de conversión, utilizando un estereoscopio se contó el número de cúmulos adiposos formados y posteriormente se extrajo el Rojo Oleoso O con 1 mL de isopropanol absoluto por caja de 35 mm, y se determinaron los valores de absorbancia a 510 nm para obtener el valor relativo de triglicéridos acumulados (Ramirez-Zacarias et al., 1992).

Extracción de RNA y síntesis de cDNA

El RNA total se extrajo de los cultivos celulares congelados por el método de Trizol® siguiendo las recomendaciones del fabricante. Las muestras se resuspendieron en 30 µL de agua bidestilada estéril tratada con dietilpirocarbonato al 0.1%. Se determinó la concentración de las muestras por espectrofotometría en el equipo NanoDrop 2000 Thermo Fisher Scientific (Waltham, Ma). Se verificó la integridad de las muestras por análisis electroforético en un gel de agarosa al 1% (p/v) en Tris/Borato/EDTA (Tris base 90 mM, ácido bórico 90 mM, EDTA 2 mM) con 2 mM de isotiocianato de guanidina. La síntesis del cDNA se llevó a cabo con la enzima transcriptasa reversa Super Script II™, utilizando como cebador oligo dT₁₈ a 25 µg/mL y como molde 0.5 µg de RNA total en un volumen de reacción de 10 µL.

Análisis de la expresión génica mediante PCR en tiempo real

El cDNA obtenido, se utilizó como templado para realizar los ensayos semicuantitativos de PCR en tiempo real, empleando el kit FastStart Universal SYBR Green Master (ROX) de ROCHE (Basilea, Suiza). Los cebadores utilizados se detallan en la Tabla 1, y se usó como referencia el gen *Rplp0*. Para analizar la expresión de cada gen se realizó un análisis cuantitativo relativo usando la fórmula $2^{-\Delta Ct}$ (Livak and Schmittgen, 2001).

Tabla 1. Lista de cebadores utilizados para RT-PCR

Gen	Secuencia	Ta (°C)	Producto (bp)	Reference
<i>Rplp0</i>	5' - AGG CCC TGC ACT CTC GCT TTC TGG 3' - TGG TTG CTT TGG CGG GAT TAG TCG	60	346	Díaz-Velasquez <i>et al.</i> 2008
<i>Fam129b</i>	5' - CAG GAA GGG AAT GGT GAT CTG 3' - ACA TGC GAG AGC AAA TGG ACA ATG	60	206	Este trabajo
<i>Pparg2</i>	5' - TCG CTG ATG CAC TGC CTA TG 3' - GAG AGG TCC ACA GAG CTG ATT	60	103	PimerBank ID 6755138a1
<i>Cebpb</i>	5' - CCG CGC ACC ACG ACT TCC CCT 3' - CGC TCG CGC CGC ATC TTG TA	61	451	Ayala-Sumuano <i>et al.</i> 2011
<i>Klf4</i>	5' - GTC CTT CTC CAC GTT CGC 3' - CCA GGA GGT CGT TGA ACT C	63	251	Cervantes-Camacho <i>et al.</i> 2015
<i>Klf5</i>	5' - GCC AAC TCT CCC ACC TGT CA 3' - GTG CAC TTG TAG GGC TTC TCG	60	165	Cervantes-Camacho <i>et al.</i> 2015
<i>Sreb1a</i>	5' - TAG TCC GAA GCC GGG TGG GCG CCG GCG CCA T 3' - GAT GTC GTT CAA AAC CGC TGT GTG TCC AGT TC	60	106	Shimomura <i>et al.</i> 1997
<i>Sreb1c</i>	5' - ATC GGC GCG GAA GCT GTC GGG GTA GCG TC 3' - ACT GTC TTG GTT GTT GAT GAG CTG GAG CAT	63	116	Shimomura <i>et al.</i> 1997
<i>Fabp4</i>	5' - AAG AGA AAA CGA GAT GGT GAC AA 3' - CTT GTG GAA GTC ACG CCT TT	62	65	Ayala-Sumuano <i>et al.</i> 2011
<i>Gpdh</i>	5' - CTG AGA TCA TCA ACA CTC AGC 3' - TGT CAG CGC CTG TTG CAG C	60	111	Hernández-Mosqueira <i>et al.</i> 2015
<i>Ccnd1</i>	5' - GCG CGT ACC CTG ACA CCA AT 3' - CTG CAG GCG GCT CTT CTT CA	60	257	Este trabajo
<i>c-Myc</i>	5' - AGT GCT GCA TGA GGA GAC AC 3' - TTG TGC TGG TGA GTG GAG AC	60	210	Este trabajo

Extracción de proteína total

La proteína total se extrajo a partir de los cultivos celulares congelados, manteniendo las muestras a 4°C; se utilizó la solución amortiguadora Tris HCl 50 mM pH 7.4, NaCl 150 mM, Nonidet P-40 al 1% (v/v), ácido desoxicólico al

0.5%, dodecil sulfato de sodio al 0.1% (p/v), EGTA 0.1 mM, EDTA 0.1 mM, Na₂VO₄ 1 mM, NaF 50 nM, β-glicerol fosfato 20 mM y la mezcla de inhibidores de proteasas cOmplete™ 1X (ROCHE, Basilea, Suiza), protocolo modificado de Press (2017). Para los tratamientos con fosfatasa se utilizó como solución amortiguadora: Tris HCl 50 mM pH 7.4, NaCl 150 mM, Nonidet P-40 al 1%, Tritón X-100 al 1%, EGTA 0.1 mM, EDTA 0.1 mM, β-glicerol fosfato 10 mM y cOmplete™ 1X. Para la extracción de proteína citoplásmica se utilizó una solución amortiguadora hipotónica: Tris HCl 20 mM pH 7.4, NaCl 10 mM, MgCl₂ 3 mM, EDTA 0.1 mM, Na₂VO₄ 1 mM, NaF 50 mM, β-glicerol fosfato 20 mM y cOmplete™ 1X, protocolo modificado de ThermoFisher (2007). Se cuantificó el contenido total de proteína por el método de Lowry (Lowry et al., 1951).

Detección de proteínas por *Western Blot*

Se utilizaron 40 µg de proteína total de cada muestra para separarlas por SDS-PAGE al 10% y posteriormente se transfirieron a membranas de nitrocelulosa de 0.45 µm en cámara húmeda. Para determinar la presencia de las proteínas blanco se utilizaron los anticuerpos que se detallan en la Tabla 2. El substrato utilizado para detectar la actividad de la peroxidasa por quimioluminiscencia fue *HRP Immobilon™ Western* (Millipore, Billerica, MA) y su utilizó el equipo *Odyssey® Fc Imaging System* (LI-COR, Lincoln, NE) para la detección de las imágenes. El análisis densitométrico se realizó por medio del *software ImageJ* versión 1.50b (Schneider et al., 2012).

Silenciamiento y transfección

Para los ensayos de transfección se utilizaron cultivos de la línea 3T3-F442A aproximadamente a un 70% de confluencia. Las células se cosecharon y se lavaron con medio DMEM libre de suero. Para cada ensayo se usaron 3×10^6 células en 100 μ L de la solución Nucleofector™ kit V (Lonza; Basel, Switzerland) y se añadieron 300 nM del silenciador MSS213450 (ThermoFisher Scientific), dirigido al exón 9. La transfección se llevó a cabo utilizando el programa T-030, en el equipo Amaxa® Nucleofector® II (Lonza Cologne AG). Se utilizó el siRNA Scramble Stealth RNAi™ siRNA Negative Control, que carece de un blanco homólogo a transcriptomas de vertebrado (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). Para garantizar que las células sean susceptibles a la inducción adipogénica, el inóculo postransfección se realizó a densidad de confluencia. Los cultivos se dejaron estabilizar 24 horas antes de aplicar el tratamiento con St/Dex por 4 horas.

Tabla 2. Lista de anticuerpos

Anticuerpo	Compañía	Catálogo
FAM129B	Abcam	ab99333
FAM129B (phospho S679 + S683)	Abcam	ab254057
GDI1	ThermoFisher Scientific	71-0300
PARP	Cell Signaling	#9542
α -Tubulin	Invitrogen	18-0092
ERK1/2	Santa Cruz	sc-514302
phospho-p44/42 MAPK (Thr202/Tyr204)	Cell Signaling	#9106

Tratamiento con fosfatasa

Para establecer el estado de fosforilación de FAM129B se utilizó la proteína lambda fosfatasa de New England Biolabs (Ipswich, Massachusetts). Se utilizaron 40 µg de proteína por cada ensayo, incubándose con 10 unidades de enzima por cada microgramo de proteína, durante 30 minutos a 30°C. La actividad de la enzima se detuvo añadiendo buffer de carga e hirviendo la muestra por 5 minutos. Para verificar la actividad de la fosfatasa se añadieron a la mezcla de reacción 50 nM de EDTA como inhibidor de la actividad de la enzima.

Inmunofluorescencia

Los cultivos utilizados para inmunofluorescencia se crecieron en cubreobjetos de cristal de 22 x 22 mm (Corning, Glendale, Arizona) bajo las condiciones antes mencionadas. Posteriormente se lavaron con PBS 1x y se fijaron con paraformaldehído al 3.5%. Para llevar a cabo las inmunodetecciones, los cultivos se permeabilizaron con Tritón X-100 al 0.1% (v/v) y se utilizaron los anticuerpos mencionados en la Tabla 2. Para la detección de FAM129B se amplificó la señal con TSA Cyanine 3 System (PerkinElmer Life Science, NEL704A). Para el reconocimiento de actina, se utilizó Phalloidin-FITC. Todas las muestras se fijaron con el medio de montaje Dako (Dako Corporation). El análisis confocal de las muestras se llevó a cabo utilizando el equipo Leica TCS SP2 high-speed confocal system (Leica Microsystems).

Análisis estadístico

Los datos obtenidos de cada experimento se procesaron en el programa GraphPad Prism 9. Los resultados se presentan con la media \pm el error estándar de la media (SEM). Para la comparación de resultados se utilizó la prueba t de Student en el caso de los grupos con distribución normal y varianza homogénea, o un análisis ANOVA seguido por una prueba de Dunnett para comparar grupos múltiples. La significancia de los datos obtenidos se marcó cuando el valor de p fue menor o igual a 0.05.

RESULTADOS

Expresión temprana y transitoria de *Fam129b* durante la adipogénesis

Para determinar la expresión del gen *Fam129b* durante la diferenciación adiposa se llevaron cultivos de la línea 3T3-F442A hasta dos días postconfluencia en medio N. Ad. Se realizó el tratamiento con St/Dex por 4 horas y se evaluó la diferenciación adiposa hasta el sexto día. De acuerdo con el modelo, los cultivos estimulados con St/Dex mostraron niveles altos de adipogénesis, comparados con los cultivos N. Ad. (Figura 2a). Se llevó a cabo la evaluación cuantitativa de la conversión adiposa mediante el conteo del número de clústeres formados y la cantidad de Rojo Oleoso O refleja la elevada tasa de conversión de la línea 3T3-F442A en condiciones adipogénicas (Figura 2b).

Estos resultados mostraron que *Pparg2*, el gen maestro de la adipogénesis, incrementa 4 veces su expresión 24 horas después de la inducción con St/Dex, elevándose hasta 120 veces a las 144 horas, mientras que la expresión de *Pparg2* permanece en niveles bajos en cultivos no tratados N. Ad., como se muestra en la Figura 2c. En este contexto, la evaluación de *Fam129b* muestra un incremento en su expresión de hasta 8 veces durante la inducción, alcanzando sus niveles máximos a las 4 horas. Sin embargo, a las 24 horas después de la inducción, los niveles del mensajero que la codifica regresan a los niveles basales que se observan en los cultivos N. Ad. (Figura 2d).

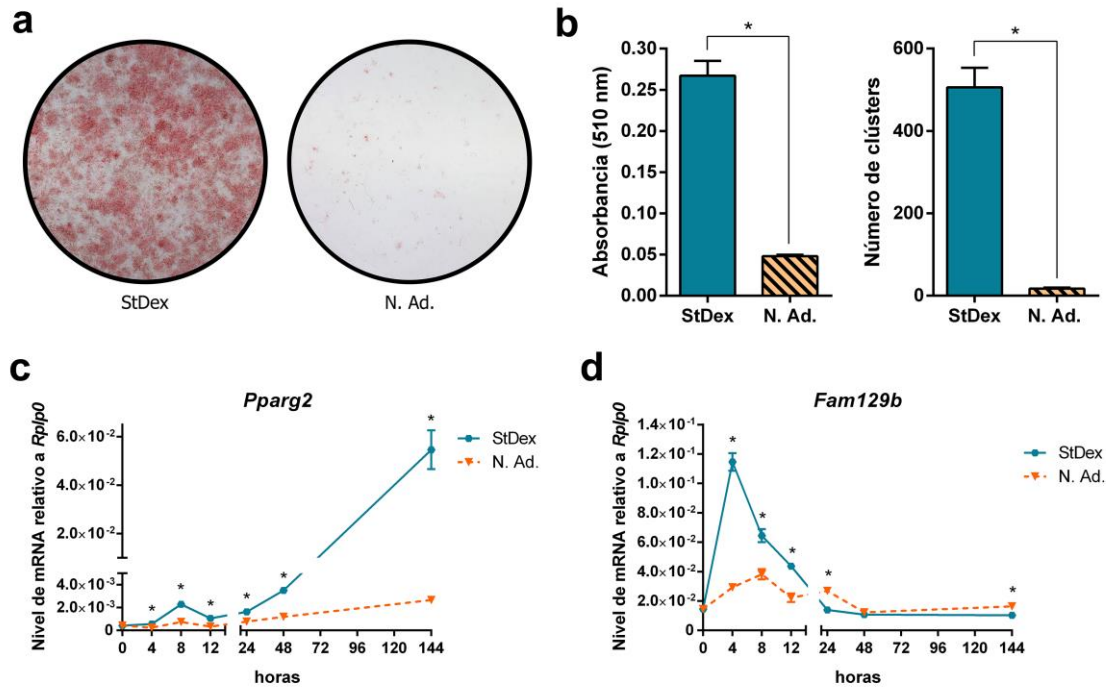


Figura 2. Expresión del gen *Fam129b* durante la adipogénesis. (a) Cultivos de células 3T3-F442A teñidos con Rojo Oleoso O evaluados a las 144 h postinducción. (b) Cuantificación de la diferenciación adiposa mediante la acumulación de Rojo Oleoso O y el conteo de clústers, n = 24. (c) Expresión de *Pparg2*, marcador de la adipogénesis, durante la diferenciación adiposa, n = 9. (d) Expresión de *Fam129b* a lo largo de la adipogénesis, n = 9.

