



**SALUD**  
SECRETARÍA DE SALUD



INSTITUTO NACIONAL DE  
CIENCIAS MÉDICAS  
Y NUTRICIÓN  
SALVADOR ZUBIRÁN

Ciudad de México, a 29 de enero de 2021.

No. Oficio CICUAL -158- 2021

**DR. ARMANDO ROBERTO TOVAR PALACIO**  
**DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA DE LA**  
**NUTRICIÓN**  
**P R E S E N T E**

Estimado Dr. Tovar:

En alcance a su oficio donde solicita el cierre del proyecto CINVA- FNU-1379-14/18-1, titulado "ESTUDIO IN VITRO E IN VIVO DE LA PARTICIPACIÓN DEL EJE Ang-(1-7) RECEPTOR MAS SOBRE LA DIFERENCIACIÓN DE ADÍPOCITOS BEIGE EN LA OBESIDAD, le informo que el CICUAL se da por enterado de la conclusión del proyecto.

Sin más por el momento quedo de usted para cualquier duda o comentario

ATENTAMENTE

**DR. JOSÉ CARLOS CRISPÍN ACUÑA**  
**COORDINADOR DEL COMITÉ INTERNO PARA EL CUIDADO Y USO**  
**DE LOS ANIMALES DE LABORATORIO**

Ccp. MVZ. Mariela G. Contreras Escamilla- Departamento de Investigación Experimental y Bioterio

JCCA/bdr

Avenida Vasco de Quiroga No.15 Colonia Belisario Domínguez Sección XVI Alcaldía Tlalpan  
C.P. 14080 Ciudad de México Tel. 55 54 87 09 00 www.incmnsz.mx





**SALUD**  
SECRETARÍA DE SALUD



INSTITUTO NACIONAL DE  
CIENCIAS MÉDICAS  
Y NUTRICIÓN  
SALVADOR ZUBIRÁN

Ciudad de México, a 11 de diciembre del 2020

**DR. JORGE ALBERTO BARRIOS PAYÁN**  
**COORDINADOR DEL CICUAL**  
**PRESENTE**

Estimado Dr. Barrios:

Por este conducto me permito solicitar el cierre del protocolo "Estudio in vitro e in vivo de la participación del eje Ang-(1-7)/Receptor Mas sobre la diferenciación de adipocitos beige en un modelo de obesidad en ratón" con registro CINVA o CICUAL: FNU-1379-14/18-1, debido a que el protocolo ha concluido.

Sin otro particular por el momento, quedo de usted.

ATENTAMENTE,

Dr. Armando Tovar Palacio

Jefe del Departamento de Fisiología de la Nutrición



2020



INSTITUTO NACIONAL DE  
CIENCIAS MEDICAS  
Y NUTRICION  
SALVADOR ZUBIRAN

# INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MEDICAS Y NUTRICION SALVADOR ZUBIRAN

Informe final del protocolo:

**“Estudio *in vitro* e *in vivo* de la participación del eje Ang-(1-7)/Receptor Mas sobre la diferenciación de adipocitos beige en un modelo de obesidad en ratón”**

Con número de CICUAL:

**FNU-1379-14/18-1**

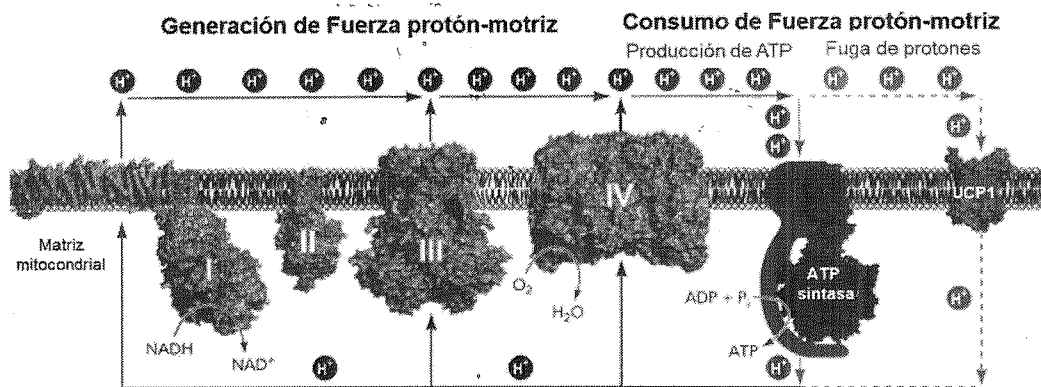
Ciudad de México

Diciembre, 2020

## INTRODUCCIÓN

### 1. Origen del estudio del tejido adiposo pardo (TAP) y la termogénesis.

En la historia del estudio del TAP y la termogénesis, la hibernación es el fenómeno que inicialmente recibió atención dado que resultaba intrigante cómo un organismo podía ralentizar su tasa metabólica, descender la temperatura corporal durante cierto tiempo y finalmente aumentarla para sobrevivir el invierno. En 1551, Gessner describió por primera vez la existencia del TAP, en donde menciona que las marmotas tenían grasa en la espalda que "no era ni grasa ni carne, sino algo intermedio" (1). Varios años después, al TAP se le conoció como la "glándula de hibernación", pero su función era desconocida hasta que en 1963, Smith y Hock junto con Smalley y Dryer demostraron que el TAP es la clave para producir el calor necesario para el aumento de temperatura durante la hibernación (2, 3). Años más tarde, Nedergaard y Lindberg, en 1979, propusieron un mecanismo de acción para el proceso de recalentamiento que incluía la estimulación de los adipocitos pardos por el sistema nervioso simpático (SNS) para comenzar la descomposición de los lípidos almacenados en ácidos grasos libres (AGL) (4). Los adipocitos pardos tienen una característica que los distingue de los otros tipos celulares: la oxidación de los AGL no está necesariamente acoplada a la producción de ATP. Esto se debe a la existencia de una proteína ubicada en la membrana mitocondrial interna, la proteína desacoplante 1 (UCP1), que permite que los protones se filtren en la matriz mitocondrial, y la energía generada que se utiliza para sintetizar ATP se disipa en forma de calor (5, 6) (**Figura 1**). Esta producción de calor por el TAP es una respuesta fisiológica de los mamíferos para resistir temperaturas frías (termogénesis sin escalofríos) o metabolizar el exceso de nutrientes de las dietas altas en calorías (7).

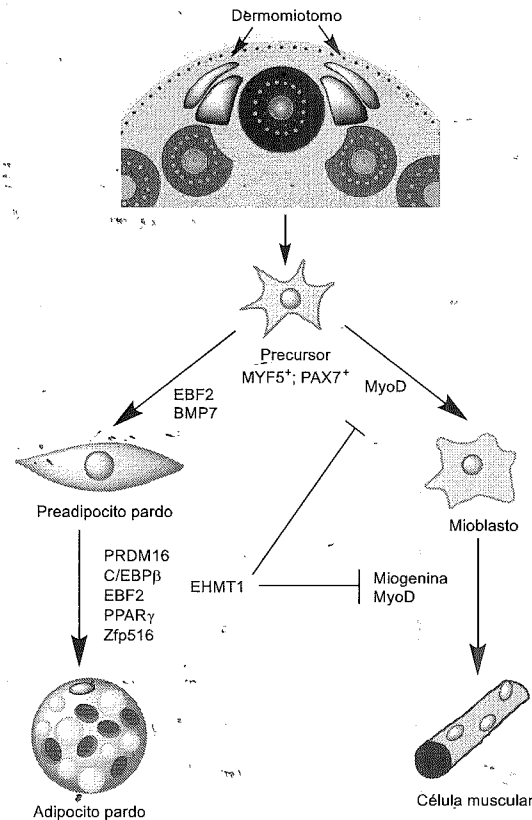


**Figura 1. Cadena respiratoria y proteína desacoplante 1 (UCP1) ubicados en la membrana interna mitocondrial.** Los electrones recolectados de sustratos oxidables pasan a través de la cadena respiratoria en un proceso exergónico que impulsa el bombeo de protones por los complejos respiratorios I, III y IV. El gradiente de protones electroquímico resultante a través de la membrana interna se puede disipar de dos maneras: i) a través de la ATP sintasa, donde la fuerza protón-motriz impulsa la fosforilación de ADP y ii) a través de la fuga de protones que no generan ATP mediante la proteína desacoplante 1 (UCP1), lo cual regula la termogénesis no temblorosa. Modificado de Divakaruni A, 2011 (8).

### 2. Estructura del TAP.

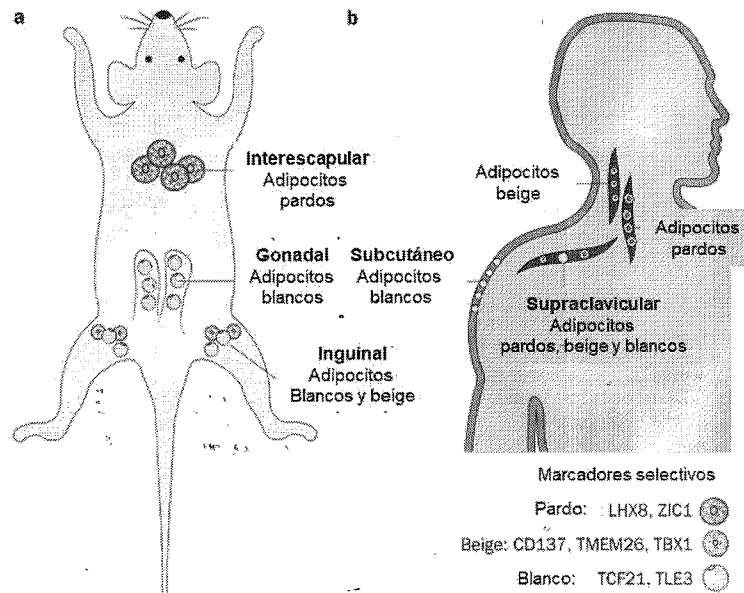
El TAP tiene un característico color amarillo-marrón debido a su alto contenido de mitocondrias. También tiene una superficie lobulada que está inervada y muy vascularizada (9). El TAP se deriva de una población de células ubicadas en el dermomiótomo de la capa mesodérmica que expresa el factor miogénico 5 (MYF5<sup>+</sup>) y la proteína paired box 7

(PAX7<sup>+</sup>). Estas células precursoras pueden diferenciarse en células musculares o bien en adipocitos pardos. El destino del linaje del TAP está determinado por factores de transcripción específicos que incluyen al receptor gamma activado por proliferador de peroxisomas (PPAR $\gamma$ ), el dominio PR que contiene 16 (PRDM16), la histona eucromática lisina metiltransferasa 1 (EHMT1), el factor 2 de células B tempranas (EBF2), la proteína de dedo de zinc 516 (ZFP516) y la proteína beta de unión a potenciador/CCAAT (C/EBP $\beta$ ), entre otras (10, 11) (**Figura 2**).



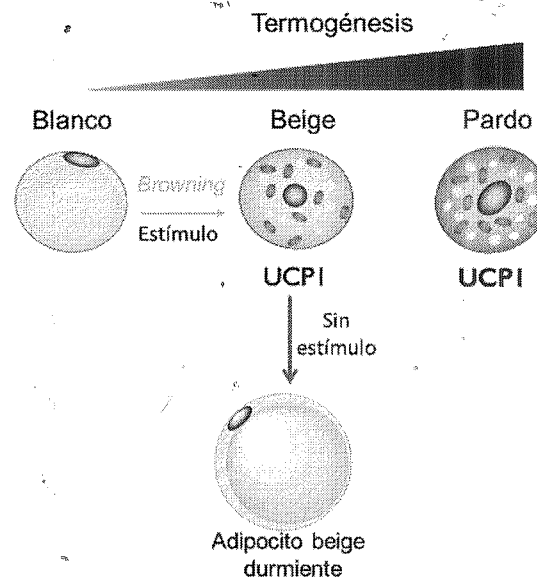
**Figura 2. Origen celular y diferenciación de los adipocitos pardos.** Los adipocitos pardos surgen durante la fase prenatal a partir de las células ubicadas en el dermomiótomo que expresan los factores MYF5<sup>+</sup> y PAX7<sup>+</sup>. EBF2 y la proteína morfogenética ósea 7 (BMP7) comprometen a la célula a formar un preadipocito pardo. Los factores de transcripción PRDM16, C/EBP $\beta$ , EBF2, PPAR $\gamma$ , Zfp516 y EHMT1 están involucrados en la diferenciación del tejido adiposo pardo clásico. EHMT1 inhibe la diferenciación de las células musculares. Modificado de Vargas-Castillo A, 2017 (12).

El TAP activo se encuentra principalmente en la región interescapular de los bebés (TAP-i), donde mantiene controlada la temperatura corporal, mientras que en los adultos, se encuentra en pequeñas cantidades y se consideraba que perdía su función. De manera interesante, los estudios realizados por Cypess y van Marken Lichtenbelt en 2009 demuestran que la actividad del TAP no se pierde con la edad; únicamente necesita ser activada por el frío (13-15). Es decir, se redescubrió al tejido adiposo pardo. Las principales ubicaciones del TAP en humanos son los músculos esternocleidomastoideos del cuello, la región cervical-supraclavicular, las axilas, los músculos de la ingle, las glándulas suprarrenales y el tejido adiposo periaórtico de la caja torácica (16-19) (**Figura 3**).



**Figura 3. Localización de los adipocitos pardos, beige y blancos en a) ratón y en b) humanos.** En el ratón los adipocitos pardos se localizan en la zona-interescapular, este depósito comúnmente se le llama tejido adiposo pardo clásico. El tejido adiposo blanco subcutáneo localizado en la zona inguinal es el que tiene mayor capacidad de hacer *browning*. En los humanos el tejido pardo y beige se encuentran mezclados en la zona cervical y supraclavicular. Modificado de Bartelt, 2014 (20).

Algunas de las características de los adipocitos pardos a nivel celular son la presencia de pequeñas gotas de lípidos dentro del citoplasma (multiloculares) y una gran cantidad de mitocondrias en comparación con otros tipos de células (21, 22). Estas mitocondrias tienen una actividad termogénica alta debido a la abundancia de la proteína UCP1 (23)(Figura 4).



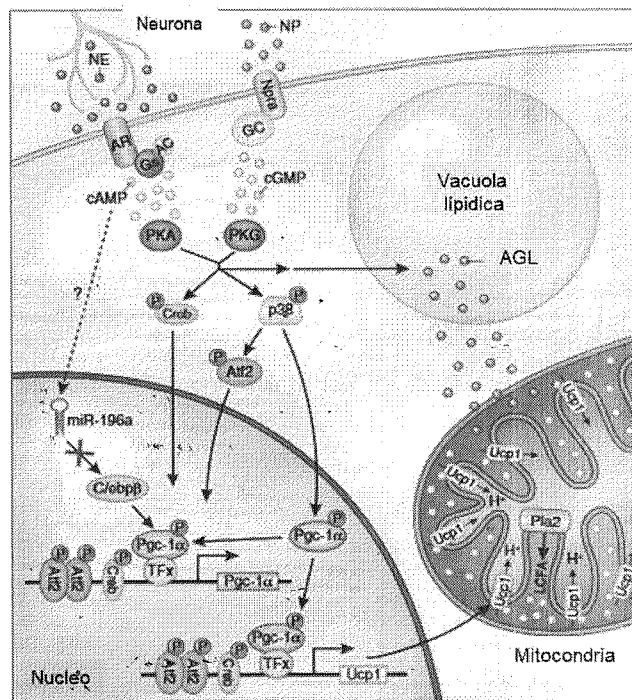
**Figura 4. Clasificación actual de adipocitos.** Existen 3 tipos de adipocitos: los blancos, los beige y los pardos. Los adipocitos blancos carecen de la proteína desacoplante 1 y son los menos termogénicos. Los adipocitos beige provienen de células del tejido adiposo blanco a través del *browning* y poseen la proteína desacoplante 1. Los adipocitos pardos tienen un origen embrionario, son altamente termogénicos y poseen la proteína desacoplante 1. Modificado de (24).

### 3. Termogénesis.

#### 3.1 UCP1: definición, descripción y actividad metabólica.

La proteína desacoplante 1 (UCP1) es la proteína distintiva responsable de inducir la termogénesis. La UCP1 se expresa de forma ubicua en la membrana mitocondrial interna de los adipocitos pardos. Su actividad principal es la disipación del gradiente de protones generado por la cadena respiratoria, lo que aumenta la permeabilidad de la matriz mitocondrial y permite una fuga de protones. Por lo tanto, la UCP1 reduce la eficiencia de la maquinaria respiratoria celular, lo que resulta en un aumento de la disipación de calor, que proporciona las propiedades termogénicas del tejido. Se ha descrito que los otros miembros de UCP, UCP2 y UCP3, tienen la misma estructura que UCP1 pero difieren en su localización. La UCP2 se expresa de manera ubicua y la UCP3 está presente principalmente en el músculo. Además, hay dos miembros de esta familia, la UCP4 y la UCP5, que se encuentran principalmente en el sistema nervioso central (SNC) (25). Sin embargo, el papel de esta familia en la termogénesis adaptativa depende de UCP1 (23), ya que la ablación del gen induce un fenotipo sensible al frío (26). Sin embargo, los ratones knock out de UCP1 (UCP1-KO) no exhiben protección contra la obesidad inducida por la dieta cuando los ratones se mantienen a temperaturas termoneutras (20-24°C) (26). No obstante, con la edad, los ratones UCP1-KO tienden a aumentar los depósitos de tejido adiposo debido a una baja tasa de oxidación de AGL. La presencia de UCP1 en el TAP confiere que este tejido sea vital para la regulación del gasto energético global del organismo, lo que lo convierte en un objetivo terapéutico potencial para algunas enfermedades metabólicas como la obesidad y diabetes (27).

Es necesario desentrañar el mecanismo de activación del TAP para el tratamiento de la obesidad. De hecho, se ha demostrado que la actividad del TAP se reduce en pacientes obesos (28). El TAP se encuentra inervado por el sistema nervioso simpático (SNS) y está altamente vascularizado; por lo tanto, su activación y función termogénica depende del SNS (29). Un activador que se encuentra bien caracterizado es un ambiente frío. Tras la exposición al frío, se activan las vías eferentes del SNS, liberando catecolaminas como la noradrenalina (NA). La unión de NA a los receptores adrenérgicos  $\beta$  ( $\beta$ -AR), que se expresan abundantemente en adipocitos pardos y están presentes en adipocitos blancos, desencadena una cascada de transducción de señales que conduce a una mayor expresión de genes termogénicos (30) (**Figura 5**).

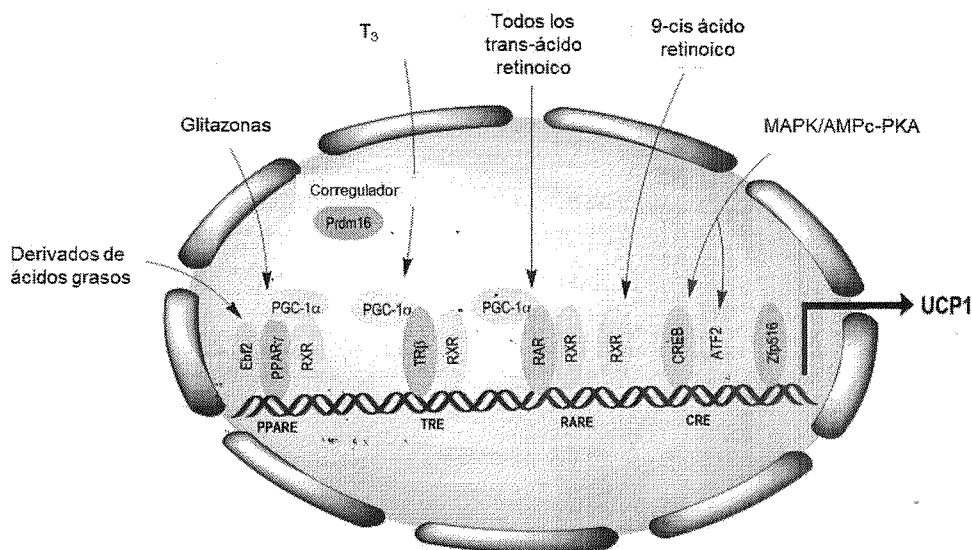


**Figura 5. Termogénesis inducida por catecolaminas y péptidos natriuréticos.** Las neuronas simpáticas liberan catecolaminas (círculos de color verde oscuro), que se unen a los receptores  $\beta$ -adrenérgicos, lo cual activa a la adenilato ciclasa (AC), por lo tanto, aumentan las concentraciones de AMPc (círculos de color verde claro) y mayor actividad de PKA. Los péptidos natriuréticos (NP; círculos rojos) se unen al receptor de péptidos natriuréticos A (Npra), lo cual activa a la guanilato ciclasa (GC) y aumenta las concentraciones de GMPc (círculos rosa) y activa a la PKG. Las PKA y PKG activadas utilizan mecanismos similares para activar la transcripción de genes termogénicos en los adipocitos pardos. Tomado de Harms y Seale, 2016 (16).

La vía de señalización activada por NA requiere un aumento en la concentración de AMPc, lo que conduce a una mayor actividad de la proteína cinasa A (PKA). Luego, la PKA promueve la proteína de unión al elemento de respuesta AMPc (CREB) y la proteína cinasa activada por mitógeno p38 (p38-MAPK), que luego inducen la transcripción de genes termogénicos como *UCP1* (16). Otros activadores del TAP son péptidos natriuréticos que se unen a su receptor de péptido natriurético (NPR) para incrementar la concentración de monofosfato de guanosina cíclico (GMPc) y activar la proteína cinasa G (PKG), que también provoca la transcripción de genes termogénicos. La PKG funciona en paralelo con la vía adrenérgica de PKA para desencadenar la lipólisis. Como resultado, hay una liberación de AGL, que es un sustrato disponible para la cadena respiratoria de manera que aumenta la actividad de la proteína UCP1 (30). Por lo tanto, los activadores del TAP no solo inducen la transcripción del gen *UCP1* sino que también proporcionan sustratos para la cadena de transporte de electrones.

La transcripción de los genes termogénicos ocurre cuando la enzima ARN polimerasa se une al ADN. Esta unión depende de proteínas llamadas factores de transcripción, los cuales se unen a ubicaciones específicas dentro de la región promotora del gen *UCP1*, llamados elementos de respuesta, para iniciar el proceso de la transcripción. Existen varios elementos de respuesta reportados en el promotor del gen *UCP1*: el elemento de respuesta tiroidea (TRE), el elemento de respuesta PPAR (PPRE), el elemento de respuesta de ácido retinoico (RARE) y el elemento de respuesta AMPc (CRE) (Figura 6) (31).





**Figura 6. Elementos de respuesta en el promotor de *UCP1*.** Diversos estímulos pueden activar a los elementos de respuesta del promotor del gen *UCP1*: el elemento de respuesta tiroidea (TRE), el elemento de respuesta PPAR (PPRE), el elemento de respuesta de ácido retinoico (RARE) y el elemento de respuesta AMPc (CRE). Tomado de Vargas-Castillo A, 2017 (12).

La transcripción de *UCP1* requiere coactivadores que se consideran críticos para este proceso, incluido el coactivador del receptor-gamma activado por proliferador de peroxisomas 1 alfa (PGC1- $\alpha$ ) y PRDM16, que interactúan físicamente con factores de transcripción como PPAR $\gamma$  y Zfp516 (32, 33). El PGC1- $\alpha$  es un coactivador de PPAR $\gamma$  que se requiere para comprometer las células a la termogénesis (34). De hecho, Puigserver et al. demostraron que la expresión ectópica de PGC1- $\alpha$  en depósitos de TAB activa el programa de termogénesis (26).

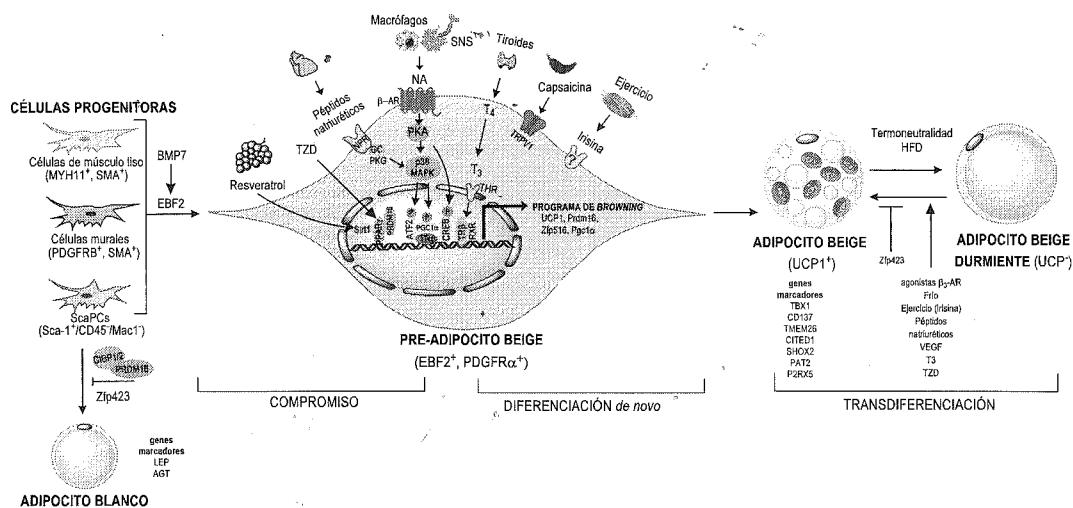
El proceso de diferenciación comparte algunos de los factores de transcripción que están involucrados en la transcripción de genes termogénicos. Como se describió anteriormente, PPAR $\gamma$  controla la expresión termogénica, es un regulador central de la adipogénesis (35), y su expresión es necesaria para el mantenimiento del estado diferenciado (36). El precursor de los adipocitos MYF5<sup>+</sup> inicia la diferenciación con PPAR $\gamma$ , factor de compromiso adipogénico, pero se necesitan algunas señales para facilitar un destino de adipocitos en lugar de un destino muscular, como EHMT1, sarcoma de Ewing (EWS), C/EBP- $\beta$  y ZFP516. El C/EBP- $\beta$  se expresa temporalmente en adipocitos durante la diferenciación en las primeras etapas (32, 37). Los factores EHMT1 y EWS actúan como represores de los genes musculares, y EHMT1 actúa como cofactor de PRDM16, otro factor de transcripción involucrado en la transcripción del gen *UCP1* (38-40). Además, se ha demostrado que PRDM16 reprime genes musculares y también suprime la expresión de genes específicos de adipocitos blancos. Por lo tanto, el PRDM16 está involucrado en la diferenciación de adipocitos pardos. El PRDM16 actúa como un factor corregulador que se une a PGC1- $\alpha$  o PPAR $\gamma$  (40, 41). La sirtuina 1 (Sirt1), de la familia de las sirtuinas, es responsable de la desacetilación de PPAR $\gamma$  que permite la unión de PRDM16 a PPAR $\gamma$  (42) para iniciar el programa de diferenciación a adipocitos beige.

#### 4. Los adipocitos blancos pueden diferenciarse a adipocitos beige/brite.

Los adipocitos pardos no son el único tipo de célula capaz de activar la termogénesis, algunos adipocitos blancos, particularmente los que se localizan en el depósito de grasa subcutánea, pueden diferenciarse en adipocitos beige en respuesta a diversos estímulos (26). En 1984, Young demostró por primera vez que la grasa blanca parametrial de ratonas BALB/c contenía células de grasa "parda" cuando se exponían a un ambiente frío durante 4 semanas (43). Años más tarde, Cinti y cols revelaron la presencia de unos adipocitos multiloculares contenidos en el tejido adiposo blanco (TAB) de ratas tratadas con CL-316243, un agonista de los receptores  $\beta_3$ -AR, que morfológicamente eran muy similares a los adipocitos pardos (44). Antes de acuñar el término de adipocito beige/brite, estos adipocitos eran considerados como pardos y que generaban calor debido a la expresión de UCP1 (45). La teoría sobre los adipocitos blancos que se convierten en adipocitos pardos volvió a surgir en el año 2010, después de que en el 2009 se reportó el redescubrimiento del TAP funcional en adultos. Solamente que esta teoría cambió, y los términos beige (46) y brite (47) aparecieron en las publicaciones como un tercer tipo de adipocito. En la actualidad, los términos *browning*, *britening* y *beiging* se usan como sinónimos para describir la diferenciación de adipocitos blancos a adipocitos beige cuando están expuestos a diferentes estímulos.

##### 4.1 Diferenciación de adipocitos beige/brite.

Existen dos teorías sobre el origen de los adipocitos beige/brite: la diferenciación *de novo* de las células progenitoras residentes y la transdiferenciación. La primera comienza con el compromiso de las células progenitoras con un fenotipo de preadipocito beige. Se han descrito tres tipos de células progenitoras que contienen marcadores específicos: células del músculo liso (MYH11<sup>+</sup>, SMA<sup>+</sup>), células murales (PDGFR $\beta$ <sup>+</sup>, SMA<sup>+</sup>) y células progenitoras Sca-1<sup>+</sup> (ScaPCs, Sca-1<sup>+</sup>/CD45<sup>+</sup>/Mac1<sup>-</sup>) (48-50) (Figura 7).



**Figura 7. Diferenciación de adipocitos beige.** Han surgido dos teorías para la diferenciación de los adipocitos beige: i) La diferenciación *de novo*, en la que los adipocitos beige provienen de células progenitoras y ii) la transdiferenciación, cuando provienen de una célula madura, particularmente un adipocito blanco. Modificado de Vargas-Castillo, 2017 (12).

La estimulación adipogénica estimula a la proteína morfogenética de hueso 7 (BMP7) y al factor temprano 2 de célula B (EBF2), que son factores críticos para el compromiso de las células progenitoras con los preadipocitos beige (49, 51). Como se muestra en la Figura 7, diversos estímulos, como la exposición al frío, el ejercicio, los péptidos

natriuréticos, las hormonas tiroideas y los compuestos nutricionales como el resveratrol y la capsaicina, activan el proceso de *browning*. Entre estos, el frío es el único estímulo que se ha caracterizado bien, como se mencionó anteriormente. Como resultado de los estímulos, la maquinaria transcripcional del programa de *browning* activa la expresión de genes termogénicos característicos como *Ucp1*, *Prdm16* y *Zfp516*; Además, *Pgc1-α*, que está involucrado en la biogénesis mitocondrial, también está regulado al alza, lo que conduce a un fenotipo de adipocito beige (52). Estos adipocitos se caracterizan por la presencia de marcadores específicos, como se describirá a continuación.

La segunda teoría, llamada teoría de la transdiferenciación, propone que las células maduras son la fuente de los adipocitos beige. Esto fue respaldado con la observación de que el fenotipo beige inducido por el frío se revierte después de 5 semanas de adaptación a un ambiente cálido. Por lo tanto, los adipocitos beige se convierten en células con una morfología y un patrón genético de células de adipocitos blancos. De manera interesante, algunas de estas células poseen la capacidad de someterse nuevamente al programa termogénico con estimulación fría adicional o bien, con el tratamiento de un agonista adrenérgico  $\beta_3$  (53). Estas células se denominan "adipocitos beige durmientes" y se ha sugerido que cuando se activan, se desenmascara un fenotipo beige nuevamente (54). Esta teoría está respaldada por el trabajo de Shao et al. que propone que la proteína de dedo de zinc 423 (ZFP423) es un factor de transcripción necesario para mantener el fenotipo de adipocito blanco y que su expresión se suprime tras la exposición al frío (55). La capacidad de transdiferenciación depende en gran medida del entorno y la edad del organismo en estudio (54).

### 5. Marcadores de adipocitos beige/*brite*:

En 2012, el grupo de Bruce Spiegelman descubrió que los adipocitos beige expresaban marcadores genéticos característicos que los distinguían de los adipocitos pardos y blancos (56). Además, en el mismo año, Kajimura et al. propusieron marcadores adicionales de adipocitos beige (57). Estudios recientes han demostrado otro grupo de marcadores específicos (47, 58). Todos los marcadores de adipocitos beige se muestran en la **Tabla 1**. Además, se incluyeron marcadores selectivos para adipocitos pardos, blancos y marcadores compartidos tanto por los pardos como los beige.

**Tabla 1.** Genes marcadores de los diferentes tipos de adipocitos.

Tipo de adipocito	Gen marcador	Nombre completo	Función biológica	Referencia
Adipocitos pardos "clásicos" y adipocitos beige	<i>Ucp1</i>	Uncoupling protein 1	Separa la fosforilación oxidativa de la síntesis de ATP con energía disipada como calor, también conocida como la fuga de protones mitocondriales	(56, 59)
	<i>Pgc1α</i>	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma, coactivator 1 alpha	Coactivador transcripcional involucrado en la regulación de genes relacionados con el metabolismo energético	(26)
	<i>Prdm16</i>	PR domain containing 16	Coactivador transcripcional involucrado en la diferenciación de adipocitos pardos y beige	(60)

**Tabla 1.** Continuación

	<i>Cidea</i>	Cell death-inducing DFFA-like effector A	Activador de apoptosis por fragmentación de ADN; juega un papel en la termogénesis y la lipólisis	(61)
	<i>Dio2</i>	Deiodinase, iodothyronine type 2	Conversión de tiroxina (T4) a 3,3',5-triyodotironina (T3)	(18)
	<i>Epsti1</i>	Epithelial stromal interaction 1	Provoca la translocación nuclear del factor nuclear kappa B subunidad 1 y la activación de genes diana	(62)
<b>Adipocitos pardos "clásicos"</b>	<i>Zic1</i>	Zic family member 1	Factor de transcripción de dedos de zinc tipo C2H2 multifuncional	(47, 58, 62, 63)
	<i>Eva1</i>	Epithelial V-like antigen	Participación en las primeras fases de la organogénesis del timo	(56, 64)
	<i>Ebf3</i>	Early B-cell factor 3	Implicado en la diferenciación de células B, desarrollo óseo y neurogénesis	(56)
	<i>Lhx8</i>	LIM homeobox 1	Factor de transcripción del dedo de zinc doble rico en cisteína	(47) (61)
	<i>miR-206</i>	MicroRNA 206	Inhibición de los factores de transcripción musculares miogenina y MyoD en adipocitos marrones	(47, 58)
	<i>miR-133b</i>	MicroRNA 133b	Ver miRNA-206	(65, 66)
<b>Adipocitos beige</b>	<i>Tbx1</i>	T-box 1	Factor de transcripción asociado a T-box, involucrado en la regulación de procesos de desarrollo	(57, 67)
	<i>Tmem26</i>	Transmembrane protein 26	Desconocido	(56, 62)
	<i>Cd137</i>	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 9	Expansión clonal, supervivencia y desarrollo de células T, proliferación de monocitos, inducción de un programa Th1	(56, 62)
	<i>Cited1</i>	Cbp/p300-interacting transactivator, with Glu/Asp-rich carboxy-terminal domain, 1	Coactivador transcripcional y puede desempeñar un papel en la pigmentación de los melanocitos	(57)
	<i>Shox2</i>	Short stature homeobox 2	Factor de transcripción de unión al ADN que contiene un dominio de origen, implicado en la formación de patrones en especies de invertebrados y vertebrados	(18, 58)
	<i>Hoxc9</i>	Homeobox C9	Proteína de unión al ADN que contiene el dominio del hogar desempeña un papel importante en la morfogénesis en todos los organismos multicelulares	(47, 57, 58)
<b>Adipocitos blancos</b>	<i>Lep</i>	Leptin	Hormona que regula la ingesta de alimentos y el gasto energético	(68)
	<i>Hoxc8</i>	Homeobox C8	Ver Hoxc9	(58)
	<i>Tcf21</i>	Transcription factor 21	Participa en interacciones epiteliales-mesenquimales en la morfogénesis renal y pulmonar	(47, 58, 62)

**6. Inductores de *browning* y activadores de los adipocitos pardos.**

La lista de los agentes que inducen el *browning* o activan a los adipocitos pardos está creciendo rápidamente.