La evaluación de los niveles de expresión de FAM129B mediante inmunodetección, muestra que la proteína incrementa un 30% a las 12 horas postinducción, manteniendo niveles altos hasta las 24 horas, posteriormente los niveles de FAM129B disminuyen en los cultivos que expresaron la diferenciación terminal (Figura 3a-b). Este resultado demuestra que existe un desfase de 8 horas entre la expresión del mRNA y la proteína.

En conclusión, los niveles de expresión de *Fam129b* son tempranos y transitorios, mientras el mRNA aumenta durante la inducción y en las primeras horas de la estabilización del compromiso adipogénico, los niveles de proteína

aumentan durante el período de estabilización. Estos resultados sugieren que *Fam129b* está involucrado en el compromiso adipogénico.

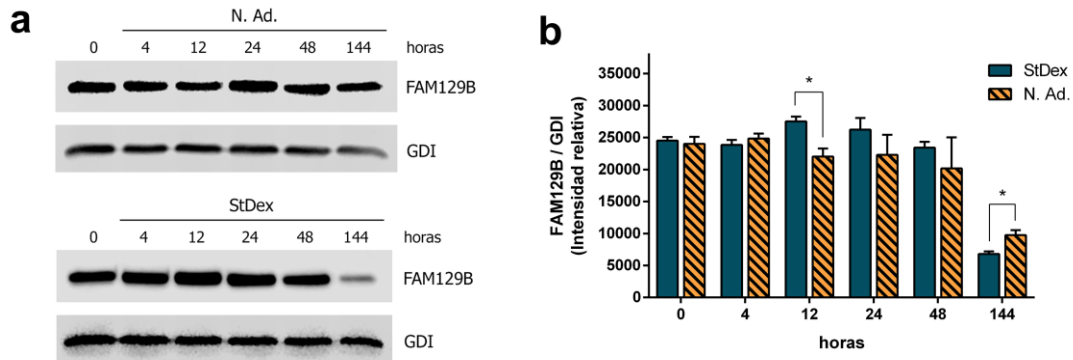


Figura 3. Expresión de la proteína FAM129B durante la adipogénesis. (a) Imagen representativa de la inmunodetección de FAM129B a lo largo de la diferenciación adiposa. **(b)** Análisis densitométrico de la expresión de FAM129B durante la adipogénesis, n = 3.

El silenciamiento de *Fam129b* bloquea la adipogénesis

Para establecer la importancia de FAM129B en la diferenciación adiposa, silenciamos la expresión del mRNA correspondiente mediante un siRNA (small interfering RNA) (Figura 4a). Veinticuatro horas postransfección se realizó el estímulo adipogénico (St/Dex) por 4 horas y se evaluó su efecto en la adipogénesis. El resultado mostró que el silenciamiento de *Fam129b* disminuyó en un 50% la adipogénesis, si evaluamos el número de clústeres formados (Figura 4b-c) y un 58% si evaluamos la expresión del marcador adipogénico *Pparg2* (Figura 4d).

Al determinar el efecto del siRNA sobre la expresión del mensajero y la proteína del gen *Fam129b*, observamos que el silenciamiento se llevó con éxito

pues se promovió una caída de un 95% del mRNA mientras que la proteína disminuyó hasta un 85% después de 24 horas postinducción (Figura 4e-f).

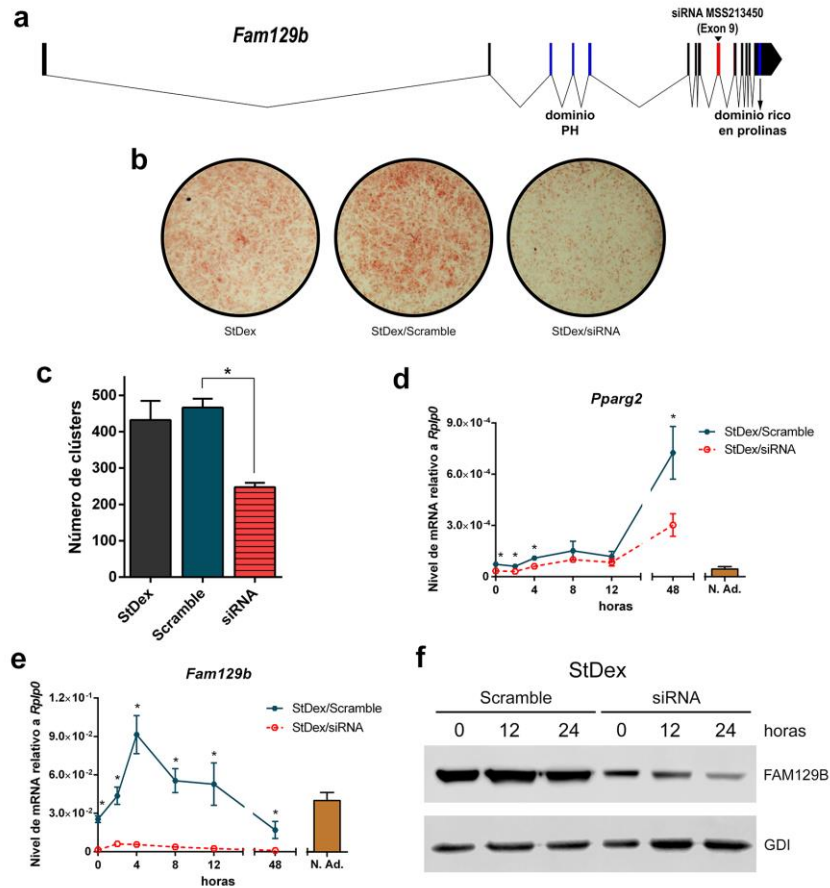


Figura 4. El silenciamiento de *Fam129b* bloquea la adipogénesis. (a) Diagrama de la estructura del mRNA de *Fam129b*, las líneas verticales representan los exones, mientras que las diagonales los intrones. Se indica el exón 9 como blanco del silenciador MSS213450 (esquema creado con Exon-Intron Graphic Maker). (b) Cultivos teñidos con Rojo Oleoso O evaluados a las 144 h postinducción. (c) Cuantificación de la diferenciación adiposa mediante el conteo de clústeres, n = 4. (d) Expresión de *Pparg2* como marcador adipogénico durante el compromiso adiposo, n > 4. (e) Expresión de *Fam129b* durante la etapa del compromiso, n > 4. (f) Imagen representativa de la inmunodetección de FAM129B durante la primera mitad del compromiso adipogénico.

En contraste, la secuencia aleatoria (“scrambled”) utilizada como control, no tuvo efecto sobre la expresión del mRNA, la proteína o incluso la conversión

adiposa (Figura 4b-d). Por lo tanto, el silenciamiento de *Fam129b* es efectivo para disminuir los niveles de FAM129B y afectar la adipogénesis.

Fam129b* se expresa río abajo de *Cebpb* y río arriba de *Pparg2

La disminución de la adipogénesis provocada por el silenciamiento de *Fam129b*, nos condujo a evaluar la influencia de estos resultados en el resto de la cascada transcripcional adipogénica. El silenciamiento de *Fam129b* no cambia los perfiles de expresión de los genes que regulan en tiempos tempranos la adipogénesis, *Cebpb*, *Klf4*, *Klf5* y *Srebf1a* (Figura 5a-d).

Mientras tanto, los genes de expresión tardía que regulan la expresión del fenotipo, *Pparg2*, *Srebf1c*, *Fabp4* y *Gpdh* (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase), disminuyeron su expresión un 60%, 60%, 42% y 51%, respectivamente (Figura 5e-h). Estos resultados muestran que la expresión de *Fam129b* ocurre río abajo de *Cebpb*, *Klf4*, *Klf5* y *Srebf1a*, pero precede a la de *Pparg2* y el resto de los genes tardíos, sugiriendo así que *Fam129b* regula la adipogénesis al modular la expresión de *Pparg2*.

GSK3 β regula la expresión del gen *Fam129b*

Una vez determinada la expresión temprana de *Fam129b*, fue plausible considerar que GSK3 β actúa regulando su expresión, ya que esta cinasa coordina la ruta de señalización durante las primeras horas del compromiso adiposo. Durante la inducción con St/Dex, los cultivos de 3T3-F442A se trataron por un periodo de 12 horas durante el compromiso adipogénico con el compuesto SB-415286, que es un inhibidor de la actividad de GSK3 β .

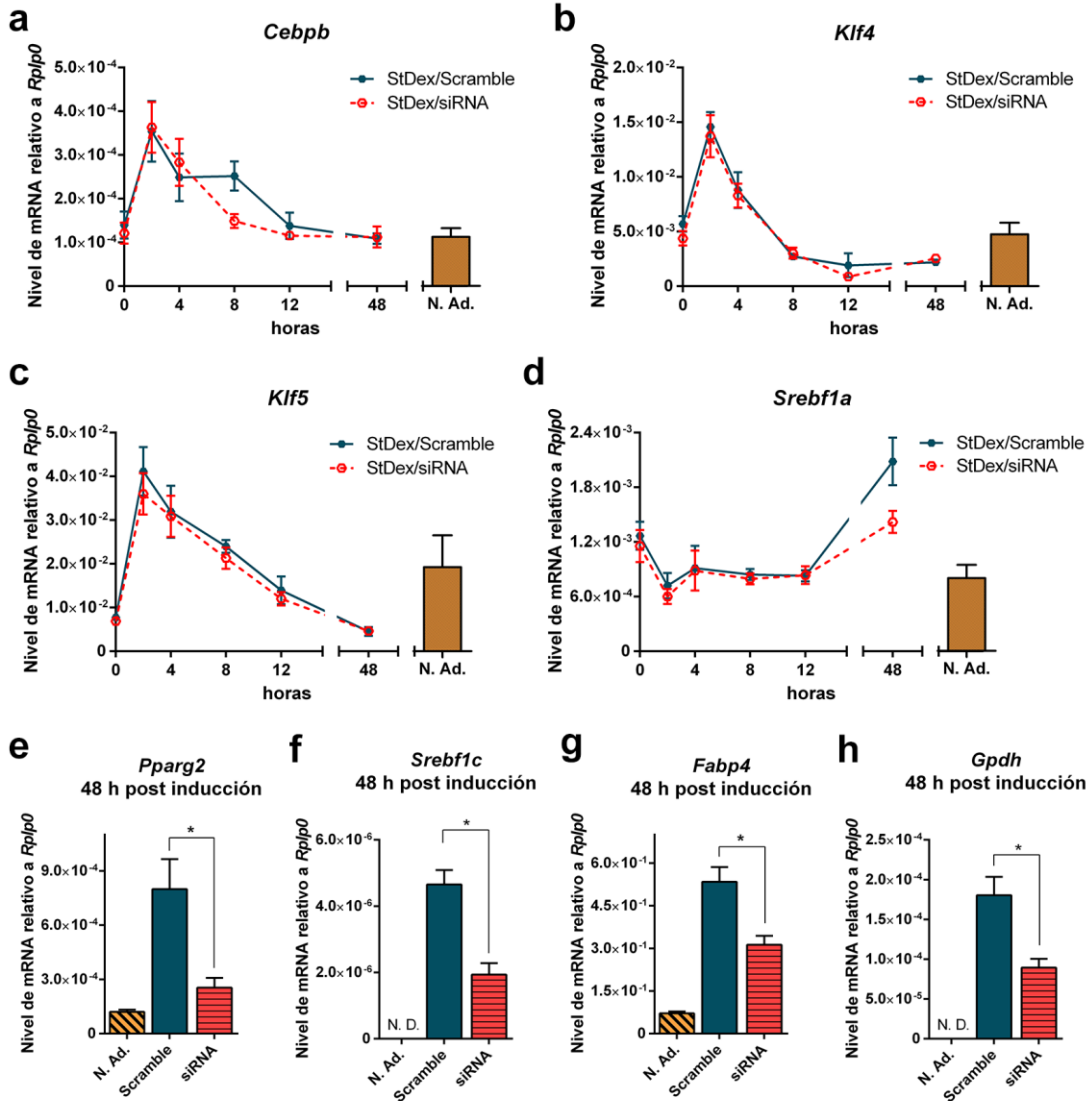


Figura 5. El silenciamiento de *Fam129b* sólo afecta la expresión de los genes tardíos de la adipogénesis. (a-d) Expresión de genes que regulan la cascada temprana de la diferenciación adiposa, *Cebpb*, *Klf4*, *Klf5*, *Srebf1a*, $n > 4$. (e-h) Expresión de genes que regulan la expresión del fenotipo adiposo, *Pparg2*, *Srebf1c*, *Fabp4*, *Gpdh*, $n > 4$.