Algunos inductores que se han reportado son fisiológicos, como la estimulación de noradrenalina por frío, las hormonas tiroideas, la irisina, los ácidos biliares, el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), el factor de crecimiento de fibroblastos 21 (FGF-21), las prostaglandinas y los péptidos natriuréticos. Otros estímulos son las moléculas farmacológicas, como los agonistas adrenérgicos  $\beta_3$ , los agonistas de PPAR $\gamma$  (TZD) y el antagonista de cannabinoides rimonabant. Algunas moléculas contenidas en la dieta activan el *browning*, como el resveratrol, el mentol, la capsaicina, el ácido retinoico y los ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) (12). Además, se ha descrito que la composición de la microbiota inducida por el frío activa el *browning* del tejido adiposo blanco y aumenta tanto el gasto energético como la sensibilidad a la insulina (69). En contraste, por un mecanismo desconocido, la ausencia de la microbiota activa el proceso de *browning* en la grasa subcutánea (70). Finalmente, las condiciones de vida como la caquexia asociada a un tumor y las quemaduras también pueden inducir el *browning* (Tabla 2).

**Tabla 2.** Agentes/inductores fisiológicos, farmacológicos y nutricionales de la grasa parda y del *browning* del tejido adiposo blanco.

Tipo de inductor	Mediador	Fuente	Receptor	Condición	Referencia
Fisiológico	Noradrenalina	Nervios simpáticos Macrófagos	Receptores adrenérgicos (ej. $\beta_3$ -AR)	Exposición al frío	(71)
	Orexina	Cerebro	Receptores orexina (ej. OX $_{1/2}$ R)	Alimentación y vigilia	(72)
	T $_4$ / T $_3$ (Triyodotironina)	Tiroides	Receptor tiroideo (TR- $\beta$ )	Metabolismo energético	(73-75)
	VEGF	Vasos sanguíneos	Receptor 2 VEGF (VEGFR2)	Angiogénesis	(76)
	Irisina	Músculo esquelético	?	Ejercicio	(77, 78)
	Meteorin-like	Músculo esquelético y tejido adiposo	Estimula subtipos de células inmunológicas	Ejercicio (músculo) y frío (tejido adiposo)	(79)
	Ácido $\beta$ -aminoisobutírico (BAIBA)	Músculo esquelético	?	Ejercicio	(80)
	Péptidos natriuréticos	Corazón	NPR	Exposición al frío	(81)
	FGF-21	Hígado Tejido Adiposo	FGF/ $\beta$ -Klotho	Exposición al frío	(82)
	Ácidos biliares	Hígado	Receptores TGR5	Postprandial	(83, 84)
	BMP7	?	BMPRII	Desarrollo	(85, 86)
	BMP4	?	?	Desarrollo	(87)
	BMP8 $\beta$	?	BMPR	Desarrollo	(88)
	Prostaglandinas (PGI $_2$ , PGE $_2$ )	Adipocitos	EP $_4$ para PGE $_2$	Exposición al frío	(89, 90)
	Microbiota	Intestino	?	Exposición al frío Depleción	(69, 70)
Farmacológico	Mirabegron, CL316,243	Sintético	Agonistas $\beta_3$ -AR	Vejiga superactiva (Mirabegron)	(44, 91)
	Tiazolidinedionas	Sintético	Agonistas PPAR $\gamma$	Terapia antidiabética	(42, 47)
	Rimonabant	Sintético	Antagonista del receptor CB1	Terapia antiobesidad	(92)

Tabla 2. Continuación

Nutricional	Mentol	Origen vegetal	TRPM8	Preparación tópica	(93)
	Capsaicina	Chile	TRPV1	Dieta	(94)
	Ácido retinoico	Vitamina A	Receptor $\alpha$ de ácido retinoico (RAR $\alpha$ ) y receptor retinoide (RXR)	Dieta	(95, 96)
	PUFAs	Comida	GPR120 o activación de TRPV1	Dieta	(97-99)
	Resveratrol	Uvas y bayas	Activación de AMPK $\alpha$ 1 Incremento de Sirt1	Dieta	(100)
Condición de vida	Caquexia en el cancer	Tumor	La proteína relacionada con la hormona paratiroidea derivada del tumor (PTHrP) y la interleucina 6 (IL6) promueven el <i>browning</i> .	Patológico	(101, 102)
	Quemaduras	-	Liberación de catecolaminas de las glándulas adrenales	Patológico	(103)

### 7. Enfoque terapéutico: Obesidad.

Actualmente, la obesidad y la diabetes se consideran enfermedades globales debido a su rápido crecimiento en todo el mundo. En 2016, la Organización Mundial de la Salud (OMS) reportó que más de 1.900 millones de adultos tenían sobrepeso y más de 650 millones eran obesos. En general, aproximadamente el 13% de la población mundial adulta (11% de los hombres y el 15% de las mujeres) presenta obesidad, y 150 millones de adultos tienen diabetes tipo 2, que se asocia con la obesidad (104). La obesidad se define como la acumulación anormal o excesiva de grasa que presenta un riesgo para la salud (105). El aumento de la grasa visceral se asocia con un alto riesgo de enfermedades metabólicas. Sin embargo, se ha informado que el aumento de la grasa subcutánea en los muslos y las caderas no ejerce un riesgo asociado con enfermedades metabólicas (106).

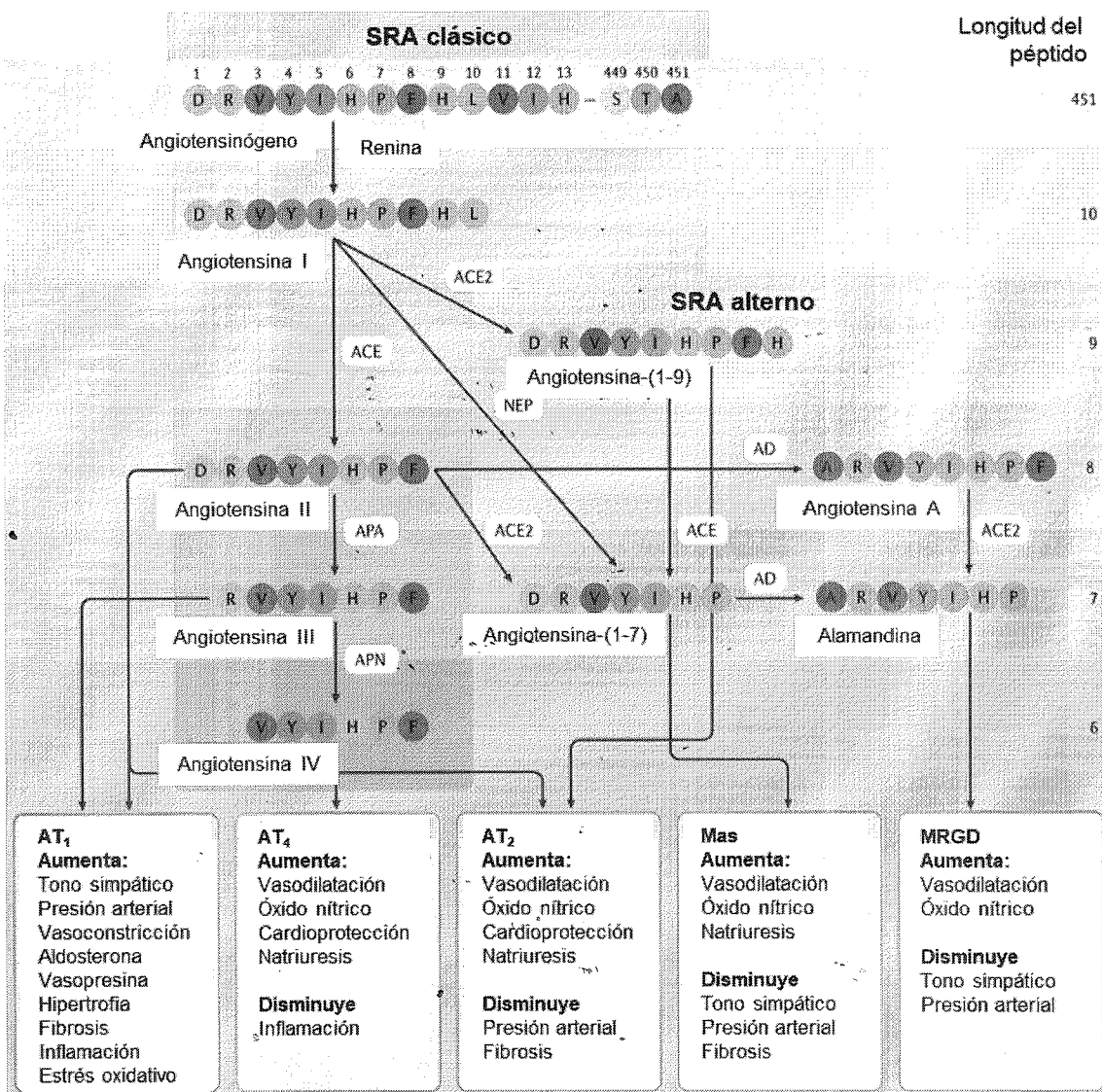
Debido a la creciente tasa de obesidad y diabetes y los riesgos metabólicos asociados, como los altos niveles de triglicéridos y colesterol en plasma, que imponen un riesgo de enfermedad cardiovascular (107), se están explorando nuevas alternativas, como el *browning* del tejido adiposo blanco, para contrarrestar el desequilibrio energético y de esta manera, atenuar la obesidad (106). De hecho, Bartelt et al demostraron que, en un modelo de ratón, la inducción del *browning* por exposición al frío a corto plazo reducía drásticamente la hiperlipidemia y la resistencia a la insulina (108).

### 8. El sistema renina-angiotensina.

El sistema renina-angiotensina (SRA) es un regulador importante de la homeostasis de la presión arterial y el equilibrio electrolítico (109). Actualmente, se han descrito dos brazos del sistema: el brazo clásico está compuesto por el péptido Angiotensina II (Ang II), que se une al receptor AT<sub>1</sub> y ejerce efectos vasoconstrictores e hipertróficos,

inflamación y retención de líquidos (110). El otro brazo está compuesto por el heptapéptido Angiotensina-(1-7) [Ang-(1-7)] que se une al receptor Mas y sus acciones contrarrestan los efectos del eje clásico Ang II / AT<sub>1</sub> (111-117) (**Figura 8**).

El SRA clásico está bien descrito y está compuesto por varios elementos ubicados en diversos tejidos y en circulación sanguínea. El angiotensinógeno es principalmente liberado por el hígado y en segundo lugar por el tejido adiposo. El angiotensinógeno es el sustrato circulante sobre el cual actúa la renina, para generar angiotensina I (Ang I) (decapéptido). A su vez, la Ang I es el sustrato de la enzima convertidora de angiotensina (ECA), que da lugar a la Ang II (octapéptido), principal efector del sistema que actúa a través de los receptores AT<sub>1</sub> para generar respuestas presoras, tróficas y proinflamatorias. También puede activar al receptor AT<sub>2</sub>, el cual generalmente contrapone las respuestas del receptor AT<sub>1</sub>. La Ang II es sustrato de la enzima convertidora de angiotensina 2 (ECA2), que genera la Ang-(1-7) (heptapéptido). La Ang-(1-7) también puede ser sintetizada a partir de Ang I, que por la acción de la ECA2 forma Ang-(1-9) y mediante la ECA forma Ang-(1-7). Adicionalmente, las endopeptidasas también forman Ang-(1-7) a partir de la Ang I (115) (**Figura 8**).



**Figura 8. Sistema renina angiotensina clásico y alternativo.** En el sistema clásico, la renina escinde al angiotensinógeno para producir angiotensina I. Este péptido puede ser procesado por la ECA para formar angiotensina II, que a su vez puede unirse al receptor de Ang II tipo 1 (AT<sub>1</sub>R) y AT<sub>2</sub>R. La Ang I también puede ser escindida por ECA2 y neprilisina (NEP) para producir angiotensina-(1-9) y angiotensina-(1-7), respectivamente. La angiotensina-(1-7) se une al receptor protooncogénico Mas (MasR) y reduce la presión arterial y la liberación de noradrenalina en roedores hipertensos. Además, la activación de MasR aumenta la generación de NO. Ang-(1-7) también se puede formar a partir de la escisión de Ang II por la ECA2. Modificado de Paz Ocaranza M, 2019 (118).

### 9. Evidencias del bloqueo de SRA como factor protector contra la obesidad.

Existe evidencia experimental y clínica que apoya la idea de que la interrupción del SRA, en varios niveles, proporciona protección contra la obesidad y/o sus secuelas. Por ejemplo, ratones carentes de renina tienen una menor producción de los péptidos del SRA, tales como la Ang II y además están protegidos contra la obesidad (119). Además, los ratones KO de angiotensinógeno, receptor AT<sub>2</sub> o receptor AT<sub>1</sub> también se encontraron protegidos de la obesidad inducida por una dieta alta en grasa y manifestaban hipotrofia del tejido adiposo (120-122). El bloqueo del SRA mediante inhibidores de la ECA, con antagonistas del receptor AT<sub>1</sub> y con el inhibidor de renina, previenen el



incremento de la masa grasa (123-125). Se ha propuesto que la disminución en la ganancia de peso se debe a la Ang-(1-7), tal como se demostró en ratas Sprague Dawley con un tratamiento subcrónico de captopril (126).

#### **10. El SRA local en el tejido adiposo.**

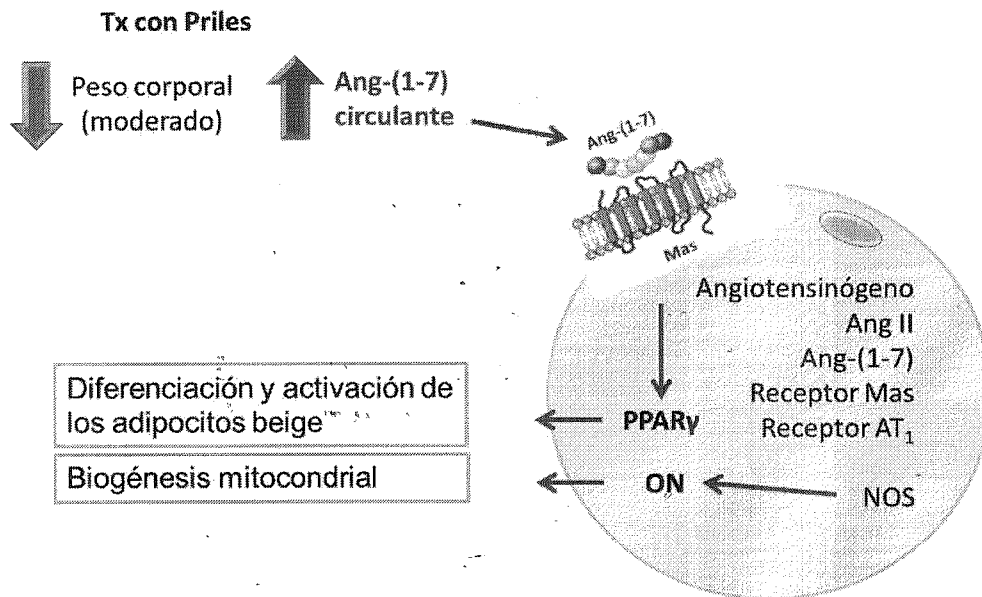
El efecto del SRA sobre la obesidad probablemente esté relacionado con la existencia de un SRA local en el tejido adiposo, ya que hay evidencia de la expresión de sus componentes en el tejido adiposo de humanos y roedores, particularmente el angiotensinógeno, la renina, la ECA, ECA2, la Ang II y la Ang-(1-7). También los receptores AT<sub>1</sub>, AT<sub>2</sub> y el receptor Mas están co-expresados en los adipocitos, lo cual implica que el SRA local está involucrado en las funciones que los regulan (127-129).

#### **11. Evidencias del eje Ang-(1-7)/receptor Mas en la fisiología del adipocito.**

El eje Ang-(1-7)/receptor Mas parece tener un papel importante en la fisiología del adipocito, debido a que los ratones carentes del receptor Mas desarrollan un incremento en la masa grasa abdominal (~50%), una mayor expresión de angiotensinógeno a partir del tejido adiposo y una disminución en la sensibilidad a la insulina, lo cual sugiere que el eje Ang-(1-7)/Mas participa en el metabolismo de lípidos y de la glucosa (130). Por otra parte, la sobreexpresión de Ang-(1-7) confiere protección contra la obesidad en ratas (131, 132). También se ha demostrado que el tratamiento oral con Ang-(1-7) previene la obesidad en ratas que recibieron una dieta alta en grasa (133). Los mecanismos que subyacen a estos efectos aún no están claros; sin embargo, el *browning* del tejido adiposo blanco podrá ser una opción.

#### **12. Diferenciación de adipocitos beige y su relación con el eje Ang-(1-7)/Receptor Mas.**

Durante el desarrollo de obesidad, frecuentemente se asocia la hipertensión. Esta enfermedad se vincula con una alteración del SRA. Se ha descrito que hay un aumento de la angiotensina II (Ang II) y que conduce a la vasoconstricción (134). Un tratamiento farmacológico común para la hipertensión es el uso de inhibidores de la ECA, como el captopril, para disminuir los niveles de Ang II (135). Además, se ha reportado que existe un efecto benéfico adicional al efecto antihipertensivo en varios modelos murinos; se presenta una disminución moderada del peso corporal y grasa corporal (123, 124, 126, 136, 137). Esta respuesta podría atribuirse a la Ang-(1-7) dado que los inhibidores de la ECA aumentan su concentración al prevenir su degradación (115, 138). Recientemente se ha reportado a través de estudios *in vitro* que la incubación de adipocitos con Ang-(1-7) aumenta la expresión de PPAR $\gamma$ , el cual es uno de los principales factores que modulan la diferenciación a células beige (117). Además, la Ang-(1-7) en las células endoteliales aumenta la producción de óxido nítrico (ON) (113). Se ha reportado que el ON puede actuar de manera autócrina y parácrina para promover la biogénesis mitocondrial y activar al tejido adiposo pardo (139) (**Figura 9**). De manera reciente, un estudio demostró que la Ang-(1-7) aumenta la expresión de la proteína desacoplante 1 (UCP1) en el TAP, un elemento clave del fenotipo termogénico (140). Sin embargo, hay pocas pruebas de que el péptido Ang-(1-7) sea capaz de inducir el *browning* del tejido adiposo blanco. Es de gran interés estudiar estrategias que promuevan el *browning* dado que al aumentar la capacidad de gasto de energía, a su vez puede prevenir el desarrollo de la obesidad y mejorar la sensibilidad a la insulina, como se demuestra en varios modelos animales (141, 142).



**Figura 9.** Evidencias que sugieren la participación del eje Ang-(1-7)/Receptor Mas sobre el *browning* del tejido adiposo blanco. PPAR $\gamma$ : Receptores activados por proliferadores de peroxisomas gamma, ON: óxido nítrico, NOS: sintasa de óxido nítrico.

## 2. JUSTIFICACIÓN

Existe evidencia experimental de la relación entre los adipocitos pardos y beige respecto a la obesidad. Los animales con mayor cantidad de adipocitos pardos y beige son más resistentes al desarrollo de obesidad y diabetes tipo 2. De manera opuesta, los animales con menos adipocitos pardos y carentes de receptores  $\beta$ -adrenérgicos son más susceptibles a desarrollar ambas enfermedades. El *browning* del tejido adiposo blanco podría ser utilizado como una estrategia terapéutica que prevenga el desarrollo excesivo de adipocitos blancos y aumente la cantidad de adipocitos beige. Por lo tanto, entender los mecanismos moleculares de diferenciación a estas células conlleva a la identificación de nuevos blancos farmacológicos para tratar la enfermedad metabólica inducida por la obesidad y la diabetes tipo 2, las cuales tienen una alta prevalencia a nivel nacional y mundial. Aprovechando la plasticidad de los adipocitos beige y su capacidad única para cambiar de fenotipo y función, se estudiará si el eje Ang-(1-7)/receptor Mas induce el *browning* y por lo tanto incrementa la cantidad de adipocitos beige.

## 3. HIPÓTESIS

La Ang-(1-7), vía el receptor Mas, incrementará la cantidad de adipocitos beige en el tejido adiposo blanco subcutáneo.

#### 4. OBJETIVO GENERAL

Determinar la participación del eje Ang-(1-7)/receptor Mas sobre la diferenciación de adipocitos beige en un modelo *in vitro* de adipocitos diferenciados a partir de la fracción estromal vascular de la grasa blanca subcutánea, en modelos *in vivo* de obesidad inducida por dieta en rata y ratón y en humanos con diferente índice de masa corporal.

#### 5. OBJETIVOS PARTICULARES

1. Evaluar, a través de ensayos *in vitro* en cultivo primario de adipocitos de ratones Mas<sup>+/+</sup> y Mas<sup>-/-</sup>, el efecto del captopril y la Ang-(1-7) sobre la diferenciación de adipocitos beige mediante la cuantificación de la expresión del ARNm de *Ucp1*, *Tbx1* y *Cited1*.
2. Evaluar, a través de ensayos *in vitro* en cultivo primario de adipocitos de ratones Mas<sup>+/+</sup> y Mas<sup>-/-</sup>, el efecto del captopril y la Ang-(1-7) sobre la adipogénesis, la abundancia mitocondrial y la respiración mitocondrial.
3. Evaluar el efecto de un tratamiento agudo con captopril y con Ang-(1-7) sobre el *browning* del tejido adiposo subcutáneo inguinal de los ratones Mas<sup>+/+</sup> y Mas<sup>-/-</sup>.
4. Evaluar el efecto de un tratamiento crónico (1 mes) con captopril y con Ang-(1-7) sobre el peso corporal, la ingesta de alimento, la composición corporal, el gasto energético y la capacidad de hacer *browning* en un modelo de obesidad inducido por dieta alta en grasa y sacarosa (HFSD) en ratones Mas<sup>+/+</sup> y Mas<sup>-/-</sup>.
5. Determinar el efecto de la sobreexpresión de Ang-(1-7) *in vivo* sobre el peso corporal, la ingesta de alimento, la composición corporal, el gasto energético y la capacidad de hacer *browning* en un modelo de obesidad inducido por dieta alta en grasa y sacarosa (HFSD) en ratas transgénicas (TGR) y ratas silvestres (Sprague Dawley).

## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1 Ratones.

Todos los protocolos de animales descritos a continuación fueron aprobados por el Comité de Animales del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ), Ciudad de México, con los códigos de protocolo FNU-1379 y FNU-1811. Los ratones machos C57BL/6 (Mas<sup>+/+</sup>) y los ratones machos Knockout Mas (Mas<sup>-/-</sup>) de 8 semanas de edad se alojaron en jaulas (n=5) y se mantuvieron con un ciclo de luz/oscuridad de 12 h a 22-24 °C durante todos los experimentos.

Para los experimentos de tratamiento agudo, los ratones fueron tratados con 5 mg/kg de captopril en el agua de beber durante 24 h, 48 h, 72 h y 7 días. Posteriormente, se sacrificaron y se extrajo el tejido adiposo subcutáneo inguinal (TAS-i) para el análisis de expresión génica mediante qPCR. Para el tratamiento agudo con Ang-(1-7), los ratones fueron asignados aleatoriamente a una dieta de crecimiento siguiendo las recomendaciones del American Institute of Nutrition (AIN-93) que es la dieta control (143) o una dieta alta en grasas y sacarosa (**Tabla 3**) durante 16 semanas. Luego, se administró una dosis de 300 ng/kg\*min de Ang-(1-7) a los ratones delgados y 600 ng/kg\*min de Ang-(1-7) a los ratones obesos, o bien, se administró el vehículo (solución salina) durante 3 días. Los ratones se anestesiaron con sevoflurano, y posteriormente se realizó una cirugía en la cual se implantaron bombas osmóticas Alzet modelo 1003D (Alzet, California) en el área dorsal. Durante los 3 días de tratamiento, el consumo de oxígeno se midió mediante calorimetría indirecta.

Para los experimentos crónicos, los ratones fueron asignados a una dieta de crecimiento AIN-93 (dieta control) o una dieta alta en grasas y sacarosa (**Tabla 3**) durante 20 semanas. Durante el último mes, los ratones fueron tratados con 5 mg/kg de captopril o su vehículo (agua) o con 600 ng/kg\*min de Ang-(1-7) o su vehículo (solución salina). Para los experimentos crónicos de Ang-(1-7) se utilizaron bombas osmóticas Alzet modelo 1004 (Alzet, California). La composición corporal y la calorimetría indirecta se evaluaron antes y después del período de tratamiento. Los ratones siempre tuvieron acceso libre a sus dietas experimentales y se pesaron todas las semanas. Los ratones Mas<sup>-/-</sup> fueron obtenidos a partir de una colaboración con el laboratorio del Dr. Michael Bader del Max Delbrück Center for Molecular Medicine en Berlin, Alemania. Los ratones se desarrollaron según se describió previamente (130). Las secuencias de los *primers* que se utilizaron para genotipificar a los ratones Mas<sup>-/-</sup> se encuentran en la **Tabla 4**.

### 6.2 Ratas.

Para los experimentos con ratas, las ratas macho Sprague-Dawley (wild-type) de 6 semanas de edad y las ratas macho transgénicas que sobreexpresan Ang-(1-7) (TGR(A1-7)3292) se alojaron individualmente y se mantuvieron en las mismas condiciones que los ratones. Las ratas fueron asignadas aleatoriamente a una dieta de crecimiento AIN-93 (control) (143) o una dieta alta en grasas y sacarosa (**Tabla 3**) durante 20 semanas. La composición corporal y la calorimetría indirecta se evaluaron al final del período de inducción de obesidad.

Para los experimentos de exposición al frío, las ratas Sprague-Dawley y las ratas transgénicas de 6 a 7 semanas de edad fueron expuestas a un ambiente frío (4 °C) durante 3 h, 24 h y 72 h. Las ratas expuestas a temperatura ambiente (24 °C) se usaron como controles para normalizar los datos del qPCR. Las ratas transgénicas que sobreexpresan Ang-(1-7) (TGR(A1-7)3292) fueron obtenidas, al igual que los ratones Mas<sup>-/-</sup> a partir de una colaboración con el laboratorio del Dr. Michael Bader del Max Delbrück Center for Molecular Medicine en Berlin, Alemania. Las ratas se desarrollaron según se describió previamente (144). Las secuencias de los *primers* que se utilizaron para

genotipificar a las ratas TGR se encuentran en la **Tabla 4**.

**Tabla 3.** Composición de las dietas para roedores basadas en las recomendaciones del Instituto Americano para la Nutrición, la dieta control AIN-93 para crecimiento (AIN-93 G) y la dieta alta en grasa y sacarosa (HFSD).

Ingredientes	AIN-93 G (%)	HFSD para ratón (%)	HFSD para rata (%)
L-Cisteína	0.3	0.3	0.3
Bitartrato de colina	0.25	0.25	0.25
Mezcla de vitaminas	1	1	1
Fibra	5	5	5
Mezcla de minerales	3.5	3.5	3.5
Aceite de soya	7	3.1	7
Almidón	39.74	9	24.75
Maltodextrina	13.2	11.4	10.5
Sacarosa	10	21.3	4.7*
Caseína	20	24	24
Manteca	0	21.88	19
TBHQ	0.0014	0.00133	0.0014
<b>TOTAL</b>	<b>99.99</b>	<b>100.73</b>	<b>100.0</b>

\*A las ratas se les adiciona 10% de sacarosa en el agua de bebida *ad libitum*

TBHQ: Tert-butilhidroquinona

**Tabla 4.** Secuencias de los oligonucleótidos utilizados para genotipificar a los ratones  $Mas^{-/-}$  y a las ratas transgénicas.

Animal	Secuencia (5' → 3')
<b>Transgénico</b>	
<b>Ratones <math>Mas^{-/-}</math></b>	F: GGCAGCGCGGCTATCGTGG R: AGCCGTTGCCCTCCTGGCGCCTGGG
<b>Ratas TGR</b>	F: GGACCAAGCCTGGCCATGTCC R: CATCACCCATCGAGAGAACC

### 6.3 Cultivo celular de adipocitos diferenciados a partir de la fracción estromal vascular del TAS-inguinal de ratones.

Se aisló la fracción estromal vascular del tejido adiposo subcutáneo inguinal de ratones C57BL/6 ( $Mas^{+/+}$ ) y ratones  $Mas$  Knock out ( $Mas^{-/-}$ ). El tejido inguinal se disecó y se digirió con colagenasa Tipo IV al 0,05% (Gibco® Life Technologies, Grand Island, NY) durante 45 minutos a 37 °C. Luego, las células digeridas se centrifugaron a 1500 xg durante 15 minutos, y el botón celular se lavó dos veces con DMEM F12 (Gibco® Life Technologies, Grand Island, NY). Las células se sembraron en placas de 6 pozos con DMEM F12 suplementado con suero fetal bovino al 10% y antibiótico/antimicótico al 1% (penicilina/estreptomicina/anfotericina) (medio completo) a 37 °C en una incubadora

con CO<sub>2</sub> al 5%. Al alcanzar el 75% de confluencia, se cambió el medio y dos días después (día 1), las células se expusieron a medio de inducción que contenía dexametasona 5 µM, insulina 1 µM e isobutilmetilxantina 0,5 mM en medio completo durante 72 h. Luego, el medio de inducción se reemplazó con el medio de mantenimiento que contenía insulina 1 µM en medio completo y posteriormente se cambió cada 48 h hasta el día 10. El captopril (31.6 µM) o la Ang-(1-7) (1 µM) o la triyodotironina (T<sub>3</sub>) (1 nM) + pioglitazona (0,5 µM), un control positivo de *browning*, se agregaron durante la fase de mantenimiento hasta el día 10. Finalmente, los adipocitos derivados de la fracción estromal vascular se procesaron para la tinción con rojo oleoso, acumulación de lípidos, tinción de MitoTracker y extracción de ARN para posteriormente hacer el RT-PCR y por último el análisis por PCR en tiempo real para cuantificar la expresión de los marcadores selectivos de adipocitos beige.

#### **6.4 Tinción de lípidos de los adipocitos con rojo oleoso.**

Los adipocitos de la fracción estromal vascular se lavaron con PBS y se fijaron durante 60 minutos utilizando un fijador de formol-calcio al 10% (1 g de CaCl<sub>2</sub>, 25 ml de paraformaldehído al 16% (4% final) y 75 ml de agua destilada). Las células se lavaron dos veces con PBS 1x y brevemente con etanol al 70%. Las células se incubaron durante 5 minutos con la solución de rojo oleoso (2 g en 50 ml de etanol al 70% y 50 ml de acetona) y se lavaron con etanol al 70%. Posteriormente, las células se lavaron con agua corriente antes de visualizarlas con un microscopio. Finalmente, se extrajeron los lípidos de las células con alcohol isopropílico al 100% y se midió a 520 nm en un espectrofotómetro. Los valores se expresaron como % de cambio con respecto al control. Los experimentos fueron realizados por triplicado.

#### **6.5 Tinción de mitocondrias a través de MitoTracker.**

Las células se lavaron con PBS 1x y luego se añadió una solución de tinción precalentada (37 °C) que contenía la sonda MitoTracker® Red CMXRos 100 nM (Invitrogen Cat. No. M7512, MA.) durante 30 minutos a 37 °C. Luego, la solución de tinción se reemplazó con medio recién precalentado y finalmente, las células se observaron mediante un microscopio de fluorescencia. Los experimentos fueron realizados por triplicado. El análisis de la intensidad de fluorescencia se realizó con ImageJ (Versión 1.14, NIH, Bethesda, MD).