El resultado mostró que, al evaluar el número de clústeres formados, el inhibidor SB-415286 disminuye la diferenciación adiposa en un 73% (Figura 6a-b), y un 63% si se cuantifican los niveles de *Pparg2* (Figura 6c). Además, observamos que los niveles de *Fam129b* a las 4 horas disminuyeron un 85% respecto a los cultivos N. Ad. (Figura 6d).

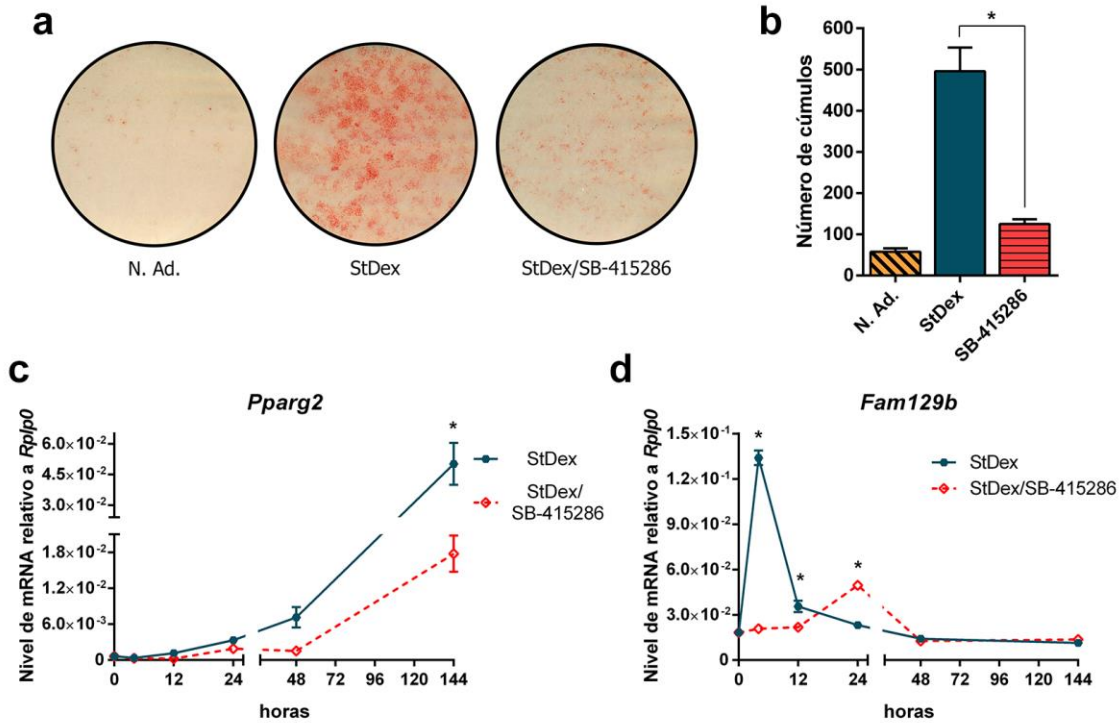


Figura 6. La inhibición de GSK3 β bloquea la adipogénesis y disminuye los niveles de *Fam129b*. (a) Cultivos teñidos con Rojo Oleoso O evaluados a las 144 h postinducción. (b) Cuantificación de la conversión adiposa mediante el número de clústeres n = 3. (c) Expresión de *Pparg2* como marcador adipogénico a lo largo de la diferenciación adiposa, n = 6. (d) Expresión de *Fam129b* durante la adipogénesis, n = 6.

GSK3 β regula la fosforilación de la proteína FAM129B

Al analizar la secuencia de la proteína FAM129B mediante el programa NetPhos-3.1 obtuvimos 16 sitios con una alta probabilidad de ser regulados por GSK3 β , en la Tabla 3 se enlistan las secuencias potenciales con valores dentro de la escala de confianza > 0.45, de acuerdo con esta herramienta de predicción (Blom et al., 1999). Entre ellos destacan los 6 residuos de serina que se encuentran en el dominio rico en prolina y que previamente se describieron como blancos de ERK1/2 (Old et al., 2009).

Tabla 3. Análisis *in silico* de la proteína FAM129B, con posibles sitios regulados por GSK3 β

Secuencia	Aminoácido	Score	Secuencia	Aminoácido	Score	Secuencia	Aminoácido	Score
QYGV S LFNS	Ser-39	0.458	MVPT S QGFT	Ser-355	0.466	ASPD S VTEL	Ser-653	0.470
RNRF S LVPH	Ser-90	0.464	ELCK S IQRI	Ser-468	0.450	LQAE S SPPA	Ser-669	0.452
AVIN S AGYK	Ser-119	0.478	YDYD S SSVR	Ser-484	0.461	QAES S PPAS	Ser-670	0.494
LVGN S LPGT	Ser-138	0.462	KLAP T CKSE	Thr-511	0.455	SPPA S PLLN	Ser-674	0.512
SLPG T TSKS	Thr-142	0.513	VLHNSDPNL	Ser-574	0.466	VPEA S PPAS	Ser-695	0.525
PGTT S KSGS	Ser-144	0.452	LAEG T PIDW	Thr-585	0.477	SPPA S PLRH	Ser-699	0.514
SKSG S TPIL	Ser-148	0.467	DSGD S GGGD	Ser-599	0.459	SDQETGEQV	Thr-722	0.462
KSG S TPILK	Thr-149	0.460	GGGD S GGSP	Ser-604	0.463	GEQV S SPGS	Ser-727	0.461
IPEN S KVEG	Ser-202	0.453	DSGG S PCPS	Ser-607	0.520	EQV S SPGSR	Ser-728	0.503
GPAF T DAIR	Thr-210	0.460	SPCP S EAAAT	Ser-611	0.465	SSPG S RPPI	Ser-731	0.510
EQYGTWEML	Thr-225	0.452	SEAATL T EK	Ser-615	0.459	PPIH T TTED	Thr-737	0.451
VQIL S NLVM	Ser-238	0.457	VEPP S PASP	Ser-647	0.542	PIHT T TEDS	Thr-738	0.464
PYIP S ILEA	Ser-345	0.460	PSPA S PDSV	Ser-650	0.502			

Para conseguir una discriminación mucho más fina de los posibles sitios de fosforilación, se buscaron sitios consenso reconocidos por GSK3 β para fosforilar sustratos, cuya estructura es S/TXXXpS/pT, donde S/T representa el residuo que será blanco de GSK3 β , si y sólo si, a cuatro aminoácidos de distancia esté presente un residuo de serina previamente fosforilado (pS/pT) (X representa cualquier aminoácido). Dos motivos destacaron de entre todos los candidatos, **SS⁶⁷⁰PPAS⁶⁷⁴P** y **AS⁶⁹⁶PPAS⁶⁹⁹P**, ambos se encuentran dentro del dominio rico en prolinas. En consecuencia, es muy probable que GSK3 β tenga la capacidad de fosforilar a Ser⁶⁷⁰ y Ser⁶⁹⁶, siempre y cuando Ser⁶⁷⁴ y Ser⁶⁹⁹ se encuentren previamente fosforiladas probablemente por ERK1/2.

Subsecuentemente decidimos comprobar la propuesta de que FAM129B es regulado por GSK3 β . Para ello, realizamos ensayos de inmunodetección para determinar si FAM129B es fosforilado en los residuos Ser⁶⁹⁵ y Ser⁶⁹⁹. Los resultados muestran que los cultivos tratados con St/Dex, evaluados 12 horas postinducción, tienen niveles de FAM129B fosforilada (pFAM129B) 45% más

elevados en comparación con los cultivos en condiciones N. Ad. (Figura 7a). Por otra parte, al utilizar el inhibidor SB-415286 en muestras St/Dex de 12 horas, encontramos una disminución de un 34% de pFAM129B (Figura 7b), este resultado es similar al que se obtiene cuando incubamos muestras St/Dex con la proteína lambda fosfatasa.

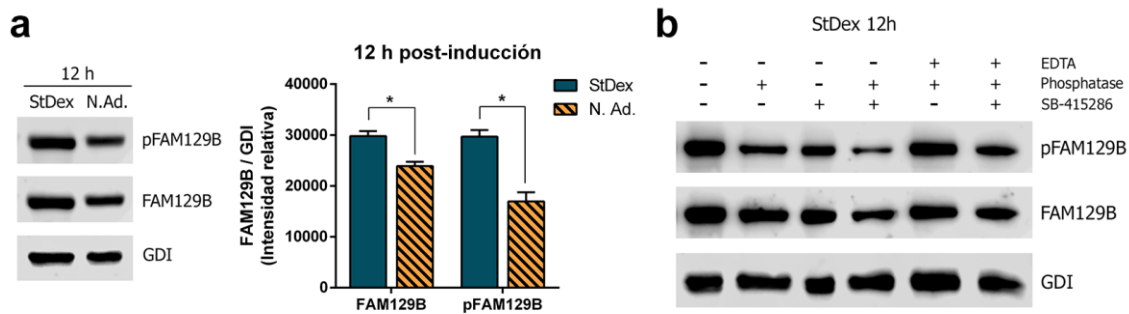


Figura 7. GSK3 β regula la fosforilación de FAM129B durante la adipogénesis. (a) Evaluación de la fosforilación de FAM129B en cultivos inducidos con StDex vs N. Ad. 12 h después de iniciar el tratamiento adipogénico, n = 4. (b) La pérdida de la fosforilación de FAM129B en presencia del inhibidor SB-415286 es similar al tratamiento con Lambda fosfatasa.

Si acoplamos ambas estrategias, el inhibidor SB-415286 y el tratamiento con fosfatasa, la pérdida de la fosforilación de FAM129B es casi total, como se aprecia en la Figura 7b. Así mismo, la disminución de la fosforilación causada por la fosfatasa puede evitarse al inhibir su actividad con EDTA. Este resultado comprueba que la disminución en la señal de pFAM129B se debe a una pérdida en sus niveles de fosforilación, y que GSK3 β es responsable de fosforilar un tercio de la proteína total FAM129B.

ERK1/2 fosforila a FAM129B para regular la adipogénesis

En los preadipocitos 3T3-L1, se demostró que utilizando como inductores suero fetal bovino, Mix/Dex e insulina, la cascada de las MAPK se enciende transitoriamente durante las primeras 2 horas del estímulo adipogénico (Prusty et al., 2002). Además, si se impide la activación por fosforilación de la cinasa ERK1/2, por medio del inhibidor U0126, se afecta la adipogénesis, debido a que los niveles de *Pparg2* y *Cebpa* disminuyen considerablemente, no así los niveles de *Cebpb* (Prusty et al., 2002).

Debido a que la activación de ERK1/2 coincide con los tiempos de expresión temprana de *Fam129b* y que anteriormente se ha demostrado la fosforilación de FAM129B a través de pERK1/2 (Old et al., 2009), decidimos explorar el papel que juega ERK1/2 en la regulación de FAM129B dentro del contexto de la adipogénesis. Para seguir esta línea de investigación utilizamos el inhibidor de ERK1/2, U0126, y lo aplicamos en cultivos 3T3-F442A inducidos con St/Dex, al igual que con el inhibidor de GSK3 β , U0126 se aplicó durante las primeras 12 horas del compromiso adipogénico. Los resultados muestran que la inhibición de ERK1/2 reduce la adipogénesis en un 30% al comparar el número de clústeres formados (Figura 8a-b).

Posteriormente, se evaluó el estado de fosforilación de FAM129B para determinar su relación con las MAPK. En la Figura 9a, observamos que, en el momento previo al tratamiento, FAM129B ya presenta un estado de

fosforilación basal, “0” horas; sin embargo, 15 minutos después de iniciar el estímulo St/Dex, los niveles de pFAM129B aumentan 40% (Figura 9b).

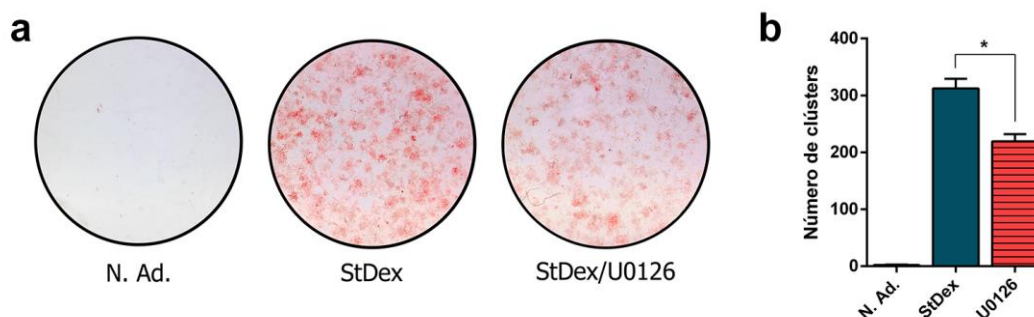


Figura 8. El inhibidor U0126 bloquea la adipogénesis. (a) Cultivos teñidos con Rojo Oleoso O evaluados a las 144 h posteriores al tratamiento adipogénico. (b) Cuantificación de la conversión adiposa mediante el número de clústeres n = 3.