#### **6.6 Evaluación de la respiración mitocondrial mediante el analizador Seahorse.**

Los preadipocitos de la fracción estromal vascular del tejido adiposo inguinal de ratones C57BL/6 Mas<sup>+/+</sup> y ratones Mas<sup>-/-</sup> se diferenciaron a adipocitos en placas de 6 pozos utilizando el cóctel descrito anteriormente. En el día 5 de diferenciación, las células se sembraron en las placas de 96 pozos especializadas para la posterior medición en el analizador Seahorse XFe96 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA.) (15,000 células/pozo) y se mantuvieron en un medio de diferenciación por 2 días y posteriormente se cambió a medio de maduración (DMEM F12 e insulina 1 µM) durante 5 días más. La respiración mitocondrial de los adipocitos derivados de la fracción estromal vascular se determinó mediante el kit de MitoStress (Agilent Technologies, Santa Clara, CA.). Antes del experimento, las células se lavaron y se mantuvieron durante 1 h en una incubadora sin CO<sub>2</sub> en medio basal XF suplementado con glucosa 11 mM, piruvato 1 mM y glutamina 2 mM. Según el protocolo, los adipocitos derivados de la fracción estromal vascular se trataron durante 1 h con Ang-(1-7) 1 µM antes de inyectarse con oligomicina 2 µM, cianuro de carbonilo-p-trifluorometoxifenilhidrazona (FCCP) 1 µM y rotenona/antimicina A 1 µM. Para los experimentos de tratamiento crónico, se sembraron adipocitos derivados de la fracción estromal vascular en placas de 24 pozos especiales para

el equipo Seahorse XFe24 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA.) (13.500 células/pozo) y se diferenciaron a adipocitos durante 10 días siguiendo el protocolo convencional como en las placas de 6 pozos. Los adipocitos derivados de la fracción estromal vascular se trataron con captopril 31.6  $\mu\text{M}$  o Ang-(1-7) 1  $\mu\text{M}$  o con sus respectivos vehículos, agua y solución salina, durante la fase de maduración. Luego, las células se lavaron y se mantuvieron en una incubadora sin  $\text{CO}_2$  con el medio basal XF descrito anteriormente. Posteriormente, se evaluó la respiración mitocondrial utilizando el kit MitoStress (Agilent Technologies, Santa Clara, CA.) como se describió arriba. Las mediciones de la tasa de consumo de oxígeno (OCR) se obtuvieron y analizaron siguiendo las recomendaciones del fabricante (Seahorse Bioscience, Santa Clara, CA.). Los experimentos fueron realizados por triplicado.

#### **6.7 Evaluación de la composición corporal en los modelos de rata y ratón.**

Con el objetivo de evaluar la composición corporal de cada animal, se determinó el porcentaje de masa magra y de masa grasa al inicio y al final de los tratamientos utilizando el equipo de resonancia magnética nuclear (EchoMRI, Echo Medical Systems, Houston, TX). El escaneo se realizó colocando a los animales en un cilindro de plástico de paredes delgadas que limitaba el movimiento del animal. En el cilindro, los animales fueron sometidos brevemente a un campo electromagnético de baja intensidad (0.05 Tesla) durante 2 min.

#### **6.8 Estudios de gasto energético en los modelos de rata y ratón.**

Para los experimentos agudos de 3 días de tratamiento con Ang-(1-7), los ratones se colocaron en el calorímetro y se registró el volumen de consumo de oxígeno ( $\text{VO}_2$ ) y la producción de  $\text{CO}_2$  durante los 3 días de tratamiento. Para los experimentos crónicos de tratamiento con captopril o Ang-(1-7) en ratones y los experimentos en ratas, las mediciones se registraron antes y después del período de tratamiento. Todas las mediciones metabólicas se obtuvieron utilizando un Sistema Integral de Monitoreo de Animales de Laboratorio (CLAMS, Columbus Instruments, OH), que es un sistema de calorimetría indirecta de circuito abierto. El aire de la muestra se pasó a través de un sensor de  $\text{O}_2$  para determinar el contenido de este gas. Se determinaron así el  $\text{VO}_2$  y el  $\text{VCO}_2$ . Los análisis se realizaron con el software CLAX suministrado por el fabricante. Para el análisis de calorimetría, los animales se alojaron individualmente y se mantuvieron a 22-24 °C bajo un ciclo de luz-oscuridad de 12 h/12 h. La comida estaba disponible de 19:00 h a 7:00 h, y el agua estaba disponible *ad libitum*. Todos los animales fueron aclimatados a las jaulas de monitoreo durante 12 h antes del comienzo del registro continuo de 24 h. Los resultados se muestran como el promedio de los ciclos de luz de 12 h (7:00 a 19:00) y los ciclos de oscuridad de 12 h (19:00 a 7:00) para las últimas 24 h del estudio.

#### **6.9 Prueba de tolerancia a la glucosa intraperitoneal en los modelos de rata y ratón.**

Se realizó una curva de tolerancia a la glucosa intraperitoneal (CTG-ip) fue realizada en los ratones tratados crónicamente con Ang-(1-7) y en las ratas. Los animales se dejaron en ayuno durante 8 h antes de la prueba. La CTG-ip inició mediante una inyección intraperitoneal de 2 g/kg de peso corporal de glucosa. Se obtuvieron muestras de sangre a partir de la cola, previamente puncionada con una aguja de bajo calibre, antes de la inyección de glucosa y durante los tiempos 15, 30, 60, 90 y 120 minutos después de la inyección intraperitoneal. La glucosa se midió mediante tiras de glucosa a través de un glucómetro FreeStyle Optium (Abbott, Chicago, IL).



#### **6.10 Prueba de resistencia al frío en los ratones y las ratas.**

Los ratones tratados con captopril durante el tratamiento crónico fueron expuestos a un ambiente frío (4 °C) durante seis horas. La temperatura corporal durante la exposición al frío se evaluó cada hora durante 6 horas utilizando una sonda de temperatura rectal para ratón (Microtherma 2, Thermoworks, American Fork, UT). Para el experimento con ratas, se utilizó una sonda de temperatura rectal para rata (Microtherma 2, Thermoworks, American Fork, UT) con la finalidad de medir la temperatura corporal cada hora durante 8 h. Además, las ratas fueron expuestas al frío durante diferentes períodos: 3, 24 y 72 h. Antes del experimento, todos los animales habían sido alojados a temperatura ambiente de 22-24°C.

#### **6.11 Aislamiento de las muestras de sangre y tejidos.**

En el último día de tratamiento, los animales fueron sacrificados después de 8 h de ayuno. La sangre se recogió en tubos que contenían heparina y se centrifugó a 1,000 xg durante 10 min. Tanto para ratones como para ratas, se recolectó el tejido adiposo blanco subcutáneo inguinal (TAS-i) y tejido adiposo pardo interescapular (TAP-i). El tejido adiposo blanco anterior subcutáneo (TAB-as) también se recogió de las ratas. Todos los tejidos se aislaron rápidamente y se congelaron inmediatamente en nitrógeno y luego se almacenaron a -70 °C hasta la extracción de ARN o proteína. Además, se recogió una muestra de cada depósito adiposo y se almacenó en formalina al 10% para el análisis histológico o de inmunofluorescencia.

#### **6.12 Cuantificación de Angiotensina-(1-7) mediante electroforesis capilar.**

La Ang-(1-7) se cuantificó en suero o plasma mediante electroforesis capilar a través de la detección UV por una matriz de diodos. Las muestras se desproteinizaron con metanol frío (relación 10:1) y luego con ácido tricloroacético frío al 20% (relación 10:1). Luego, las muestras se centrifugaron a 16,000 xg durante 15 min a 10 °C y se filtraron con una membrana de nitrocelulosa de 0.22 µm. Posteriormente, con una dilución 1:10 de hidróxido de sodio frío 0.1 M, las muestras se inyectaron a través de un cartucho clásico Sep-Pak C18 (Waters, Milford, MA) y se analizaron directamente con el sistema Beckman Coulter P/ACETM MDQ (Urbana, IL). Las muestras se inyectaron bajo presión hidrodinámica a 0.5 psi / 10 s. El capilar se lavó entre cada medición con hidróxido de sodio 1,0 M durante 2 min y agua desionizada durante 2 min. Los resultados se expresaron en pmol/ml. La concentración de Ang-(1-7) se determinó utilizando una curva estándar (145).

#### **6.13 Cuantificación de óxido nítrico en el tejido adiposo inguinal.**

Los metabolitos de óxido nítrico se cuantificaron a partir del homogeneizado del TAS-i de ratones mediante un ensayo espectrofotométrico (Cary 4000, Varian Inc., Australia), midiendo las absorbancias a 572 nm y 587 nm ( $\Delta Abs = Abs_{572nm} - Abs_{587nm}$ ), como se describió anteriormente (146, 147).

#### **6.14 Evaluación de la expresión de genes mediante PCR en tiempo real.**

El ARN total se extrajo de los adipocitos derivados de la fracción estromal vascular del tejido adiposo subcutáneo inguinal (TAS-i) o del tejido adiposo pardo interescapular (TAP-i) de ratones, también se aisló el TAS-i, TAP-i y el depósito de tejido adiposo blanco anterior subcutáneo (TAB-as) de las ratas con el reactivo TRIzol siguiendo las instrucciones del fabricante (Thermofisher Científico, Waltham, MA). El ARN (3000 ng) se convirtió en ADNc mediante la reacción de transcripción reversa: el volumen final de 22 µl contenía una mezcla de buffer de primera

cadena (5X), Oligo dT (100 ng/μl), mezcla de dNTP (2 mM), ditioneitol (DTT) (0.1 M), inhibidor de ribonucleasa y transcriptasa inversa M-MLV (200 U/uL). La mezcla se incubó 60 min a 42 °C seguido de 15 min a 90 °C. Posteriormente, las muestras de ADNc (16 ng/μl) se sometieron a una reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real (qPCR) para evaluar la expresión de *Ucp1*, *Pgc1-α*, *Prdm16*, *Pparγ*, *Tmem26*, *Tbx1* y *Cited1* utilizando SYBR Green (Roche, Pleasanton, CA). El *36b4* se usó como control invariante. La cantidad relativa de cada ARNm se calculó utilizando el método comparativo de CT. Los *primers forward* y *reverse* correspondientes utilizados a una concentración final de 1 μM para ratones están en la **Tabla 5**, y para las ratas en la **Tabla 6**.

#### **6.15 Análisis de la expresión proteica por Western blot.**

La proteína total se extrajo del TAS-i de ratones C57BL6 Mas<sup>+/+</sup> y ratones Mas<sup>-/-</sup>, con un buffer de lisis (Tris 50 mM (pH 7,4), KCl 150 mM, EDTA 1 mM, NP-40 al 1% y sodio 1 mM butirato) mezclado con un cóctel de inhibidores de proteasas (Roche, Pleasanton, CA). Se usó un ensayo de Lowry para determinar la concentración de proteína. Se cargaron 20 microgramos de proteína, se separaron en un gel SDS-PAGE al 10% y se transfirieron a una membrana de difluoruro de polivinilideno (PVDF) Immobilon-P (Millipore Sigma, Burlington, MA). Las incubaciones de bloqueo se realizaron en leche sin grasa al 5% (Bio-Rad, Hercules, CA). Las membranas se incubaron con anticuerpos contra PPARγ (1:5000, sc-271392, Dallas, TX), UCP1 (1:1000, ab10983, Cambridge, UK) o β-actina (1:2000, sc-1615, Dallas, TX) diluido en TBS con 1% de leche descremada y 0.1% Tween 20. Las proteínas de interés se detectaron con un anticuerpo IgG anti-ratón de cabra conjugado con HRP (1:20000, sc-2005, Dallas, TX), o con un anticuerpo IgG anti-cabra de conejo (1:3500, sc-2768, Dallas, TX) o con un anticuerpo IgG anti-conejo de cabra (1:3500, cat 111-035-003, West Grove, PA) diluido en TBS con 1% de leche descremada y 0.1% de Tween 20. Se utilizaron reactivos de detección de quimioluminiscencia mejorada (Amersham Biosciences, Little Chalfont, RU) y un sistema de imágenes ChemiDoc MP (Bio-Rad, Hercules, CA) para determinar los niveles de proteína. El software ImageJ (National Institutes of Health) se utilizó para el análisis de densitometría de 3 ensayos.

**Tabla 5.** Secuencia de oligonucleótidos utilizados para el qPCR en ratón.

Gen	Secuencia (5' → 3')	Tm (°C)
<i>Ucp1</i>	F: CTTTGCCTCACTCAGGATTGG	64
	R: ACTGCCACACCTCCAGTCATT	
<i>Pgc1α</i>	F: AAGTGTGGAACCTCTCTGGAAGTGG	64
	R: GGGTTATCTTGGTTGGCTTTATG	
<i>Prdm16</i>	F: AGGCCCTGTCTACATTCCT	64
	R: TCTCCTGGGATGACACCTCT	
<i>Tmem26</i>	F: GCTCACCTCAAGTTCAAGC	64
	R: CTCTGGCCAGCTCAAGGATA	
<i>Tbx1</i>	F: TGAGGAGACACGCTTCACTG	64
	R: CTGCAGCGTCTTTGTCTGAG	
<i>Cited1</i>	F: TCGAGGCCTGCACTTGAT	64
	R: AGCTAGTGGGAACTCCGTTG	
<i>36b4</i>	F: AGATTCGGGATATGCTGTTGG	64
	R: AAAGCCTGGAAGAAGGAGGTC	

*Ucp1*: Uncoupling protein 1; *Pgc1α*: Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1α; *Prdm16*: PR domain containing 16; *Tmem26*: Transmembrane protein 26; *Tbx1*: T-box 1; *Cited1*: Cbp/p300-interacting transactivator 1; Tm: *primer* melting temperature

**Tabla 6.** Secuencia de oligonucleótidos utilizados para el qPCR en rata.

Gen	Secuencia (5' → 3')	Tm (°C)
<i>Ucp1</i>	F: GCCTCTACGATACGGTCCAA	64
	R: TGCATTCTGACCTTCACCAC	
<i>Pparγ</i>	F: TGTGGACCTCTCTGTGATGG	64
	R: GGACGCAGGCTCTACTTTGA	
<i>Tmem26</i>	F: TCGGGAATCCTTGTGGTGT	64
	R: TCAAAGCCACAAGCCGGTA	
<i>36b4</i>	F: CGACCTGGAAGTCCAACACTAC	64
	R: ATCTGCTGCATCTGCTTG	

*Ucp1*: Uncoupling protein 1; *Pparγ*: Peroxisome proliferator-activated receptor gamma; *Tmem26*: Transmembrane protein 26, Tm: *primer* melting temperature

#### 6.16 Estudio histológico y de inmunofluorescencia en tejidos adiposos.

Para evaluar la morfología y el tamaño de los adipocitos, los tejidos adiposos subcutáneos se fijaron durante la noche en formalina al 10%. Los tejidos se deshidrataron con alcohol, se aclararon en xilenos y se embebieron en parafina. Los tejidos se seccionaron (4 μm) y se tiñeron con hematoxilina y eosina. Las áreas de adipocitos se determinaron

usando el software de análisis de imagen Adiposoft cuantificando el área de adipocitos de 6 regiones de 4 animales por grupo de estudio.

Para evaluar la abundancia de UCP1 en el tejido adiposo blanco termogénico transitorio, el tejido adiposo pardo interescapular y el tejido adiposo subcutáneo inguinal se seccionaron tejidos embebidos en parafina (4  $\mu\text{m}$ ) y se montaron en portaobjetos con carga positiva (Kling-On HIER Toboganes, Biocare medical, Pacheco, CA). Las secciones se hidrataron y se sometieron a recuperación de antígeno enzimático durante 1.5 min (reactivo de recuperación de antígeno enzimático IHC, Enzo, Farmingdale, NY), se bloquearon a temperatura ambiente durante 1 h en sniper de fondo (Biocare medical, Pacheco, CA), se lavaron 3 veces en PBS-T (Tween-20 al 0.1%) y se incubaron durante la noche con un anticuerpo policlonal de conejo contra UCP1 (1:100, ab155117, Cambridge, UK). Después de lavar con PBS-T, las secciones se incubaron con anticuerpo secundario conjugado con Alexa Fluor 488 de cabra anti-conejo (1:1000, ab150077, Cambridge, UK) en diluyente de anticuerpo (ab64211, Cambridge, UK) durante 1 hora a temperatura ambiente. Las secciones se montaron con un medio de montaje acuoso (ProLong Gold Antifade Mountant, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) y se visualizaron mediante un microscopio Leica. Las imágenes fueron capturadas con una cámara digital Leica y procesadas con el software ImageJ (NIH).

Para la visualización histológica de mucopolisacáridos ácidos en el tejido adiposo blanco termogénico transitorio, la tinción de hierro coloidal de Hale se realizó según lo descrito por Gasic y Berwick (148). Las secciones se desparafinaron, se hidrataron en agua destilada y se enjuagaron en una solución de ácido acético al 12%. Los portaobjetos se colocaron luego en una solución de hierro coloidal de Muller (pH 1.1) durante 30 min, se enjuagaron en una solución de ácido acético al 12% y se tiñeron durante 20 min en una mezcla fresca de ácido clorhídrico al 2% y ferrocianuro de potasio al 2%. Los portaobjetos se enjuagaron 3 veces en agua destilada, se deshidrataron en soluciones de alcohol, se aclararon en xilenos y se montaron con resina sintética. Los mucopolisacáridos ácidos se tiñen de azul.

#### **6.17 Análisis estadístico.**

Los resultados se presentan como las medias  $\pm$  el error estándar de la media (EEM). Se usó una prueba t no pareada para para comparar las diferencias entre dos grupos diferentes y una prueba de t pareada cuando se comparaba dos mediciones en un solo grupo de estudio. El análisis de más de dos grupos se realizó mediante ANOVA de una vía seguido de una prueba de Dunnett para determinar la significancia al comparar con un control o la prueba de Tukey al comparar todos los grupos. Cuando dos factores tuvieron influencia en el experimento, se realizó un análisis ANOVA de dos vías y cuando se realizaron diferentes medidas en los mismos sujetos, se seleccionó el análisis ANOVA de medidas repetidas.

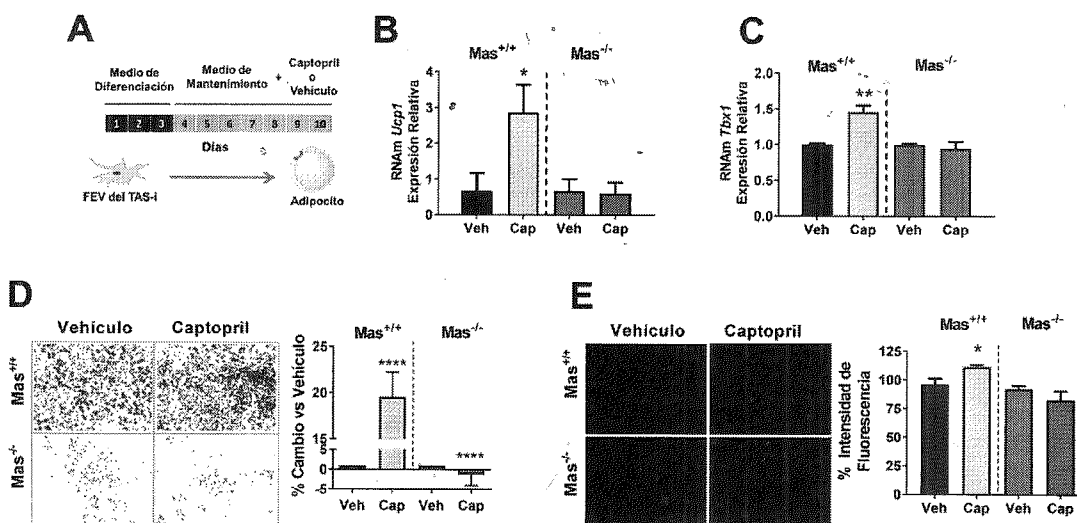
Las diferencias se consideraron significativas cuando el valor de p fue menor a 0.05 ( $p < 0.05$ ). Los datos se analizaron utilizando el programa GraphPad Prism (San Diego, CA).

## 7. RESULTADOS

### a) Estudios *in vitro*

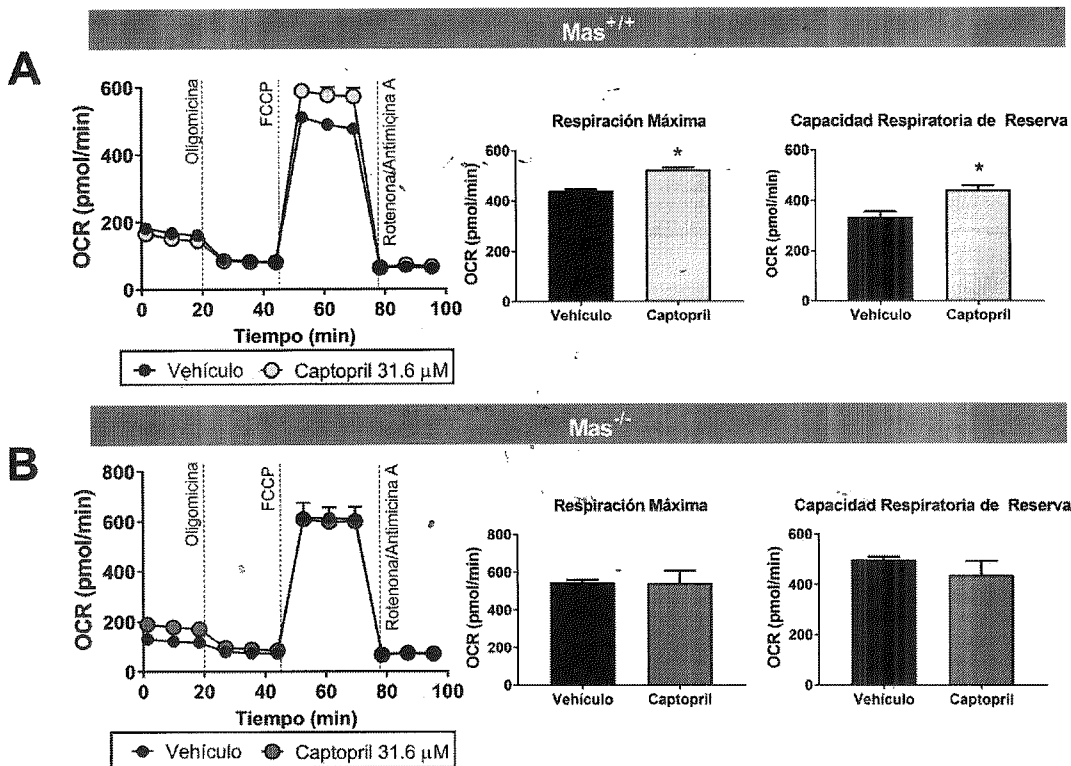
#### 7.1 El captopril induce la expresión de *Ucp1* y *Tbx1* en células derivadas de la fracción estromal vascular del tejido adiposo inguinal.

Se ha demostrado que los adipocitos son una fuente de todos los componentes del SRA (149, 150) y que el captopril, un inhibidor de la ECA (iECA), puede aumentar las concentraciones de Ang-(1-7) (115, 138). Como potencial inductor de *browning*, primero se exploró si el captopril podía inducir la expresión de genes termogénicos y marcadores de adipocitos beige *in vitro*. Con este objetivo, se trataron durante 7 días con captopril los adipocitos diferenciados de la fracción estromal vascular del tejido adiposo blanco inguinal de ratones *Mas*<sup>+/+</sup>. Para saber si el receptor Mas está involucrado, también se diferenciaron los adipocitos de los ratones *Mas*<sup>-/-</sup> (Figura 10A). El captopril aumentó significativamente la abundancia del ARNm de *Ucp1* (Figura 10B), así como *Tbx1* (Figura 10C) en adipocitos *Mas*<sup>+/+</sup>, mientras que los adipocitos *Mas*<sup>-/-</sup> no respondieron al captopril (Figuras 10B-C), confirmando que el receptor Mas es necesario para esta respuesta. Además, se observó que las células *Mas*<sup>+/+</sup> mostraron una mayor adipogénesis cuando se incubaron con captopril, según la tinción de lípidos con el rojo oleoso, en comparación con las células incubadas con el vehículo (agua). De manera interesante, hubo muy poca adipogénesis inducida por captopril en las células *Mas*<sup>-/-</sup> de la fracción estromal vascular (Figura 10D). Además, se observó que el captopril aumentó la abundancia de las mitocondrias, debido a que la tinción de MitoTracker mostró que los adipocitos *Mas*<sup>+/+</sup> tenían una señal más fuerte en comparación con los adipocitos *Mas*<sup>-/-</sup>, que mostraban una señal débil (Figura 10E).



**Figura 10. El captopril induce la diferenciación de adipocitos beige en cultivo primario de adipocitos-derivados de la fracción estromal vascular.** A) Protocolo de diferenciación a adipocitos. B y C) El captopril (31.6  $\mu$ M) incrementa la expresión de genes termogénicos en adipocitos de ratones *Mas*<sup>+/+</sup>. El vehículo es agua. D) Imágenes microscópicas de adipocitos *Mas*<sup>+/+</sup> y *Mas*<sup>-/-</sup> teñidos con rojo oleoso (4x) y E) con MitoTracker después del tratamiento con 31.6  $\mu$ M de captopril (10x), porcentaje de intensidad de fluorescencia normalizado con el vehículo. Los datos representan la media  $\pm$  E.E. Los análisis estadísticos se realizaron mediante una prueba de t no pareada (para B, C, D y E), \* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01, \*\*\*\* $p$ <0.0001,  $n$ =3.

Posteriormente, se evaluó si el aumento en los marcadores de *browning* así como su contenido mitocondrial en los adipocitos *Mas*<sup>+/+</sup> se asociaba con un aumento en su capacidad oxidativa mitocondrial. Para este propósito, se midió la respiración mitocondrial de los adipocitos *Mas*<sup>+/+</sup> y *Mas*<sup>-/-</sup> con un analizador de flujo para evaluar el consumo basal de oxígeno, la fuga de protones después de la adición de oligomicina, la respiración máxima después de la inyección del desacoplante FCCP y la capacidad respiratoria de reserva. Los resultados mostraron que el tratamiento durante 7 días con captopril aumentó la respiración máxima y la capacidad respiratoria de reserva en los adipocitos *Mas*<sup>+/+</sup>, mientras que este efecto estuvo ausente en los adipocitos *Mas*<sup>-/-</sup> (**Figuras 11A-B**). Los resultados sugieren que el captopril ejerce sus efectos al aumentar la expresión de *Ucp1* y marcadores beige, induciendo adipogénesis, contribuyendo a la abundancia mitocondrial y mejorando la capacidad oxidativa mitocondrial a través del receptor *Mas*.

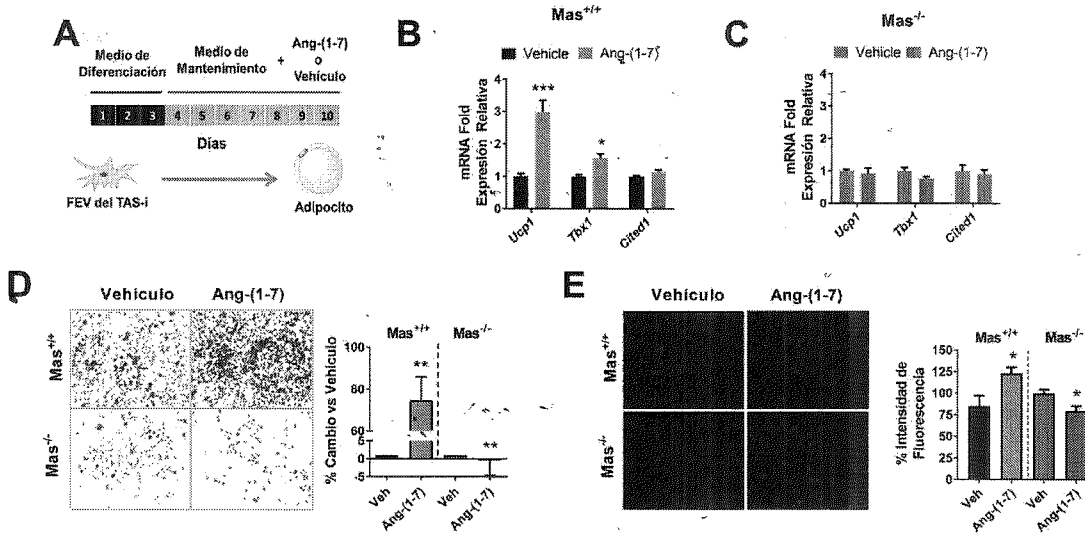


**Figura 11. El captopril aumenta la respiración mitocondrial en cultivo primario de adipocitos-derivados de la fracción estromal vascular. A)** Efecto del captopril (31.6 μM) sobre la respiración mitocondrial de los adipocitos *Mas*<sup>+/+</sup> y en los **B)** adipocitos *Mas*<sup>-/-</sup>. **OCR:** tasa de consumo de oxígeno. Los datos representan la media ± E.E. Los análisis estadísticos se realizaron mediante una prueba de t no pareada (para A y B), \*p<0.05, n=3.

### 7.2 La Ang-(1-7) induce la expresión de *Ucp1* y marcadores de adipocitos beige en células derivadas de la fracción estromal vascular del tejido adiposo inguinal.

Se ha reportado que el captopril aumenta la concentración del péptido Ang-(1-7) debido a la inhibición de la ECA (151) y que este péptido es el ligando endógeno del receptor *Mas* (109). Por lo tanto, se evaluó si la Ang-(1-7) era responsable de efectos similares a los observados con el captopril. Los resultados mostraron que la incubación con Ang-(1-7) en adipocitos derivados de la fracción estromal vascular (**Figura 12A**) aumentó la expresión del ARNm de

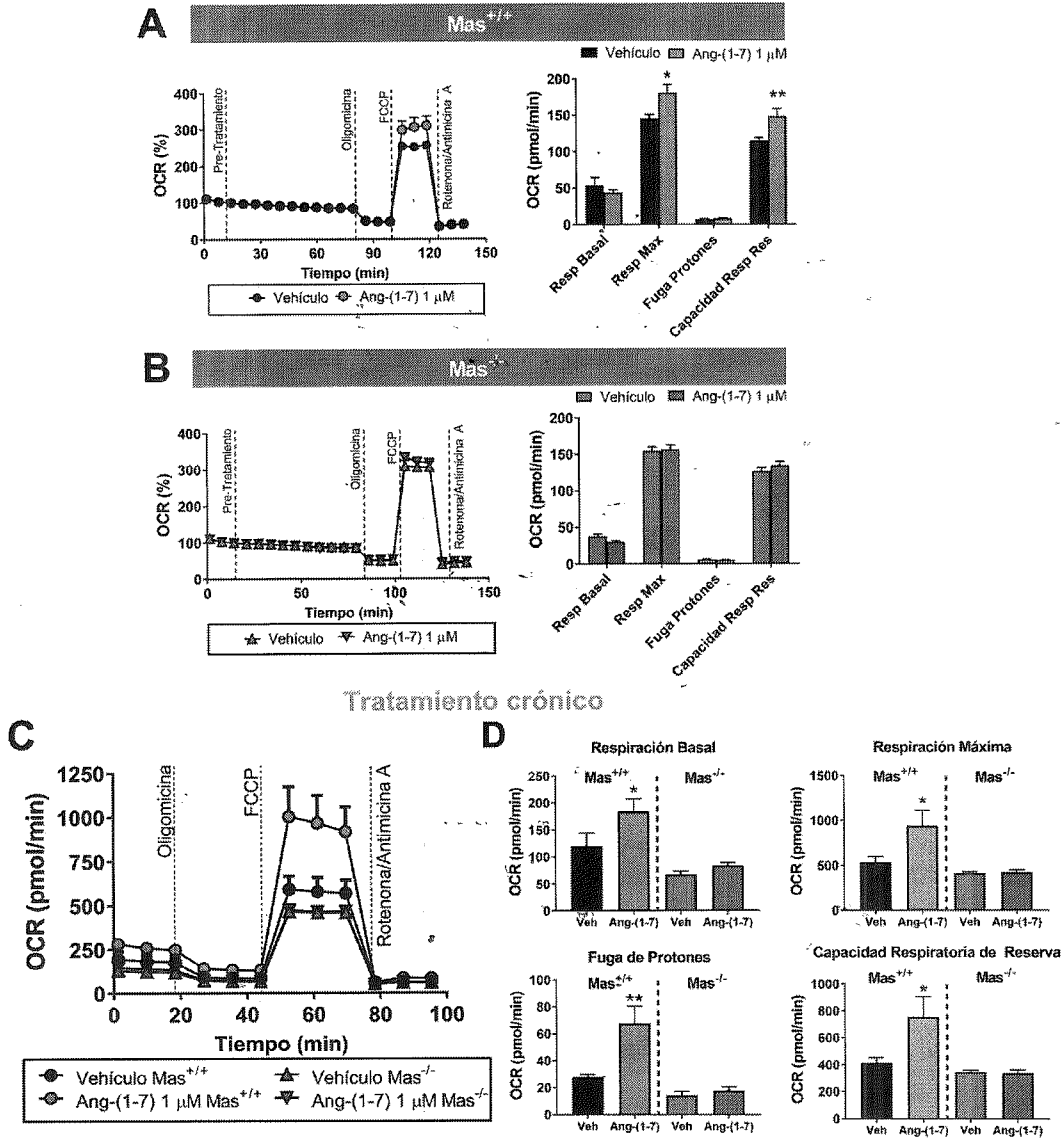
*Ucp1*, *Tbx1* y *Cited1* (Figura 12B). Similar al captopril, la falta del receptor Mas inhibió el efecto de la Ang-(1-7) sobre la expresión de *Ucp1*, *Tbx1* y *Cited1* (Figura 12C). Además, el tratamiento con Ang-(1-7) aumentó la adipogénesis en las células *Mas*<sup>+/+</sup> como indica la tinción de rojo oleoso en comparación con las células *Mas*<sup>-/-</sup> (Figura 12D). Asimismo, la Ang-(1-7) incrementó la abundancia mitocondrial en los adipocitos *Mas*<sup>+/+</sup> en comparación con los adipocitos *Mas*<sup>-/-</sup> (Figura 12E).



**Figura 12. La Ang-(1-7) induce la diferenciación de adipocitos beige en cultivo primario de adipocitos-derivados de la fracción estromal vascular. A)** Protocolo de diferenciación a adipocitos. **B)** Análisis de la expresión del ARNm de *Ucp1*, *Tbx1* y *Cited1* en adipocitos *Mas*<sup>+/+</sup> y **C)** adipocitos *Mas*<sup>-/-</sup> después del tratamiento con 1  $\mu$ M de Ang-(1-7). El vehículo es solución salina. **D)** Imágenes microscópicas de adipocitos *Mas*<sup>+/+</sup> y *Mas*<sup>-/-</sup> teñidos con rojo oleoso (4x) y **E)** con MitoTracker después del tratamiento con 1  $\mu$ M de Ang-(1-7) (10x), porcentaje de intensidad de fluorescencia normalizado con el vehículo. Los datos representan la media  $\pm$  E.E. Los análisis estadísticos se realizaron mediante una prueba de t no pareada (para B, C, D y E), \* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01, \*\*\* $p$ <0.001,  $n$ =3.