Transcurridas 2 horas postinducción, la fosforilación de FAM129B regresa a niveles basales, hasta que nuevamente a las 4 horas, los niveles de pFAM129B vuelven a incrementar en un 32%, alcanzando sus niveles máximos a las 12 horas postratamiento, con un 48% de aumento en los niveles de fosforilación (Figura 9b). Finalmente, pFAM129B disminuye un 25% a las 48 horas (Figura 9b). Mientras tanto, en los cultivos adipogénicos (St/Dex) en donde se aplicó el inhibidor U0126, los niveles de pFAM129B permanecen constantes por debajo de su fosforilación basal (Figura 9b).

El estado de fosforilación de ERK1/2 también cambia durante el compromiso adipogénico. Después de 15 minutos de tratamiento con St/Dex, pERK1/2 aumenta alrededor de 5 veces (Figura 9c). Durante las siguientes 4 horas sus niveles se mantienen constantes en torno al doble de sus niveles basales, pero a las 12 horas postinducción, observamos un nuevo incremento

en la fosforilación de ERK1/2 de hasta 3 veces (Figura 9c). En contraste, aquellos cultivos en los que se aplicó U0126, la fosforilación de ERK1/2 disminuyó en un 80%, corroborando la eficiencia del inhibidor (Figura 9c). Estos resultados muestran que FAM129B es fosforilado durante la adipogénesis efecto que está mediado por ERK1/2 y GSK3 β .

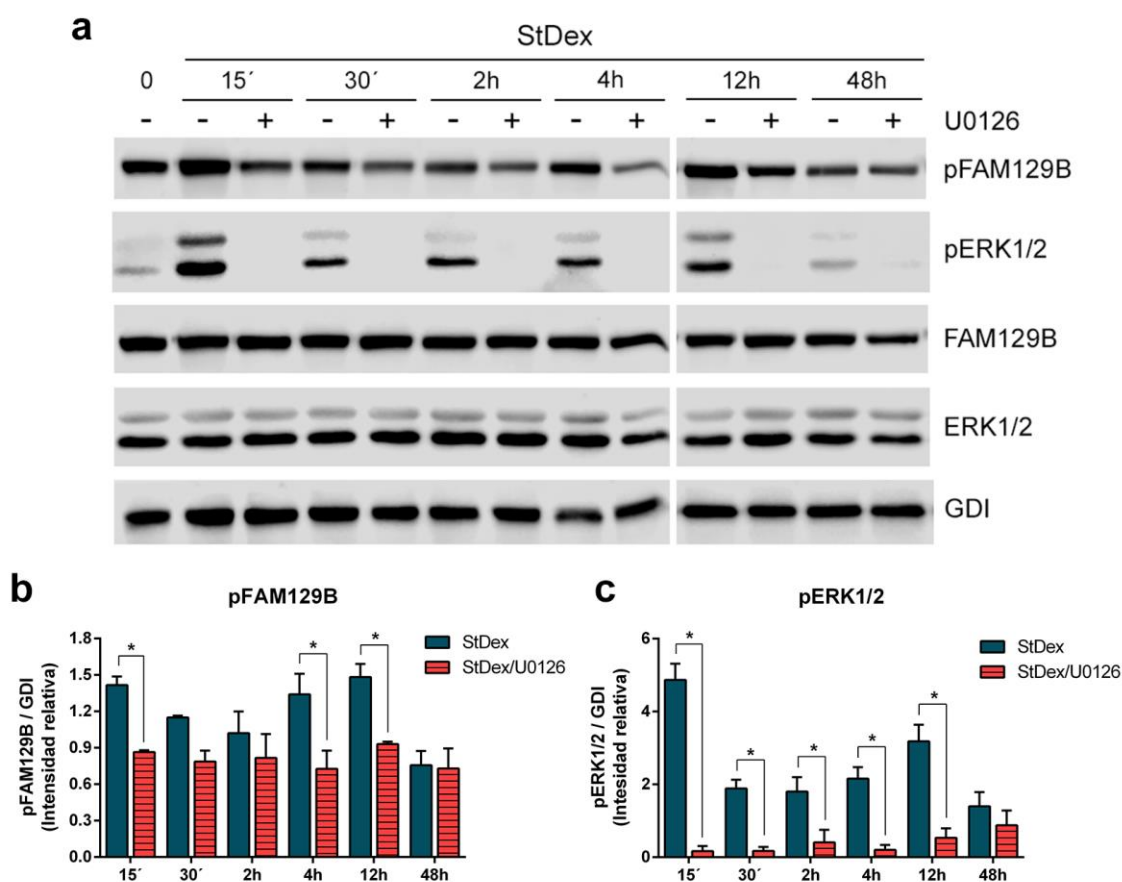


Figura 9. ERK1/2 regula la fosforilación de FAM129B durante la inducción adipogénica. (a) Inmunodetección del perfil de fosforilación de FAM129B y ERK1/2 durante el compromiso adipogénico. **(b-c)** Análisis densitométrico de pFAM129B y pERK1/2 en condiciones adipogénicas con y sin el inhibidor U0126, n = 3.

FAM129B se localiza en el citoplasma durante la adipogénesis

Dado que la actividad de FAM129B precede la expresión de *Pparg2* y de otros genes que regulan la expresión del fenotipo, decidimos evaluar su localización intracelular durante la adipogénesis. Para ello separamos las proteínas en dos fracciones, la citoplásmica y la nuclear, evaluando los resultados mediante ensayos de inmunodetección. Encontramos que FAM129B está presente en la fracción citoplásmica y no en la fracción nuclear (Figura 10a) tanto en los cultivos en condiciones N. Ad. y los inducidos con St/Dex. Los marcadores utilizados para distinguir cada fracción fueron α -tubulina para el citoplasma y PARP (Poly ADP-ribose polymerase) para el núcleo.

Sabemos que la localización citoplásmica de FAM129B varía dependiendo del estadio celular y de su estado de fosforilación (Chen et al., 2011; Old et al., 2009). Por consiguiente, al existir un cambio en la fosforilación de FAM129B durante la adipogénesis y una reestructuración del citoesqueleto, es posible que FAM129B pudiera estar variando su distribución en el citoplasma. Para resolver este planteamiento llevamos a cabo ensayos de microscopía confocal, evaluando la distribución de FAM129B en el citoplasma. En los resultados no observamos cambios en su localización al comparar cultivos a lo largo de la primera mitad del compromiso adipogénico (Figura 10b).

Algunas proteínas pueden interactuar con el citoesqueleto a través de su dominio PH (Yao et al., 1999). Entonces es posible que FAM129B pueda unirse al citoesqueleto a través de este dominio. Para ello, evaluamos con una doble

tinción la localización de FAM129B y el citoesqueleto de actina. Como se observa en la Figura 11a, no existe una asociación entre FAM129B y el citoesqueleto en los puntos evaluados. No obstante, a partir de las 12 horas el citoesqueleto de actina muestra su despolimerización parcial, esencial para que ocurra la adipogénesis.

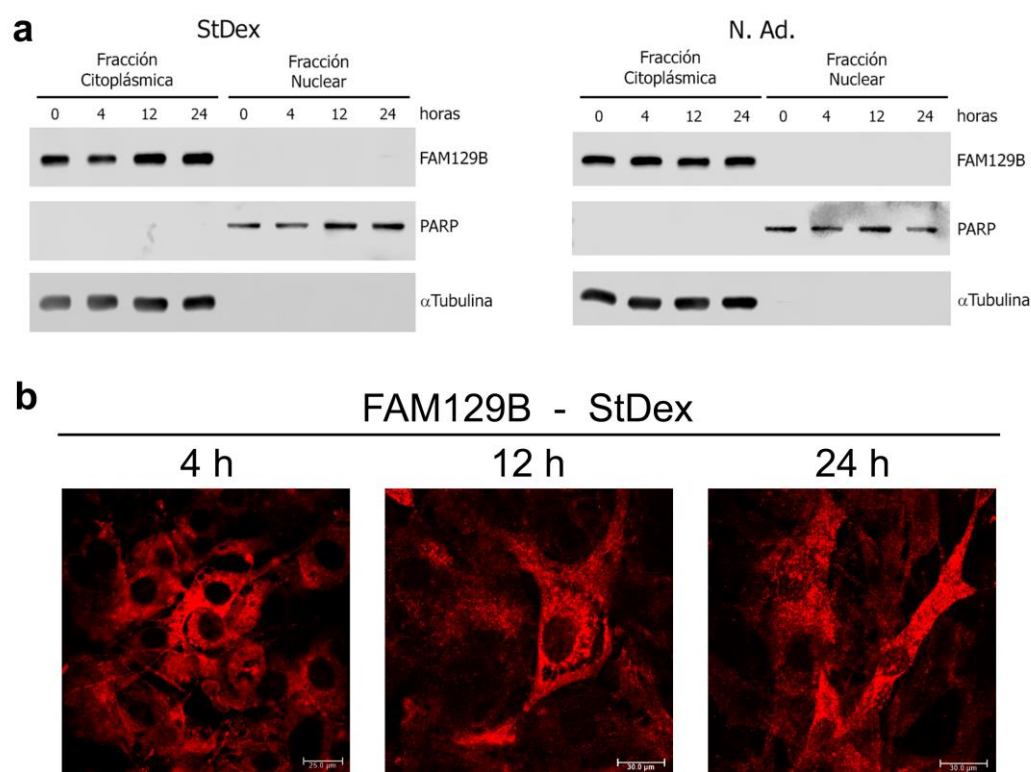


Figura 10. Localización de FAM129B durante el compromiso adipogénico. (a) Evaluación de la localización de FAM129B a través del fraccionamiento citoplásmico y nuclear. (b) La distribución de FAM129B en el citoplasma no cambia durante el compromiso adipogénico.

El conjunto de resultados señala que FAM129B no tiene función como cofactor transcripcional, ya que no es capaz ser translocado hacia el núcleo. El estado de fosforilación de FAM129B no parece promover una distribución puntual en la proteína y aunque no parece encontrarse cerca del citoesqueleto, es importante

señalar que la reorganización del mismo ocurre a la par de la actividad de FAM129B.

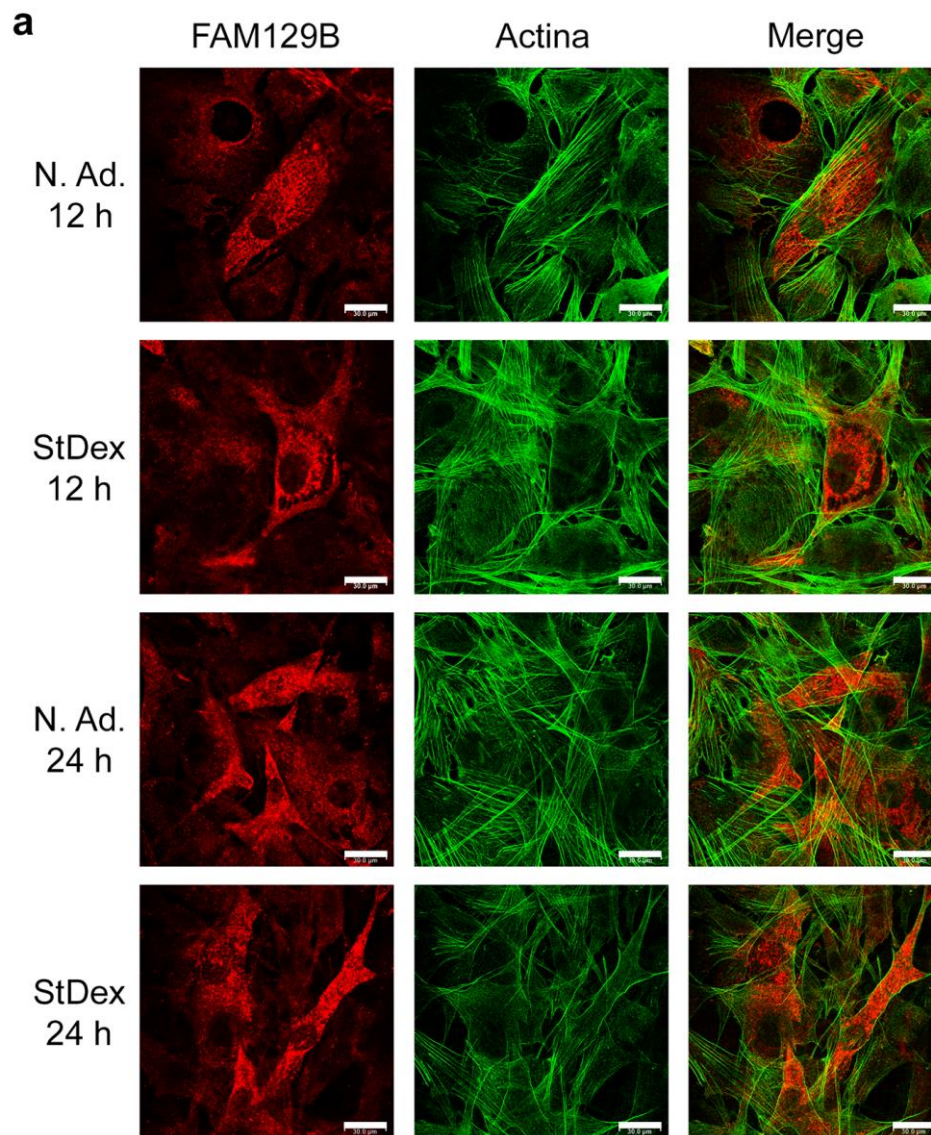


Figura 11. FAM129B no se asocia con el citoesqueleto de actina. (a) Imagen representativa de la evaluación de FAM129B y el citoesqueleto de actina.