Para demostrar que estos efectos se asocian con una mayor tasa de consumo de oxígeno, se analizó el efecto de la Ang-(1-7) después del tratamiento a corto o largo plazo en adipocitos *Mas*<sup>+/+</sup> y *Mas*<sup>-/-</sup>. El tratamiento a corto plazo con Ang-(1-7) durante 1 h aumentó la respiración máxima y la capacidad respiratoria de reserva en los adipocitos *Mas*<sup>+/+</sup>, y este resultado dependía del receptor Mas (Figuras 13A-B). Por otro lado, el tratamiento a largo plazo en adipocitos *Mas*<sup>+/+</sup> con Ang-(1-7) durante 7 días aumentó la tasa de consumo basal de oxígeno (OCR), fuga de protones, respiración máxima y capacidad respiratoria de repuesto cuando los resultados son comparados con su vehículo. En los adipocitos *Mas*<sup>-/-</sup>, el tratamiento a largo plazo con Ang-(1-7) no aumentó el OCR del tratamiento en comparación con el vehículo (Figuras 13C-D). Estos resultados indican que la Ang-(1-7) aumenta el metabolismo oxidativo mitocondrial asociado con un aumento en la expresión de los genes termogénicos y con la abundancia mitocondrial. Además, se puede inferir que el efecto de captopril sobre los adipocitos está mediado por la interacción entre Ang-(1-7) y el receptor Mas.

## Pre-tratamiento Agudo



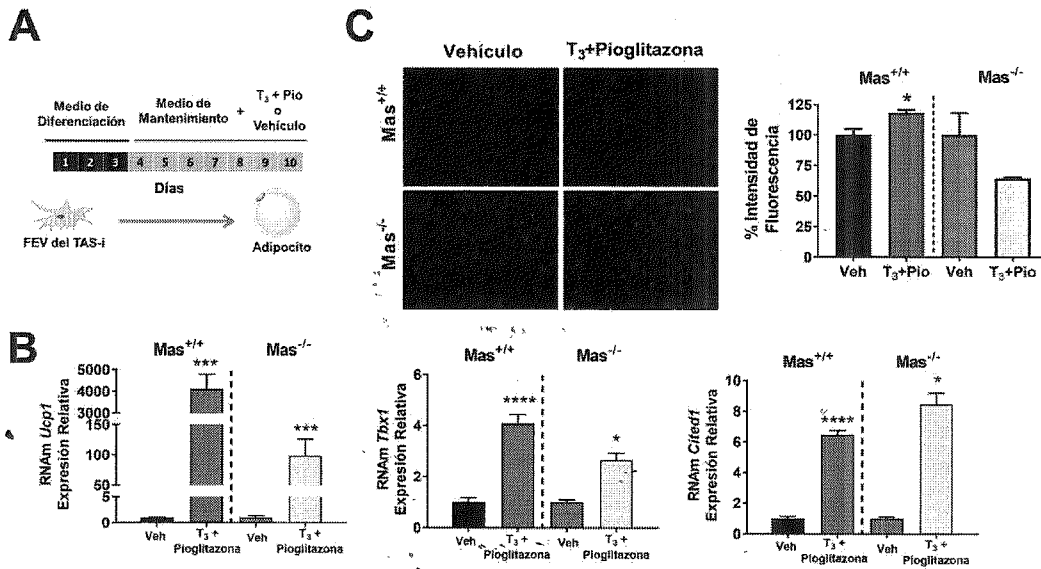
**Figura 13.** La Ang-(1-7) aumenta la respiración mitocondrial en cultivo primario de adipocitos-derivados de la fracción estromal vascular. **A)** Tasa de consumo de oxígeno (OCR) de los adipocitos Mas<sup>+/+</sup> y **B)** adipocitos Mas<sup>-/-</sup> después de 1 h de tratamiento (agudo) con 1 μM de Ang-(1-7). **C y D)** Tasa de consumo de oxígeno (OCR) de los adipocitos Mas<sup>+/+</sup> y Mas<sup>-/-</sup> después de 7 días de tratamiento (crónico) con 1 μM de Ang-(1-7). Los datos representan la media ± E.E. Los análisis estadísticos se realizaron mediante una prueba de t no pareada (para A, B y D), \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001, n=3.

### 7.3 La Ang-(1-7) estimula selectivamente el *browning* a través del receptor Mas.

Los compuestos triyodotironina (T<sub>3</sub>) y pioglitazona son inductores del *browning* (56, 57). Cuando los adipocitos Mas<sup>+/+</sup> se tratan con estos compuestos (Figura 14A), se observa un *browning* marcado, medido por un aumento del ARNm de *Ucp1*, *Tbx1* y *Cited1* (Figura 14B). Este aumento se encuentra acompañado por un aumento en el número de mitocondrias (Figura 14C). Por otra parte, los adipocitos que carecen del receptor Mas y fueron tratados con T<sub>3</sub> y

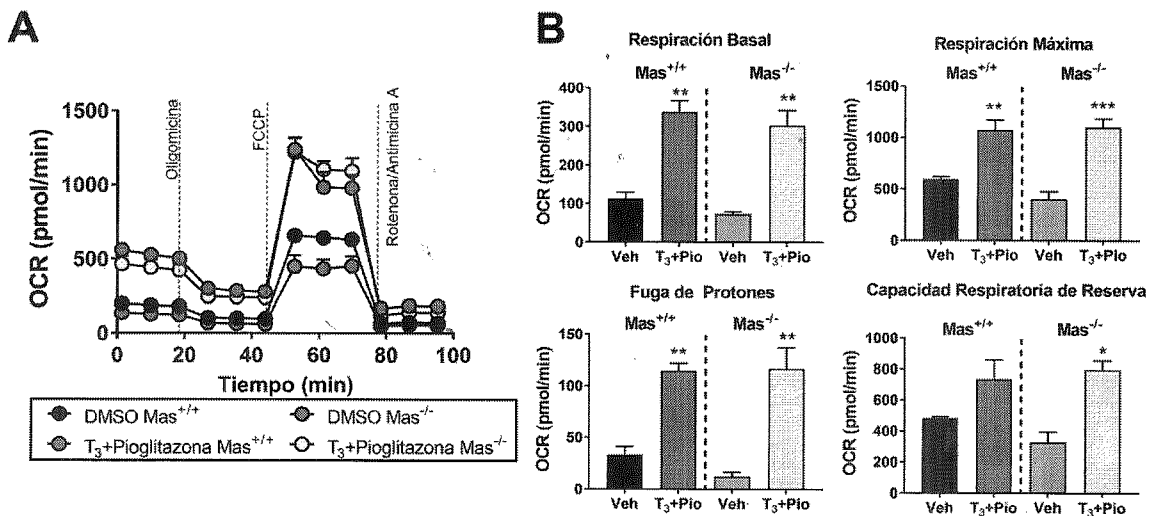


pioglitazona, también se observa un aumento en la expresión de *Ucp1*, *Tbx1* y *Cited1*, pero los niveles aumentaron en menor medida en comparación con los adipocitos *Mas*<sup>+/+</sup> (Figura 14B).



**Figura 14.** La mezcla de T<sub>3</sub>+pioglitazona aumenta la diferenciación de adipocitos beige en cultivo primario de adipocitos derivados de la fracción estromal vascular independientemente del receptor *Mas*. **A)** Protocolo de diferenciación a adipocitos. **B)** Análisis de la expresión del ARNm de *Ucp1*, *Tbx1* y *Cited1* en adipocitos *Mas*<sup>+/+</sup> y *Mas*<sup>-/-</sup> después del tratamiento con T<sub>3</sub>+Pioglitazona. El vehículo es DMSO. **C)** Imágenes microscópicas de adipocitos *Mas*<sup>+/+</sup> y *Mas*<sup>-/-</sup> teñidos con MitoTracker después del tratamiento con T<sub>3</sub>+Pioglitazona (10x), porcentaje de intensidad de fluorescencia normalizada con el vehículo. Los datos representan la media ± E.E. Los análisis estadísticos se realizaron mediante una prueba de t no pareada (para B y C), \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001, \*\*\*\*p<0.0001, n=3.

Con la finalidad de conocer el efecto de la T<sub>3</sub>+Pioglitazona sobre la respiración mitocondrial, se evaluó su capacidad oxidativa en los adipocitos cultivados. Los resultados indicaron que la T<sub>3</sub>+pioglitazona aumentó el OCR durante la respiración basal y máxima, así como la fuga de protones y la capacidad respiratoria de reserva independientemente del receptor *Mas* (Figuras 15A-B). Esta evidencia sugiere que la Ang-(1-7) usa una vía de señalización diferente a la T<sub>3</sub> y la pioglitazona para inducir el *browning* del tejido adiposo inguinal (Figura 15).

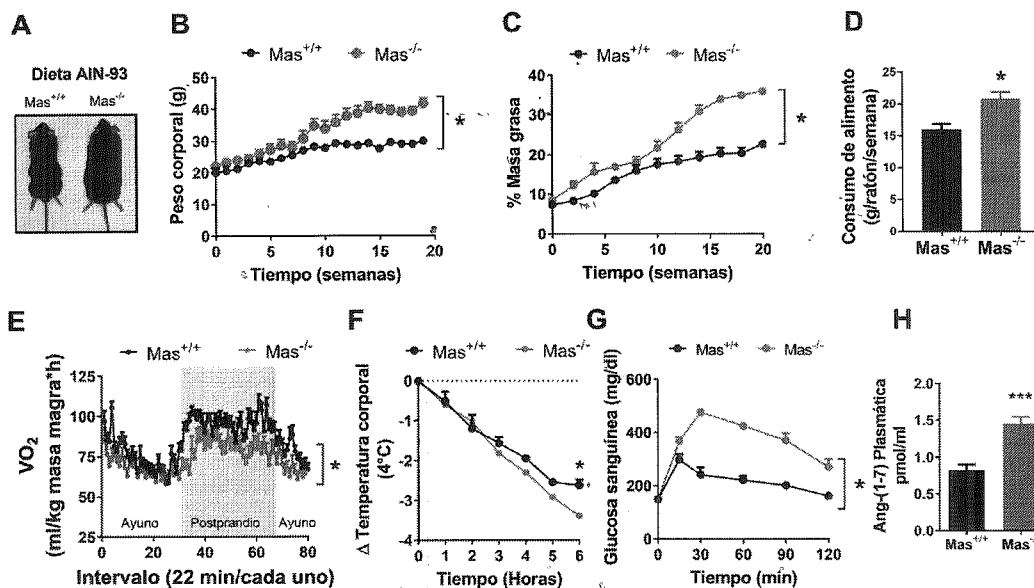


**Figura 15. La mezcla de T<sub>3</sub>+pioglitazona aumenta la respiración mitocondrial en cultivo primario de adipocitos derivados de la fracción estromal vascular independientemente del receptor Mas.** A y B) Efecto del tratamiento crónico de T<sub>3</sub> + Pioglitazona sobre la respiración mitocondrial de los adipocitos Mas<sup>+/+</sup> y adipocitos Mas<sup>-/-</sup>. OCR: tasa de consumo de oxígeno. Los datos representan la media ± E.E. Los análisis estadísticos se realizaron mediante una prueba de t no pareada (para B), \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001, \*\*\*\*p<0.0001, n=3.

b) Estudios *in vivo*

**7.4 Los ratones que carecen de receptor Mas son propensos a la obesidad y a un metabolismo alterado.**

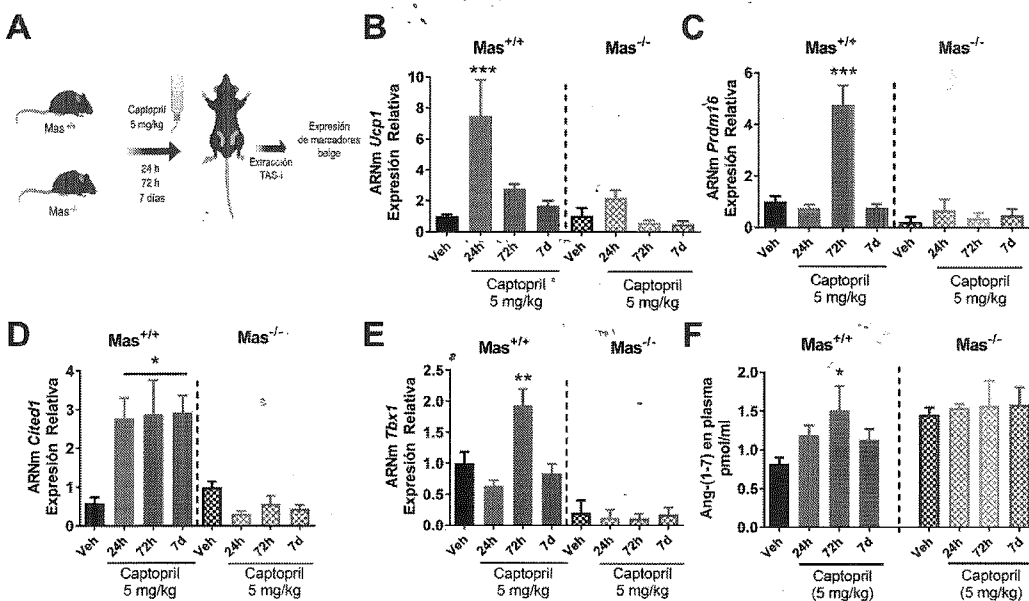
Como parte de los experimentos *in vivo*, inicialmente se estudiaron las diferencias metabólicas entre los ratones Mas<sup>+/+</sup> y Mas<sup>-/-</sup>. Después del consumo de una dieta control durante cinco meses, los ratones Mas<sup>-/-</sup> ganaron más peso y más masa grasa que los ratones Mas<sup>+/+</sup> (Figuras 16A-C). Además, los ratones que carecen del receptor Mas tuvieron una mayor ingesta de alimento, un consumo reducido de oxígeno (VO<sub>2</sub>), la resistencia al frío reducida y la tolerancia a la glucosa disminuida en comparación con los ratones Mas<sup>+/+</sup> (Figuras 16D-G). Es importante señalar que los niveles de Ang-(1-7) circulantes en ratones Mas<sup>-/-</sup> se encontraron elevados en aproximadamente un 77% comparado con los ratones Mas<sup>+/+</sup>. (Figura 16H), lo que sugiere un efecto compensatorio debido a la falta del receptor Mas. Estos resultados indican que la ausencia del receptor Mas se asocia con un balance energético positivo que conduce a la obesidad y a la intolerancia a la glucosa.



**Figura 16. Los ratones que carecen de receptor Mas son propensos a la obesidad y a un metabolismo alterado.** A) Foto representativa de ratones Mas<sup>+/+</sup> (izquierda) y Mas<sup>-/-</sup> (derecha) alimentados con dieta control AIN-93 durante 5 meses. B) Peso corporal de ratones Mas<sup>+/+</sup> y Mas<sup>-/-</sup> alimentados con una dieta de control AIN-93. C) Porcentaje de masa grasa y D) consumo de alimento por ratón por semana, E) consumo de oxígeno (VO<sub>2</sub>) (mediciones de 24 h desde las 12:00 h hasta las 12:00 h del día siguiente. A las 7:00 h los ratones estaban en ayuno y a las 19:00 h fueron alimentados), F) Temperatura corporal después de una prueba de resistencia al frío durante 6 horas y G) Prueba de tolerancia a la glucosa intraperitoneal en ratones Mas<sup>+/+</sup> y Mas<sup>-/-</sup> alimentados con una dieta de control AIN-93. H) Niveles plasmáticos de Ang-(1-7) en ratones Mas<sup>+/+</sup> y Mas<sup>-/-</sup>. Los datos se presentan como la media ± E.E. Los análisis estadísticos se realizaron mediante la prueba t no pareada (para B, C, D, E, F, G y H), \*p<0.05, \*\*\*p<0.001, n=5.

### 7.5 El tratamiento agudo con captopril induce el *browning* del tejido adiposo blanco en ratones *Mas*<sup>+/+</sup> delgados.