FAM129B regula la expansión clonal

Durante la segunda etapa de la adipogénesis, cada una de las células comprometidas hacia el programa de diferenciación, lleva a cabo una multiplicación selectiva para formar un clúster adipogénico (Castro-Muñozledo et al., 2003; Pairault and Green, 1979). Por ende, el número de clústeres resultante corresponde al número de células comprometidas y el tamaño de cada clúster depende del número de ciclos de multiplicación selectiva que se hayan llevado a cabo, dando lugar a clústeres de distinto tamaño (Ayala-Summano et al., 2011; Diaz-Velasquez et al., 2008).

El análisis del número de clústeres muestra dos diferencias importantes entre los cultivos donde se silenció *Fam129b* y los cultivos control. Mientras que los cultivos transfectados con la secuencia "Scramble" presentan el 96% del total del número de clústeres con un tamaño "grande" (18-32 adipocitos) y un 4% de un tamaño "pequeño" (2-8 adipocitos) (Figura 10a). En contraste, en los cultivos silenciados el número total de clústeres disminuyó hasta un 47% comparado con el control, donde el 53% son clústeres grandes, o visto de otra manera, 4 veces menos que el control; y el restante 47% de los clústeres es de tamaño pequeño u 11 veces mayor comparado con los cultivos control (Figura 12a).

En los ensayos donde se inhibió a GSK3 β con SB-415286, el resultado fue similar. El número total de clústeres en los cultivos tratados con SB-415286 se redujo hasta un 27% comparado con el control, de los cuales el 62% son

clústeres de tamaño grande; en otras palabras 5 veces menor que en los cultivos control; el 38% de los clústeres restantes son de tamaño pequeño y representan 9 veces más que en los cultivos control (Figura 12b).

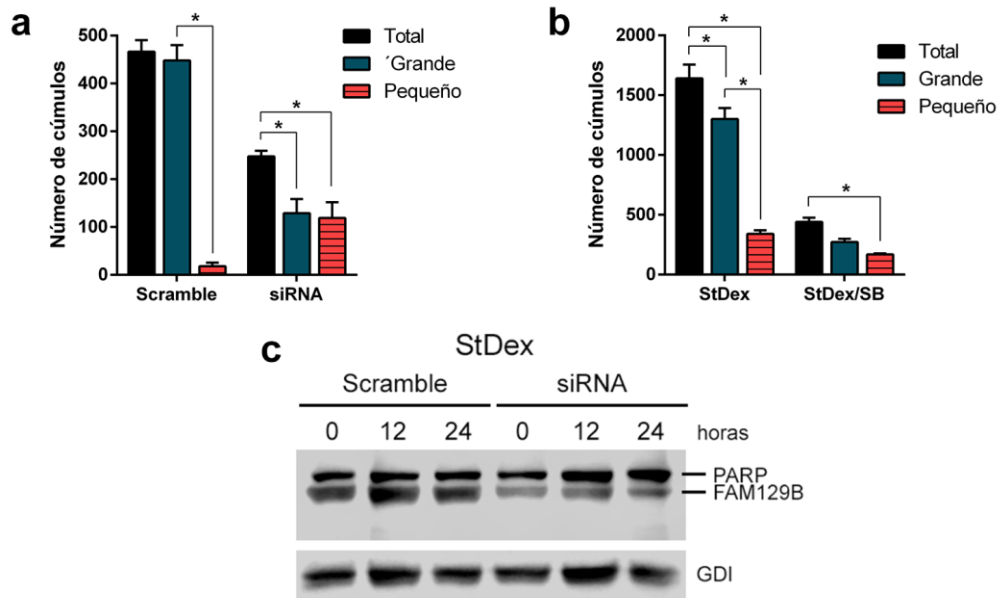


Figura 12. FAM129B regula el tamaño de los clústeres. (a) Evaluación del número y tamaño de los clústeres formados al silenciar a *Fam129b*, n = 4. (b) Evaluación del número y tamaño de los clústeres formados al inhibir a *GSK3β*, n = 3. (c) Inmunodetección de la actividad de PARP posterior al silenciamiento de *Fam129b*.

El incremento en el número de clústeres de tamaño pequeño en los ensayos del silenciamiento de *Fam129b*, así como en los cultivos tratados con SB-415286, pudiera estar relacionado con un aumento de la apoptosis durante la multiplicación selectiva, ya que en ausencia de *Fam129b*, la apoptosis ocurre con mayor velocidad en células HeLa (Chen et al., 2011). Por lo tanto, es posible que al estar FAM129B inactiva o ausente, se active la apoptosis impidiendo así la formación de clústeres de tamaño grande. Consecuentemente evaluamos la activación de la apoptosis mediada por caspasas, ruta en la que

participa FAM129B, con la activación mediante su corte proteolítico de la proteína PARP (Yang et al., 2007). Los resultados muestran que al silenciar a *Fam129b*, no hay una activación de la ruta apoptótica durante la amplificación clonal (Figura 12c).

Otra de las funciones que ha sido atribuida a FAM129B es la regulación de la expresión de algunos genes relacionados con ciclo celular, tales como Ciclina D1 (*Ccnd1*) y c-MYC (*c-Myc*), de manera que al silenciar a *Fam129b* observan una caída importante en la expresión de estos genes (Ji et al., 2016; Zhou et al., 2018). Entonces procedimos a evaluar la expresión de *Ccnd1*, *c-Myc* y algunos otros genes relacionados con la regulación del ciclo celular, en los ensayos de silenciamiento dirigido a *Fam129b*. Los resultados preliminares muestran que ninguno de los genes cambia sus niveles de expresión en ausencia de *Fam129b*, durante el periodo de la expansión clonal (Figura 13a) (Anexo I).

Abordar la participación de FAM129B en la regulación del ciclo celular también puede evaluarse en los cultivos 3T3-F442A durante su crecimiento exponencial, es decir antes de que alcancen confluencia y se lleve a cabo el tratamiento adipogénico. Para ello, evaluamos los niveles de expresión de *Fam129b* en cultivos pre confluentes (preC), en cultivos confluentes (C), transcurridas 16 horas postconfluencia (16 pC), 32 horas postconfluencia (32 pC) y 48 horas postconfluencia (48 pC). Es importante recordar que el estímulo adipogénico se inicia cuando los cultivos han alcanzado 2 días

postconfluencia, es decir, el punto 48 pC representa el estadio de los cultivos justo antes de iniciar el estímulo con St/Dex.

Los resultados muestran que al encontrarse en crecimiento exponencial (preC), la expresión de *Fam129b* es 87% mayor que a los 2 días postconfluencia (48 pC), cuando las células alcanzan confluencia los niveles de *Fam129b* disminuyen y mantienen esta tendencia mientras los cultivos van entrando en reposo (Figura 13b).

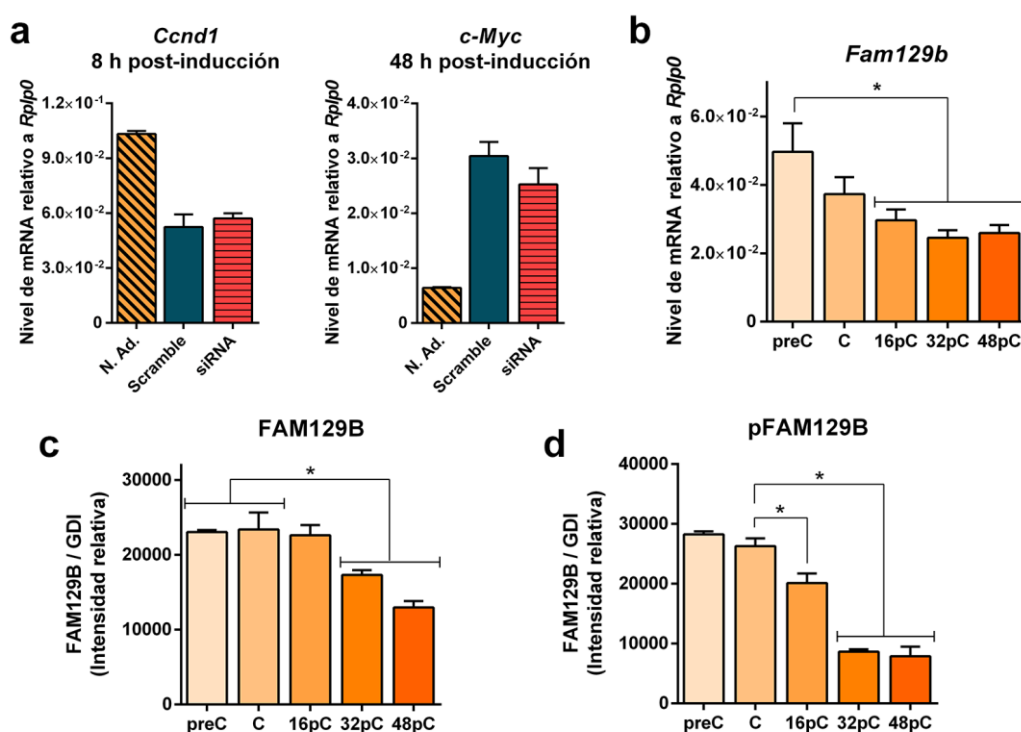


Figura 13. La expresión de *Fam129b* y la actividad de su proteína se encuentran incrementadas en células en crecimiento exponencial. (a) Evaluación de la expresión de *Ccnd1* y *c-Myc* tras el silenciamiento de *Fam129b*, n = 2. (b) Expresión del gen *Fam129b* en la línea 3T3-F442A antes de realizar el estímulo adipogénico, n = 3. (c) Análisis densitométrico de la expresión de la proteína FAM129B previo al estímulo con St/Dex, n = 3. (d) Análisis densitométrico de la fosforilación de FAM129B previo a la inducción con St/Dex, n = 3.

Los niveles de proteína también mostraron un comportamiento similar, en los cultivos en crecimiento FAM129B tiene 80% mayor expresión comparado con los 2 días postconfluencia (48 pC). Pese a ello, sus niveles de expresión son mucho más estables y comienzan a disminuir hasta 32 horas después de haber alcanzado la confluencia (Figura 13c). Posteriormente evaluamos el estado de fosforilación de FAM129B en estas condiciones, encontrando que este comportamiento está mucho más acentuado, ya que hay casi 4 veces más pFAM129B en las células en crecimiento exponencial comparado con los cultivos a los 48 pC (Figura 13d). Unas horas después de la confluencia, los niveles de pFAM129B se pierden rápidamente hasta alcanzar un equilibrio en los cultivos 32 pC, donde se observan niveles basales de fosforilación en la proteína FAM129B (Figura 13d).

Estos resultados nos sugieren que FAM129B está estrechamente relacionado con el proceso de división celular y que su actividad mediada por su fosforilación es indispensable para que desempeñe su función. De manera que resulta muy probable que el proceso de multiplicación selectiva y el tamaño final de los clústeres esté regulado por la actividad de FAM129B.

DISCUSIÓN

Existe una gran variedad de factores que regulan la diferenciación adiposa, no obstante, aún hay muchas proteínas por descubrir, con funciones reguladoras de la cascada principal de la adipogénesis, así como en rutas alternas que favorecen este proceso de diferenciación. En el presente trabajo presentamos a la proteína FAM129B con una función reguladora en el proceso de diferenciación celular, particularmente en la adipogénesis.

A través del modelo St/Dex, como inductor adipogénico, en la línea 3T3-F442A, podemos encontrar nuevos factores clave en la adipogénesis. El periodo corto de inducción de este modelo permite identificar con claridad las etapas del proceso de diferenciación adiposa: el compromiso, la expansión clonal y la expresión del fenotipo; y con ellos entender de una forma mucho más clara, los eventos que ocurren en cada una de ellas.

En este trabajo demostramos el mRNA que codifica para FAM129B, y la proteína correspondiente se expresan de forma temprana y transitoria, delimitándose a la primera etapa de la diferenciación adiposa, es decir durante el compromiso. Es interesante observar que existe un desfase entre la expresión del mRNA y su proteína. Por un lado, los niveles del mRNA de *Fam129b* tiene su expresión máxima a las 4 horas postinducción, incrementando hasta 8 veces el número de copias disponibles, mientras que los niveles de proteína incrementan 8 horas después y sólo en un 30%. Esto puede ser una consecuencia de la estructura del mRNA de *Fam129b*, que

probablemente tenga un conjunto de regulaciones (sesgo de codones, longitud y estructura de regiones UTR, proteínas de unión a RNA, etc.) que retrasen su traducción, siendo necesarios para que la función de FAM129B se lleve a cabo en el momento indicado.

El gen *Fam129b* es necesario para que ocurra la adipogénesis, ya que, al silenciar su expresión, los niveles de *Pparg2* disminuyen un 60%, al igual que los niveles de otros genes que regulan la expresión del fenotipo adiposo y consecuentemente la diferenciación adiposa se bloquea. Sin embargo, los genes que codifican para las proteínas de participación temprana en la adipogénesis, como C/EBP β , KLF4, KLF5 y SREBP1a, no son afectados por el silenciamiento de *Fam129b*. Este resultado demuestra que la participación de FAM129B ocurre río-abajo de los genes tempranos, pero río arriba de PPAR γ 2 (Figura 14).

Una de las posibles explicaciones para la regulación de la expresión de *Pparg2* por FAM129B, es a través de la ruta antioxidante que dirige el factor de transcripción NRF2. Bajo condiciones fisiológicas, NRF2 se mantiene en el citoplasma y se une a KEAP1, favoreciendo así la degradación de NRF2 vía proteosoma (Zhang et al., 2015). Ante señales de estrés oxidativo, FAM129B se une a KEAP1 impidiendo que NRF2 se degrade, posteriormente los niveles de NRF2 aumentan, permitiendo que se transloque al núcleo y active la respuesta antioxidante (Cheng et al., 2019). La fosforilación de FAM129B juega un papel importante en este proceso, ya que es indispensable que FAM129B se encuentre fosforilado para poder unirse a KEAP1 (Schmidlin et al., 2021). Se ha

demostrado que al silenciar a *Keap1* o sobreexpresar a NRF2 en la línea 3T3-L1, los niveles de *Pparg2* y *Cebpa* aumentan y con ello se potencia la adipogénesis (Pi et al., 2010).

Otro factor que tiene una función importante en la adipogénesis, y que está relacionado con el factor antioxidante NRF2, es RXR α (Retinoid X receptor alpha). Este receptor nuclear tiene la capacidad de formar heterodímeros con diferentes proteínas como PPAR γ 2 para activar la expresión de genes que regulan la adipogénesis (Neidhart, 2015). De igual manera, RXR α forma un heterodímero con NRF2 para favorecer la expresión de *Pparg2* (Chorley et al., 2012). Entonces, es posible que FAM129B regule la adipogénesis bloqueando a KEAP1, permitiendo así que NRF2 se transloque al núcleo e interactúe con RXR α favoreciendo la expresión de *Pparg2*. Esto explicaría porqué al silenciar a *Fam129b* o inactivar su función mediante la inhibición de GSK3 β , los niveles de expresión de *Pparg2* disminuyen en ambos casos un 60% (Figura 14).

La cinasa GSK3 β es fundamental en la regulación de la cascada de señalización durante la adipogénesis. La inhibición de su actividad mediante drogas como SB-415286, reduce los niveles de expresión de *Fam129b*, así como su actividad mediada por fosforilación, lo cual resulta en una inhibición de la diferenciación adiposa. El inhibidor SB-415286 también afecta la actividad del factor de transcripción C/EBP β , ya que su actividad depende directamente de GSK3 β . Por esta razón, observamos que en presencia de SB-415286 los niveles de fosforilación de C/EBP β disminuyen y con ello también se reducen los niveles de diferenciación adiposa (Ayala-Summano et al., 2011). Un análisis

in silico sugiere que el promotor putativo de *Fam129b* es regulado por elementos que participan en la cascada adipogénica, tales como C/EBP β , KLF4 o C/EBP δ (Anexo I). Por lo tanto, es posible que GSK3 β utilice como intermediario a C/EBP β para regular la expresión de *Fam129b*. Esto explicaría por qué al inactivar a GSK3 β y disminuir la fosforilación de C/EBP β , los niveles de *Fam129b* disminuyen notablemente (Figura 14).

Potencialmente existen otros candidatos interesantes para regular la expresión de *Fam129b*, como c-MYC o p53, que son clave para la progresión de ciclo celular, pues como se demuestra en este trabajo, FAM129B participa en la amplificación clonal.

El análisis del comportamiento de la proteína mediante ensayos de inmunodetección muestra que existe un incremento del 45% en la fosforilación de FAM129B en los cultivos tratados con St/Dex. Este resultado sugiere que la fosforilación de FAM129B es importante para su actividad en el programa adipogénico. ERK1/2 es una de las proteínas responsables de promover la activación de FAM129B. Esta cinasa se enciende durante los primeros 15 minutos del compromiso adipogénico y es responsable de incrementar un 40% la fosforilación de FAM129B durante la inducción. Por otro lado, GSK3 β tiene la responsabilidad de reclutar a FAM129B en el programa adipogénico, aprovechando que ERK1/2 previamente fosforila y activa a los residuos Ser⁶⁷⁴ y Ser⁶⁹⁹ dentro del sitio consenso que GSK3 β es capaz de reconocer, S/TXXXpS/pT. Es en este contexto, donde GSK3 β fosforila a FAM129B en los residuos Ser⁶⁷⁰ y Ser⁶⁹⁶, para reclutarla como un elemento esencial y

colaborativo de la adipogénesis. En la Figura 14, se muestra el diagrama que integra la participación de FAM129B en la regulación de la diferenciación adiposa.

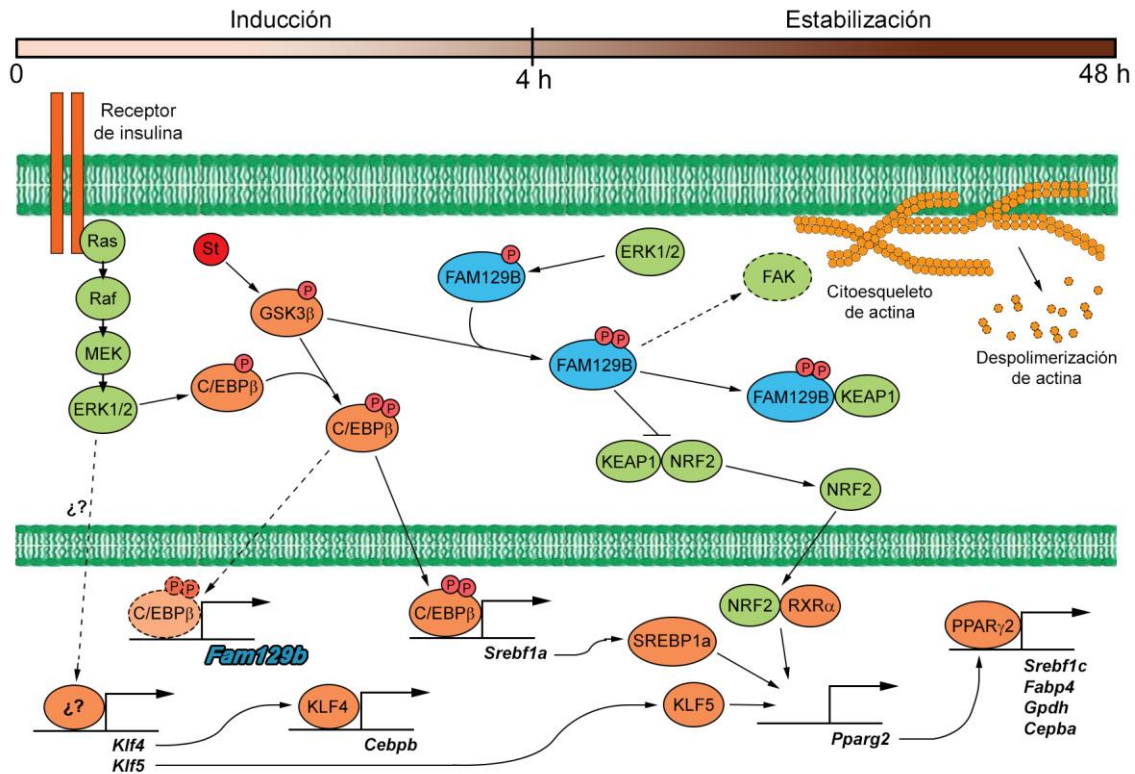


Figura 14. Diagrama representativo de la participación del gen *Fam129b* como un elemento que regula positivamente la adipogénesis.

Durante la diferenciación adiposa, la localización de FAM129B es citoplásmica, indicando que no tiene ninguna función como cofactor transcripcional para regular la expresión de posibles genes blanco. No obstante, su distribución citoplásmica, no varía debido a su estado de fosforilación, como ocurre en células de melanoma (Old et al., 2009). Los resultados obtenidos a partir de microscopía confocal muestran que FAM129B no tiene una interacción

directa con el citoesqueleto en los tiempos evaluados, sin embargo, existen diferentes elementos que nos hacen suponer que FAM129B podría estar regulando la reorganización del citoesqueleto.

Sabemos que el dominio PH de FAM129B le da la posibilidad de interactuar con el citoesqueleto de actina, tal como ocurre en algunas proteínas como pleckstrina, dinamina, espectrina o BTK (Bruton's tyrosine kinase) (Yao et al., 1999). Otro argumento a favor de esta hipótesis es la estrecha relación que hay entre FAM129B y la proteína FAK. FAM129B es responsable de favorecer la fosforilación de FAK y con ello regular su actividad (Zhou et al., 2018). Asimismo, FAK es una proteína que participa en la dinámica y organización del citoesqueleto de actina y tubulina (Schaller, 2010). FAK también tiene la capacidad de interactuar con una gran variedad de proteínas accesorias del citoesqueleto (Fabry et al., 2011), además de estar involucrada en la regulación de la mitosis (Park et al., 2009).

Finalmente, el planteamiento de la probable relación entre FAM129B y la reorganización del citoesqueleto, se ve reforzado cuando observamos que la máxima actividad de FAM129B ocurre posterior a las 12 horas de haber iniciado el tratamiento con St/Dex, lo cual concurre con la despolimerización del citoesqueleto y la degradación de actina, tubulina y vimentina, proceso indispensable para que inicie la síntesis de lípidos en los adipocitos (Figura 14).

Los ensayos de silenciamiento también nos mostraron que en ausencia de *Fam129b*, hay un cambio importante en el tamaño de los clústeres en los

cultivos donde evaluamos la diferenciación terminal adiposa. Ya que cada uno de los clústeres formados proviene de la amplificación selectiva, proveniente de una célula que entró en el compromiso adipogénico, podemos distinguir con claridad dos grupos, aquellos formados por clústeres de tamaño “grande” (18-32 adipocitos; 4-5 ciclos celulares) y los “pequeños” (2-8 adipocitos: 1-3 ciclos celulares). La inhibición de GSK3 β y el silenciamiento de *Fam129b* dieron resultados similares, lo cual indica que la presencia de FAM129B y su actividad mediada por fosforilación a través de GSK3 β , es indispensable para que el compromiso y la expansión clonal se lleven a cabo de forma eficiente.

Es probable que FAM129B no solo regule la multiplicación selectiva dentro del proceso de diferenciación adiposa, sino que esté relacionada con la división celular. Los resultados de la evaluación de la expresión de *Fam129b*, así como la actividad de la proteína en cultivos durante la etapa de crecimiento exponencial, varios días previos al tratamiento con St/Dex, señalan que FAM129B tiene una participación muy activa durante este periodo, en el que las células se encuentran en constante proliferación.

Una manera distinta de abordar la diferencia en el tamaño de los clústeres formados es a través de la apoptosis. Ya que en células HeLa, después de silenciar *Fam129b* observan que la apoptosis ocurre con mayor rapidez (Chen et al., 2011). En consecuencia, sería posible plantearnos que FAM129B regulara la adipogénesis llevando a cabo un rol antiapoptótico, de tal manera que la amplificación clonal se llevara a cabo de manera completa en presencia de FAM129B. Por el contrario, al silenciar *Fam129b*, las células

comprometidas podrían estar pasando por un proceso apoptótico que les impidiera formar clústeres de tamaño grande, perdiendo en el proceso las células resultantes de la amplificación transitoria. Sin embargo, los resultados muestran que durante el silenciamiento de *Fam129b*, no se promueve el corte y la activación de PARP, manteniendo así a la apoptosis fuera de la ecuación.

Los resultados del tamaño de los clústeres también nos sugieren que alrededor del 25% de la población de células inducidas no está regulada por FAM129B, ya que esta población lleva a cabo el proceso de diferenciación adiposa de forma completa. Podemos observar que en aquellos experimentos en los que se silenció a *Fam129b* o se inactivó su función, una parte de la población celular logró formar clústeres de tamaño grande. Como se ha demostrado anteriormente, la línea 3T3-F442A tiene subpoblaciones de células con características similares a células troncales (Ayala-Sumuano et al., 2011). Estas subpoblaciones incluyen progenitores que al ser inducidos al compromiso adipogénico, dan lugar a dos grupos distintos de células comprometidas durante la expansión clonal. El primer grupo responde solamente al inductor St, mientras que el segundo grupo de células es sensible a la combinación St/Dex (Ayala-Sumuano et al., 2011). Estas poblaciones celulares distintas, también pueden ser identificados mediante la expresión de algunos factores de transcripción como KLF4 y KLF5, ya que la expresión de Klf4 responde únicamente al estímulo con St, mientras que Klf5 depende de la combinación St/Dex (Cervantes-Camacho et al., 2015). Por lo tanto, es probable que

FAM129B regule el reclutamiento adipogénico de uno de estos grupos de células comprometidas.

La función reguladora que tiene FAM129B sobre la amplificación clonal y el compromiso adipogénico nos lleva a sugerir que la posible función de FAM129B en el tejido *in vivo* contribuya al desarrollo del tejido adiposo, así como al incremento del número de adipocitos durante la hiperplasia en personas que padecen obesidad. Resultados obtenidos por el grupo de trabajo del Dr. Walid Kuri Harcuch muestran que *Fam129b* se expresa en diferentes proporciones en el tejido inguinal, epididimal e interescapular, es decir, en los tres tipos de tejido adiposo, blanco, beige y pardo (Anexo I).

Al concluir este trabajo quedan algunas preguntas por responder.

¿Cuáles son los mecanismos que regulan la traducción de FAM129B y que nos permite ver un desfase entre la expresión del mRNA y la proteína? El plegamiento de la proteína, hasta ahora completamente novedoso ¿explica el desfase en la traducción? Es probable que FAM129B participe de forma cooperativa en la adipogénesis en rutas distintas, ya sea regulando la expansión clonal, la reorganización del citoesqueleto o favoreciendo la expresión de *Pparg2* a través de la ruta de NRF2. No obstante, aquellas poblaciones de células que no parecen depender de FAM129B, ¿qué mecanismos utilizan para coordinar las funciones que desempeña FAM129B? ¿Es acaso FAM129B crucial para otros procesos de diferenciación o solo regula la adipogénesis?

A partir de los resultados que presentamos podemos concluir que el compromiso de la diferenciación adiposa depende de la actividad de FAM129B. Al activarse GSK3 β mediante St/Dex, favorece la expresión de *Fam129b*, posiblemente a través de C/EBP β . Además, FAM129B es fosforilado en los primeros minutos del compromiso adipogénico por ERK1/2, permitiendo así que GSK3 β reconozca su sitio consenso y reclute a FAM129B en el proceso de diferenciación adiposa. El punto máximo de actividad de FAM129B ocurre a las 12 horas postinducción, al mismo tiempo que la reorganización del citoesqueleto, donde es posible que FAM129B regule dicho proceso por medio de FAK. Es indispensable la participación de FAM129B para que la expansión clonal ocurra de forma eficiente, formando clústeres de entre 18-32 adipocitos (hasta 5 ciclos celulares). Esta ruta está coordinada a través de las MAPK y C/EBP β . Finalmente FAM129B favorece la expresión de *Pparg2*, quizá por medio de la ruta antioxidante que regula NRF2. Y en todas estas funciones es indispensable la actividad de FAM129B mediada por su fosforilación.

Lo poco que se conoce acerca de FAM129B se ha desarrollado en líneas celulares neoplásicas, sin embargo, los mecanismos y su papel biológico aún no se entiende con claridad. Nuestro trabajo describe una participación amplia de FAM129B en un proceso de diferenciación, dando una nueva perspectiva de las funciones que desempeña FAM129B.

BIBLIOGRAFÍA

- Ayala-Sumuano, J.-T., C. Velez-Del Valle, A. Beltrán-Langarica, J.M. Hernández, and W. Kuri-Harcuch. 2008. Adipogenic genes on induction and stabilization of commitment to adipose conversion. *Biochemical and biophysical research communications*. 374:720-724.
- Ayala-Sumuano, J.-T., C. Velez-delValle, A. Beltrán-Langarica, M. Marsch-Moreno, J. Cerbón-Solorzano, and W. Kuri-Harcuch. 2011. Srebf1a is a key regulator of transcriptional control for adipogenesis. *Scientific reports*. 1:178.
- Bennett, C.N., S.E. Ross, K.A. Longo, L. Bajnok, N. Hemati, K.W. Johnson, S.D. Harrison, and O.A. MacDougald. 2002. Regulation of Wnt signaling during adipogenesis. *The Journal of biological chemistry*. 277:30998-31004.
- Birsoy, K., Z. Chen, and J. Friedman. 2008. Transcriptional regulation of adipogenesis by KLF4. *Cell metabolism*. 7:339-347.
- Blom, N., S. Gammeltoft, and S. Brunak. 1999. Sequence and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites. *J Mol Biol*. 294:1351-1362.
- Bommer, G.T., and O.A. MacDougald. 2011. Regulation of lipid homeostasis by the bifunctional SREBF2-miR33a locus. *Cell metabolism*. 13:241-247.
- Cao, Z., R.M. Umek, and S.L. McKnight. 1991. Regulated expression of three C/EBP isoforms during adipose conversion of 3T3-L1 cells. *Genes & development*. 5:1538-1552.
- Castro-Muñozledo, F., A. Beltrán-Langarica, and W. Kuri-Harcuch. 2003. Commitment of 3T3-F442A cells to adipocyte differentiation takes place during the first 24–36 h after adipogenic stimulation: TNF- α inhibits commitment. *Experimental cell research*. 284:161-170.
- Castro-Munozledo, F., M. Marsch-Moreno, A. Beltran-Langarica, and W. Kuri-Harcuch. 1987. Commitment of adipocyte differentiation in 3T3 cells is inhibited by retinoic acid, and the expression of lipogenic enzymes is modulated through cytoskeleton stabilization. *Differentiation*. 36:211-219.
- Catimel, B., E. Kapp, M.X. Yin, M. Gregory, L.S. Wong, M. Condrón, N. Church, N. Kershaw, A.B. Holmes, and A.W. Burgess. 2013. The PI(3)P interactome from a colon cancer cell. *J Proteomics*. 82:35-51.
- Cereijo, R., M. Giralt, and F. Villarroya. 2015. Thermogenic brown and beige/brite adipogenesis in humans. *Ann Med*. 47:169-177.
- Cervantes-Camacho, C., A. Beltrán-Langarica, A.-K. Ochoa-Urbe, M. Marsch-Moreno, J.-T. Ayala-Sumuano, C. Velez-delValle, and W. Kuri-Harcuch. 2015. The transient expression of Klf4 and Klf5 during adipogenesis depends on GSK3 β activity. *Adipocyte*. 4:248-255.
- Chait, A., and L.J. den Hartigh. 2020. Adipose Tissue Distribution, Inflammation and Its Metabolic Consequences, Including Diabetes and Cardiovascular Disease. *Front Cardiovasc Med*. 7:22.
- Charriere, G., B. Cousin, E. Arnaud, M. Andre, F. Bacou, L. Penicaud, and L. Casteilla. 2003. Preadipocyte conversion to macrophage. Evidence of plasticity. *The Journal of biological chemistry*. 278:9850-9855.
- Chen, S., H.G. Evans, and D.R. Evans. 2011. FAM129B/MINERVA, a novel adherens junction-associated protein, suppresses apoptosis in HeLa cells. *The Journal of biological chemistry*. 286:10201-10209.
- Cheng, K.C., R.J. Lin, J.Y. Cheng, S.H. Wang, J.C. Yu, J.C. Wu, Y.J. Liang, H.M. Hsu, J. Yu, and A.L. Yu. 2019. FAM129B, an antioxidative protein, reduces

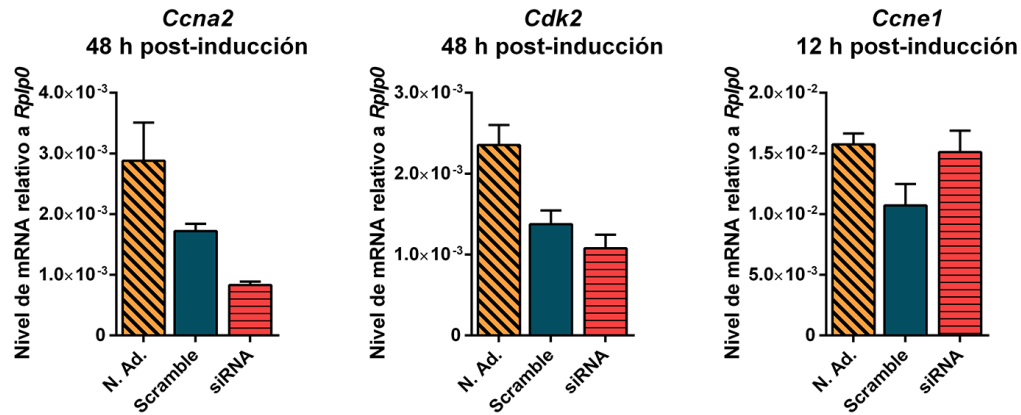
- chemosensitivity by competing with Nrf2 for Keap1 binding. *EBioMedicine*. 45:25-38.
- Chorley, B.N., M.R. Campbell, X. Wang, M. Karaca, D. Sambandan, F. Bangura, P. Xue, J. Pi, S.R. Kleeberger, and D.A. Bell. 2012. Identification of novel NRF2-regulated genes by ChIP-Seq: influence on retinoid X receptor alpha. *Nucleic acids research*. 40:7416-7429.
- Conrad, W., M.B. Major, M.A. Cleary, M. Ferrer, B. Roberts, S. Marine, N. Chung, W.T. Arthur, R.T. Moon, J.D. Berndt, and A.J. Chien. 2013. FAM129B is a novel regulator of Wnt/beta-catenin signal transduction in melanoma cells. *F1000Research*. 2:134.
- Diaz-Velasquez, C.E., F. Castro-Muñozledo, and W. Kuri-Harcuch. 2008. Staurosporine rapidly commits 3T3-F442A cells to the formation of adipocytes by activation of GSK-3 β and mobilization of calcium. *Journal of cellular biochemistry*. 105:147-157.
- Fabry, B., A.H. Klemm, S. Kienle, T.E. Schäffer, and W.H. Goldmann. 2011. Focal adhesion kinase stabilizes the cytoskeleton. *Biophysical journal*. 101:2131-2138.
- Fantuzzi, G., and T. Mazzone. 2007. Adipose Tissue and Adipokines in Health and Disease.
- Fiol, C.J., A.M. Mahrenholz, Y. Wang, R.W. Roeske, and P.J. Roach. 1987. Formation of protein kinase recognition sites by covalent modification of the substrate. Molecular mechanism for the synergistic action of casein kinase II and glycogen synthase kinase 3. *The Journal of biological chemistry*. 262:14042-14048.
- Flores-Delgado, G., M. Marsch-Moreno, and W. Kuri-Harcuch. 1987. Thyroid hormone stimulates adipocyte differentiation of 3T3 cells. *Molecular and cellular biochemistry*. 76:35-43.
- Green, H., and O. Kehinde. 1974. Sublines of mouse 3T3 cells that accumulate lipid. *Cell*. 1:113-116.
- Green, H., and O. Kehinde. 1976. Spontaneous heritable changes leading to increased adipose conversion in 3T3 cells. *Cell*. 7:105-113.
- Green, H., and O. Kehinde. 1979. Formation of normally differentiated subcutaneous fat pads by an established preadipose cell line. *Journal of cellular physiology*. 101:169-171.
- Green, H., M. Morikawa, and T. Mxon. 1985. A dual effector theory of growth-hormone action. *Differentiation*. 29:195-198.
- Guo, L., X. Li, and Q.Q. Tang. 2015. Transcriptional regulation of adipocyte differentiation: a central role for CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP) beta. *The Journal of biological chemistry*. 290:755-761.
- Hahn, H., D.E. Lee, D.M. Jang, J. Kim, Y. Lee, H. Cheong, B.W. Han, and H.S. Kim. 2020. Structural Insight on Functional Regulation of Human MINERVA Protein. *International journal of molecular sciences*. 21.
- INEGI. 2022. Estadística de defunciones registrada de enero a junio de 2021.
- Ji, H., J.H. Lee, Y. Wang, Y. Pang, T. Zhang, Y. Xia, L. Zhong, J. Lyu, and Z. Lu. 2016. EGFR phosphorylates FAM129B to promote Ras activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 113:644-649.
- Jumper, J., R. Evans, A. Pritzel, T. Green, M. Figurnov, O. Ronneberger, K. Tunyasuvunakool, R. Bates, A. Zidek, A. Potapenko, A. Bridgland, C. Meyer, S.A.A. Kohl, A.J. Ballard, A. Cowie, B. Romera-Paredes, S. Nikolov, R. Jain, J. Adler, T. Back, S. Petersen, D. Reiman, E. Clancy, M. Zielinski, M. Steinegger, M. Pacholska, T. Berghammer, S. Bodenstein, D. Silver, O. Vinyals, A.W. Senior, K. Kavukcuoglu, P. Kohli, and D. Hassabis. 2021. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature*. 596:583-589.

- Koivisto, L., K. Alavian, L. Häkkinen, S. Pelech, C.A. McCulloch, and H. Larjava. 2003. Glycogen synthase kinase-3 regulates formation of long lamellipodia in human keratinocytes. *Journal of cell science*. 116:3749-3760.
- Kuri-Harcuch, W., and H. Green. 1978. Adipose conversion of 3T3 cells depends on a serum factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 75:6107-6109.
- Kwok, K.H., K.S. Lam, and A. Xu. 2016. Heterogeneity of white adipose tissue: molecular basis and clinical implications. *Exp Mol Med*. 48:e215.
- Livak, K.J., and T.D. Schmittgen. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *methods*. 25:402-408.
- Lobstein, T., H. Brinsden, and M. Neveux. 2022. World Obesity Atlas 2022.
- Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr, and R.J. Randall. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of biological chemistry*. 193:265-275.
- MacDonald, B.T., K. Tamai, and X. He. 2009. Wnt/beta-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. *Developmental cell*. 17:9-26.
- Majima, S., K. Kajino, T. Fukuda, F. Otsuka, and O. Hino. 2000. A novel gene "Niban" upregulated in renal carcinogenesis: cloning by the cDNA-amplified fragment length polymorphism approach. *Jpn J Cancer Res*. 91:869-874.
- Mandrup, S., T.M. Loftus, O.A. MacDougald, F.P. Kuhajda, and M.D. Lane. 1997. Obese gene expression at in vivo levels by fat pads derived from sc implanted 3T3-F442A preadipocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 94:4300-4305.
- Morikawa, M., H. Green, and U.J. Lewis. 1984. Activity of human growth hormone and related polypeptides on the adipose conversion of 3T3 cells. *Molecular and cellular biology*. 4:228-231.
- Morikawa, M., T. Nixon, and H. Green. 1982. Growth hormone and the adipose conversion of 3T3 cells. *Cell*. 29:783-789.
- Neidhart, M. 2015. DNA methylation and complex human disease. Academic Press.
- Oishi, H., S. Itoh, K. Matsumoto, H. Ishitobi, R. Suzuki, M. Ema, T. Kojima, K. Uchida, M. Kato, T. Miyata, and S. Takahashi. 2012. Delayed cutaneous wound healing in Fam129b/Minerva-deficient mice. *Journal of biochemistry*. 152:549-555.
- Oishi, Y., I. Manabe, K. Tobe, K. Tsushima, T. Shindo, K. Fujiu, G. Nishimura, K. Maemura, T. Yamauchi, N. Kubota, R. Suzuki, T. Kitamura, S. Akira, T. Kadowaki, and R. Nagai. 2005. Kruppel-like transcription factor KLF5 is a key regulator of adipocyte differentiation. *Cell metabolism*. 1:27-39.
- Old, W.M., J.B. Shabb, S. Houel, H. Wang, K.L. Coutts, C.Y. Yen, E.S. Litman, C.H. Croy, K. Meyer-Arendt, J.G. Miranda, R.A. Brown, E.S. Witze, R.E. Scheppe, K.A. Resing, and N.G. Ahn. 2009. Functional proteomics identifies targets of phosphorylation by B-Raf signaling in melanoma. *Molecular cell*. 34:115-131.
- Pairault, J., and H. Green. 1979. A study of the adipose conversion of suspended 3T3 cells by using glycerophosphate dehydrogenase as differentiation marker. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 76:5138-5142.
- Park, A.Y., T.-L. Shen, S. Chien, and J.-L. Guan. 2009. Role of focal adhesion kinase Ser-732 phosphorylation in centrosome function during mitosis. *Journal of Biological Chemistry*. 284:9418-9425.
- Pi, J., L. Leung, P. Xue, W. Wang, Y. Hou, D. Liu, E. Yehuda-Shnaidman, C. Lee, J. Lau, and T.W. Kurtz. 2010. Deficiency in the nuclear factor E2-related factor-2 transcription factor results in impaired adipogenesis and protects against diet-induced obesity. *Journal of Biological Chemistry*. 285:9292-9300.
- Press, C.S.H. 2017. RIPA lysis buffer. *Cold Spring Harb. Protoc*.

- Prusty, D., B.-H. Park, K.E. Davis, and S.R. Farmer. 2002. Activation of MEK/ERK Signaling Promotes Adipogenesis by Enhancing Peroxisome Proliferator-activated Receptor γ (PPAR γ) and C/EBP α Gene Expression during the Differentiation of 3T3-L1 Preadipocytes. *Journal of Biological Chemistry*. 277:46226-46232.
- Ramirez-Zacarias, J.L., F. Castro-Munozledo, and W. Kuri-Harcuch. 1992. Quantitation of adipose conversion and triglycerides by staining intracytoplasmic lipids with Oil red O. *Histochemistry*. 97:493-497.
- Richard, A., U. White, C. Elks, RD, and J. Stephens. 2020. Adipose Tissue: Physiology to Metabolic Dysfunction.
- Riverso, M., V. Montagnani, and B. Stecca. 2017. KLF4 is regulated by RAS/RAF/MEK/ERK signaling through E2F1 and promotes melanoma cell growth. *Oncogene*. 36:3322-3333.
- Rubin, C.S., A. Hirsch, C. Fung, and O.M. Rosen. 1978. Development of hormone receptors and hormonal responsiveness in vitro. Insulin receptors and insulin sensitivity in the preadipocyte and adipocyte forms of 3T3-L1 cells. *The Journal of biological chemistry*. 253:7570-7578.
- Ruiz-Ojeda, F.J., A.I. Ruperez, C. Gomez-Llorente, A. Gil, and C.M. Aguilera. 2016. Cell Models and Their Application for Studying Adipogenic Differentiation in Relation to Obesity: A Review. *International journal of molecular sciences*. 17.
- Russell, T.R., and R. Ho. 1976. Conversion of 3T3 fibroblasts into adipose cells: triggering of differentiation by prostaglandin F 2α and 1-methyl-3-isobutyl xanthine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 73:4516-4520.
- Schaller, M.D. 2010. Cellular functions of FAK kinases: insight into molecular mechanisms and novel functions. *Journal of cell science*. 123:1007-1013.
- Schmidlin, C.J., W. Tian, M. Dodson, E. Chapman, and D.D. Zhang. 2021. FAM129B-dependent activation of NRF2 promotes an invasive phenotype in BRAF mutant melanoma cells. *Molecular carcinogenesis*. 60:331-341.
- Schneider, C.A., W.S. Rasband, and K.W. Eliceiri. 2012. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature methods*. 9:671-675.
- Skillington, J., L. Choy, and R. Derynck. 2002. Bone morphogenetic protein and retinoic acid signaling cooperate to induce osteoblast differentiation of preadipocytes. *J Cell Biol*. 159:135-146.
- Spiegelman, B.M., and S.R. Farmer. 1982. Decreases in tubulin and actin gene expression prior to morphological differentiation of 3T3 adipocytes. *Cell*. 29:53-60.
- Suleiman, J.B., M. Mohamed, and A.B.A. Bakar. 2020. A systematic review on different models of inducing obesity in animals: Advantages and limitations. *J Adv Vet Anim Res*. 7:103-114.
- Tang, Q.-Q., M. Grønborg, H. Huang, J.-W. Kim, T.C. Otto, A. Pandey, and M.D. Lane. 2005. Sequential phosphorylation of CCAAT enhancer-binding protein β by MAPK and glycogen synthase kinase 3β is required for adipogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 102:9766-9771.
- Tang, Q.Q., and M.D. Lane. 1999. Activation and centromeric localization of CCAAT/enhancer-binding proteins during the mitotic clonal expansion of adipocyte differentiation. *Genes & development*. 13:2231-2241.
- ThermoFisher. 2007. Nuclear Extraction Protocol.

- Todaro, G.J., and H. Green. 1963. Quantitative studies of the growth of mouse embryo cells in culture and their development into established lines. *The Journal of cell biology*. 17:299-313.
- Tontonoz, P., E. Hu, R.A. Graves, A.I. Budavari, and B.M. Spiegelman. 1994. mPPAR gamma 2: tissue-specific regulator of an adipocyte enhancer. *Genes & development*. 8:1224-1234.
- UniProt, C. 2021. UniProt: the universal protein knowledgebase in 2021. *Nucleic acids research*. 49:D480-D489.
- Varadi, M., S. Anyango, M. Deshpande, S. Nair, C. Natassia, G. Yordanova, D. Yuan, O. Stroe, G. Wood, A. Laydon, A. Zidek, T. Green, K. Tunyasuvunakool, S. Petersen, J. Jumper, E. Clancy, R. Green, A. Vora, M. Lutfi, M. Figurnov, A. Cowie, N. Hobbs, P. Kohli, G. Kleywegt, E. Birney, D. Hassabis, and S. Velankar. 2022. AlphaFold Protein Structure Database: massively expanding the structural coverage of protein-sequence space with high-accuracy models. *Nucleic acids research*. 50:D439-D444.
- WHO. 2000. Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation.
- WHO. 2021. Obesity and overweight.
- Williams, I.H., and S.E. Polakis. 1977. Differentiation of 3T3-L1 fibroblasts to adipocytes. The effect of indomethacin, prostaglandin E1 and cyclic AMP on the process of differentiation. *Biochem Biophys Res Commun*. 77:175-186.
- World-Obesity. 2022. Global Obesity Observatory.
- Wu, Z., N.L. Bucher, and S.R. Farmer. 1996. Induction of peroxisome proliferator-activated receptor gamma during the conversion of 3T3 fibroblasts into adipocytes is mediated by C/EBPbeta, C/EBPdelta, and glucocorticoids. *Molecular and cellular biology*. 16:4128-4136.
- Yang, J.-Y., M.A. Della-Fera, S. Rayalam, and C.A. Baile. 2007. Effect of xanthohumol and isoxanthohumol on 3T3-L1 cell apoptosis and adipogenesis. *Apoptosis*. 12:1953-1963.
- Yao, L., P. Janmey, L.G. Frigeri, W. Han, J. Fujita, Y. Kawakami, J.R. Apgar, and T. Kawakami. 1999. Pleckstrin homology domains interact with filamentous actin. *Journal of Biological Chemistry*. 274:19752-19761.
- Zarrinpar, A., R.P. Bhattacharyya, and W.A. Lim. 2003. The structure and function of proline recognition domains. *Science's STKE*. 2003:re8-re8.
- Zeng, G., C. Lian, W. Li, H. An, Y. Han, D. Fang, and Q. Zheng. 2022. Upregulation of FAM129B protects cardiomyocytes from hypoxia/reoxygenation-induced injury by inhibiting apoptosis, oxidative stress, and inflammatory response via enhancing Nrf2/ARE activation. *Environmental toxicology*.
- Zhang, Z., S. Zhou, X. Jiang, Y.-H. Wang, F. Li, Y.-G. Wang, Y. Zheng, and L. Cai. 2015. The role of the Nrf2/Keap1 pathway in obesity and metabolic syndrome. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*. 16:35-45.
- Zhou, X., F. Yang, Q. Zhang, Y. Miao, X. Hu, A. Li, G. Hou, Q. Wang, and J. Kang. 2018. FAM129B promoted tumor invasion and proliferation via facilitating the phosphorylation of FAK signaling and associated with adverse clinical outcome of non-small cell lung cancer patients. *Oncotargets and therapy*. 11:7493-7501.

ANEXO I



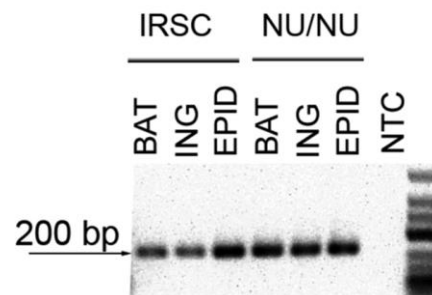
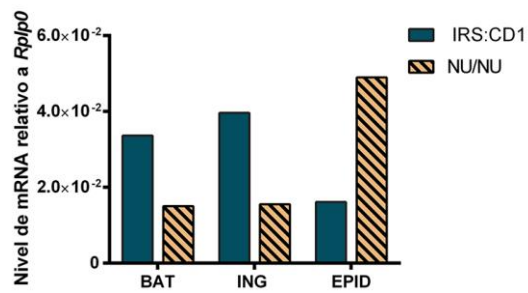
Expresión de la *Ccna2* (Ciclina A), *Cdk2* y *Ccne1* (Ciclina E) posterior al silenciamiento de *Fam129b*, durante el inicio de la expansión clonal, n = 2.

ANEXO II

Factor de transcripción	Posición relativa al TSS
C/EBPβ	-456, -455
C/EBPδ	-456, -455
KLF4	-844, -760, -612, -545, -437, -187, -87, -70
p53	-987
c-MYC	-968, -929, -608, -607
C/EBPα	-987, -946, -873, -745, -636, -456, -455, -441, -400, -370, -340, -267
FOXP1	-807, -750, -714, -663, -390, -243
FOXP2	-662
MEF2A	-960, -662
PPARγ2 : RXRα	-672, -516, -367, -281, -143
RARα : RXRα	-389, -356
SMAD2 : SMAD3 : SMAD4	-984, -925, -875, -861, -675, -505, -470, -453, -378
TCF7L1	-806, -645, -569, -257
ZFX	-983, -978, -841, -822, -733, -698, -602, -296, -263, -109, -85, -67, -25, -20, 1, 66

Análisis del sitio promotor putativo de *Fam129b*. Probables factores de transcripción que pueden regular la expresión del gen *Fam129b*.

ANEXO III



Expresión de *Fam129b* en dos cepas de ratón distintas, IRSC:CD1 y NU/UN. Evaluación realizada en tres tejidos distintos: interescapular, inguinal y epididimal. Así como el análisis del amplicón para corroborar la expresión de una única variante en el tejido *in vivo*.