Con la finalidad de evaluar si el captopril induce el *browning* en los ratones C57BL/6 y para determinar la importancia del receptor *Mas* mediante el uso de los ratones *Mas*-knockout (*Mas*<sup>-/-</sup>); ambos grupos de ratones fueron tratados con 5 mg/kg de captopril en el agua de beber durante 24 h, 72 h y 7 días (Figura 17A). Después de 24 h, el tratamiento con captopril indujo rápidamente la expresión de *Ucp1* en el tejido adiposo inguinal de ratones *Mas*<sup>+/+</sup>, como se muestra por una mayor abundancia de ARNm de aproximadamente 6.8 veces. Después de 72 h, la abundancia de ARNm de *Ucp1* fue significativamente mayor, aproximadamente 1.9 veces, en comparación con el grupo tratado con agua. Después de 7 días, no se encontró una diferencia significativa en el nivel de ARNm de *Ucp1* de ratones *Mas*<sup>+/+</sup> tratados con captopril o agua. En contraste, los ratones *Mas*<sup>-/-</sup> no mostraron niveles modificados de ARNm de *Ucp1* en respuesta al captopril en ningún tiempo, lo que confirma que el receptor *Mas* es necesario para inducir *Ucp1* (Figura 17B). Además, se midieron varios genes marcadores de adipocitos beige para determinar si el aumento en la expresión de *Ucp1* estaba asociado con el proceso de *browning*. Los datos demostraron que la expresión de *Prdm16* y los genes marcadores de adipocitos beige, incluidos *Cited1* y *Tbx1*, estaban incrementados en el grupo tratado con captopril en ratones *Mas*<sup>+/+</sup>, pero no en ratones *Mas*<sup>-/-</sup> (Figuras 17C-E). Posteriormente se midió la concentración plasmática de Ang-(1-7) en ambos grupos de ratones tratados con captopril. Se observó un aumento de las concentraciones de Ang-(1-7) en los ratones *Mas*<sup>+/+</sup>, entre un 44% y 84% mayor después de 24 h y 72 h, respectivamente, en comparación con los ratones *Mas*<sup>+/+</sup> tratados con agua. De manera interesante, independientemente del tratamiento con captopril, los ratones *Mas*<sup>-/-</sup> mostraron niveles circulantes elevados de Ang-(1-7) en comparación con los ratones *Mas*<sup>+/+</sup> (Figura 17F). Estos resultados, similares a los observados *in vitro*, sugieren que el efecto del captopril sobre el *browning* del tejido adiposo blanco inguinal está siendo mediado por la Ang-(1-7) cuando se acopla al receptor *Mas*.

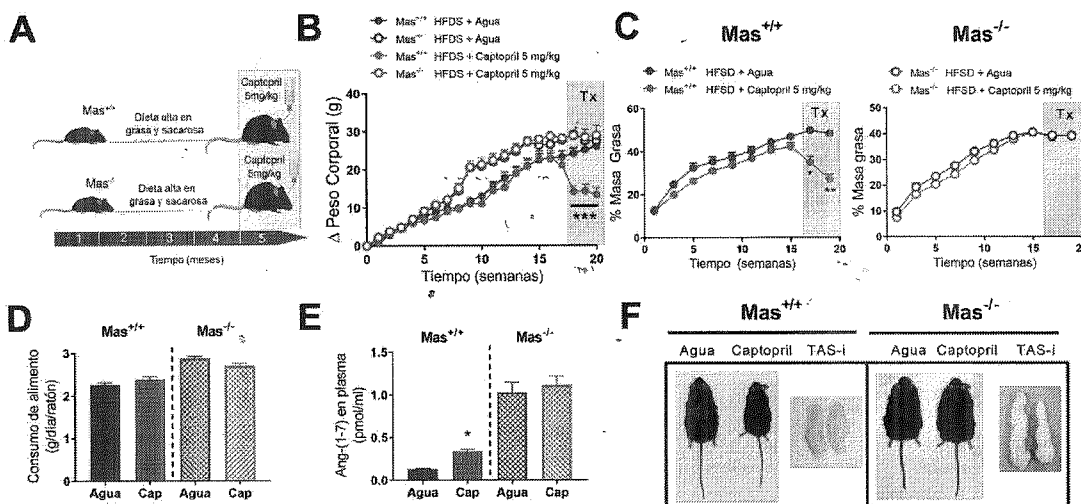


**Figura 17. El captopril induce la expresión de genes termogénicos después del tratamiento agudo en ratones jóvenes.** A) Protocolo del tratamiento agudo con 5 mg/kg de captopril. Expresión del ARNm de B) *Ucp1*, C) *Prdm16*, D) *Cited1*, E) *Tbx1* en ratones *Mas*<sup>+/+</sup> y ratones *Mas*<sup>-/-</sup>. F) Concentraciones plasmáticas de Ang-(1-7) después de los tratamientos agudos con captopril. Los datos representan la media ± E.E. Los análisis estadísticos se realizaron mediante una ANOVA de una vía, *post hoc* Dunnett (para B, C, D E y F), \**p*<0.05, \*\**p*<0.01, \*\*\**p*<0.001, \*\*\*\**p*<0.0001, *n*=5.

### 7.6 El tratamiento crónico con captopril aumenta el gasto energético e induce el *browning* del tejido adiposo inguinal en ratones obesos *Mas*<sup>+/+</sup>.

Los estudios a corto plazo indicaron que el tratamiento con captopril indujo el *browning* del tejido adiposo inguinal, lo que sugiere que en un estudio a largo plazo, el captopril podría reducir el peso corporal y modificar la composición corporal a pesar del consumo de una dieta alta en grasa y sacarosa debido a que el efecto depende del receptor

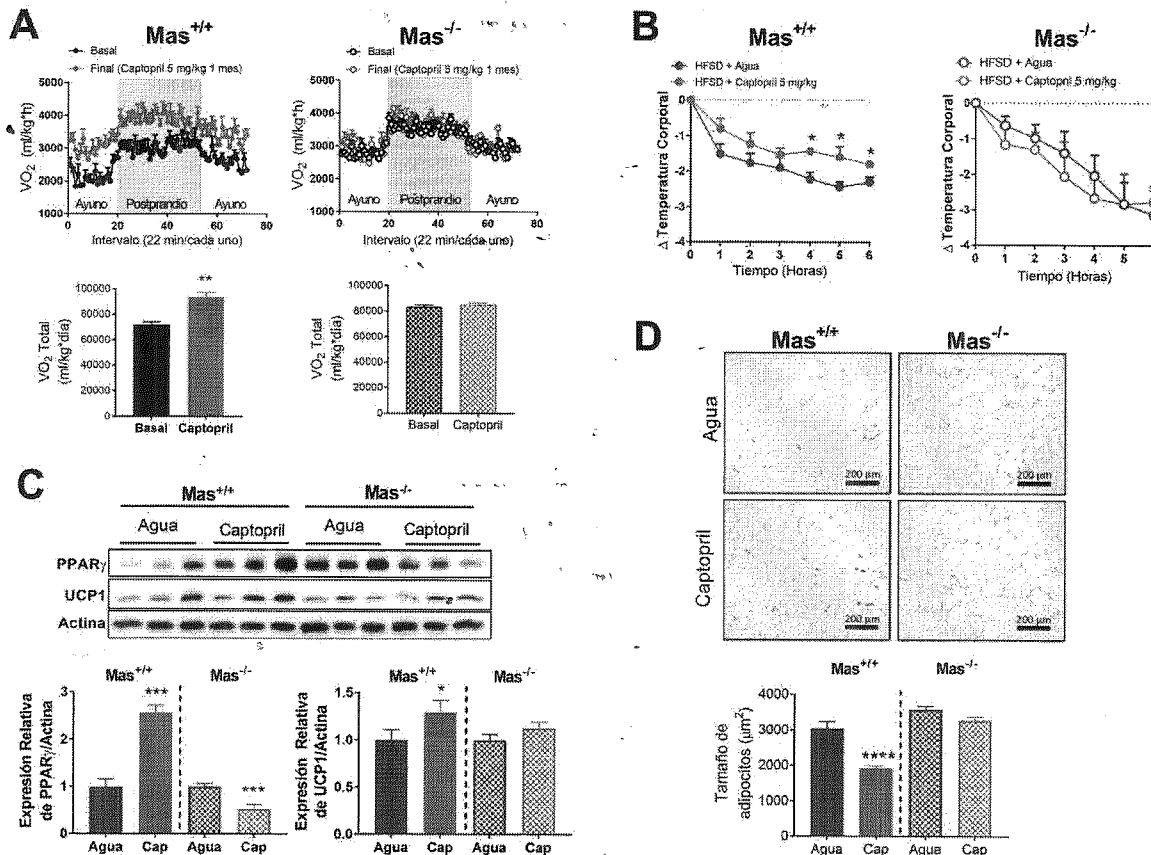
Mas. Para probar esta hipótesis, primero se indujo obesidad con una dieta alta en grasa y sacarosa en ratones  $Mas^{+/+}$  y  $Mas^{-/-}$  (**Figura 18A**). Como se muestra en la **Figura 18B**, hubo un aumento significativo en el peso corporal de los ratones durante la inducción de la obesidad. Después de cuatro meses de consumir una dieta alta en grasa y sacarosa, los ratones fueron tratados durante un mes adicional con 5 mg/kg de captopril mientras se mantenía la dieta experimental. De manera interesante, hubo una disminución marcada en el peso corporal, de aproximadamente el 26%, únicamente en ratones  $Mas^{+/+}$  alimentados con la dieta alta en grasa y sacarosa, mientras que los ratones  $Mas^{-/-}$  no mostraron un peso corporal reducido (**Figura 18B**). Como se esperaba, la reducción del peso corporal de los ratones  $Mas^{+/+}$  estuvo acompañada por una disminución significativa en la masa grasa (**Figura 18C**). Sin embargo, no hubo diferencias significativas en la ingesta de alimento en los ratones obesos  $Mas^{+/+}$  o  $Mas^{-/-}$  tratados con captopril (**Figura 18D**). El tratamiento con captopril en ratones obesos  $Mas^{+/+}$  aumentó los niveles circulantes de Ang-(1-7) aproximadamente 1.53 veces, mientras que en los ratones obesos  $Mas^{-/-}$ , el captopril aumentó la Ang-(1-7) solo en un 9% (**Figura 18E**). Es importante señalar que en los ratones  $Mas^{-/-}$ , los niveles basales de Ang-(1-7) se encontraban elevados aproximadamente 6.8 veces en comparación con los ratones  $Mas^{+/+}$ , lo que indica que este efecto potencialmente compensatorio desencadenado por la falta de receptores Mas fue incapaz de inducir una reducción en el peso corporal. Además, el color del tejido adiposo inguinal era diferente entre los genotipos: el de los ratones  $Mas^{-/-}$  tiene una coloración pálida en comparación con el de los ratones  $Mas^{+/+}$  (**Figura 18F**).



**Figura 18. El tratamiento crónico con captopril disminuye el peso corporal y masa grasa en ratones  $Mas^{+/+}$  obesos.** **A)** Protocolo experimental, **B)** Curso temporal del peso corporal en ratones obesos  $Mas^{+/+}$  y  $Mas^{-/-}$  alimentados con una dieta alta en grasa y sacarosa (HFSD) durante 5 meses (En gris se señala el mes de tratamiento con 5 mg/kg de captopril en el agua de beber). **C)** Curso temporal de la masa magra en ratones obesos  $Mas^{+/+}$  y  $Mas^{-/-}$  alimentados con una dieta HFSD durante 5 meses. **D)** Consumo de alimento por día de los ratones alimentados con dieta HFSD. **E)** Concentración plasmática de Ang-(1-7) en los ratones alimentados con dieta HFSD. **F)** Fenotipo y morfología del tejido adiposo inguinal (TAS-i) de los ratones  $Mas^{+/+}$  y  $Mas^{-/-}$ . Los datos representan la media  $\pm$  E.E. Los análisis estadísticos se realizaron mediante una prueba de t no pareada (para C, D y E), ANOVA de medidas repetidas (para B), \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ,  $n = 5-7$ .

Después de un mes de tratamiento con captopril, los datos revelaron un aumento significativo en el  $VO_2$ , de aproximadamente 31%, en ratones  $Mas^{+/+}$ , lo que indica un alto gasto de energía. En ratones  $Mas^{-/-}$  obesos, el tratamiento con captopril no cambió el nivel de  $VO_2$  (**Figura 19A**). En consecuencia, los ratones obesos  $Mas^{+/+}$

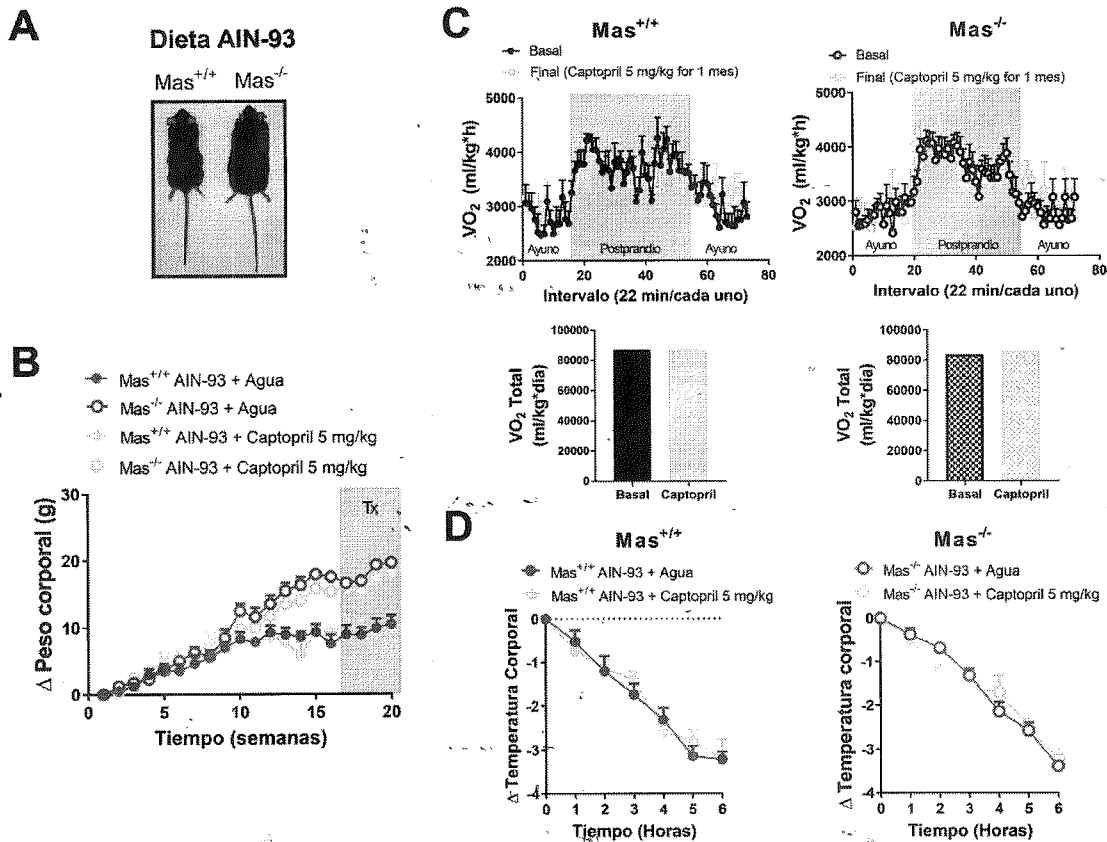
tratados con captopril fueron más resistentes a un ambiente frío que los tratados con agua. No se observó diferencia entre los ratones  $Mas^{-/-}$  obesos tratados con captopril o agua (Figura 19B). Además, independientemente del tratamiento, los ratones  $Mas^{-/-}$  obesos tuvieron una mayor disminución de la temperatura corporal en comparación con los ratones  $Mas^{+/+}$  obesos cuando se expusieron a un ambiente frío (Figura 19B). El análisis de Western blot reveló que el tratamiento con captopril aumentó significativamente la expresión de PPAR $\gamma$  y UCP1 en ratones  $Mas^{+/+}$  obesos en comparación con ratones  $Mas^{-/-}$  obesos (Figura 19C), y los ratones  $Mas^{+/+}$  obesos tratados con captopril tenían adipocitos más pequeños que los ratones  $Mas^{-/-}$  (Figura 19D). Estos resultados indican el potencial papel de la Ang-(1-7), como se muestra a través de los resultados del tratamiento con captopril, para estimular el gasto energético mediante el *browning* del tejido adiposo blanco a través del receptor Mas en ratones obesos.



**Figura 19. El tratamiento crónico con captopril induce el *browning* del tejido adiposo inguinal en ratones  $Mas^{+/+}$  obesos.** **A**) Consumo de oxígeno (VO<sub>2</sub>) de ratones obesos  $Mas^{+/+}$  y  $Mas^{-/-}$  alimentados con dieta HFSD antes y después del tratamiento crónico de 5 mg/kg de captopril en el agua de bebida. **B**) Curso temporal de la prueba de resistencia al frío (4°C) durante 6 horas. **C**) Western blot de PPAR $\gamma$  y UCP1 del tejido adiposo inguinal de ratones  $Mas^{+/+}$  y  $Mas^{-/-}$  tratados con captopril por 1 mes y **D**) Análisis histológico del TAS-i después del tratamiento con captopril. Tinción con hematoxilina y eosina (panel superior) (20x) y tamaño de adipocitos (panel inferior) medido con el programa ImageJ. Los datos representan la media  $\pm$  E.E. Los análisis estadísticos se realizaron mediante una prueba de t pareada (para A), prueba de t no pareada (para C y D) y ANOVA de una vía, *post hoc* Dunnett (para B), \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ ,  $n = 5-7$ .

Sin embargo, con la misma dosis de captopril, los ratones alimentados con la dieta de control AIN-93 no mostraron un cambio significativo en el peso corporal, el gasto de energía o la resistencia al frío entre ambos genotipos, lo que

sugiere que los ratones obesos son más sensibles a este inhibidor de la ECA (**Figura 20A-C**). Es importante señalar que independientemente del consumo de la dieta AIN-93 o el tratamiento con captopril, los ratones *Mas<sup>-/-</sup>* ganaron más peso que los ratones *Mas<sup>+/+</sup>* (**Figuras 20A-B**).



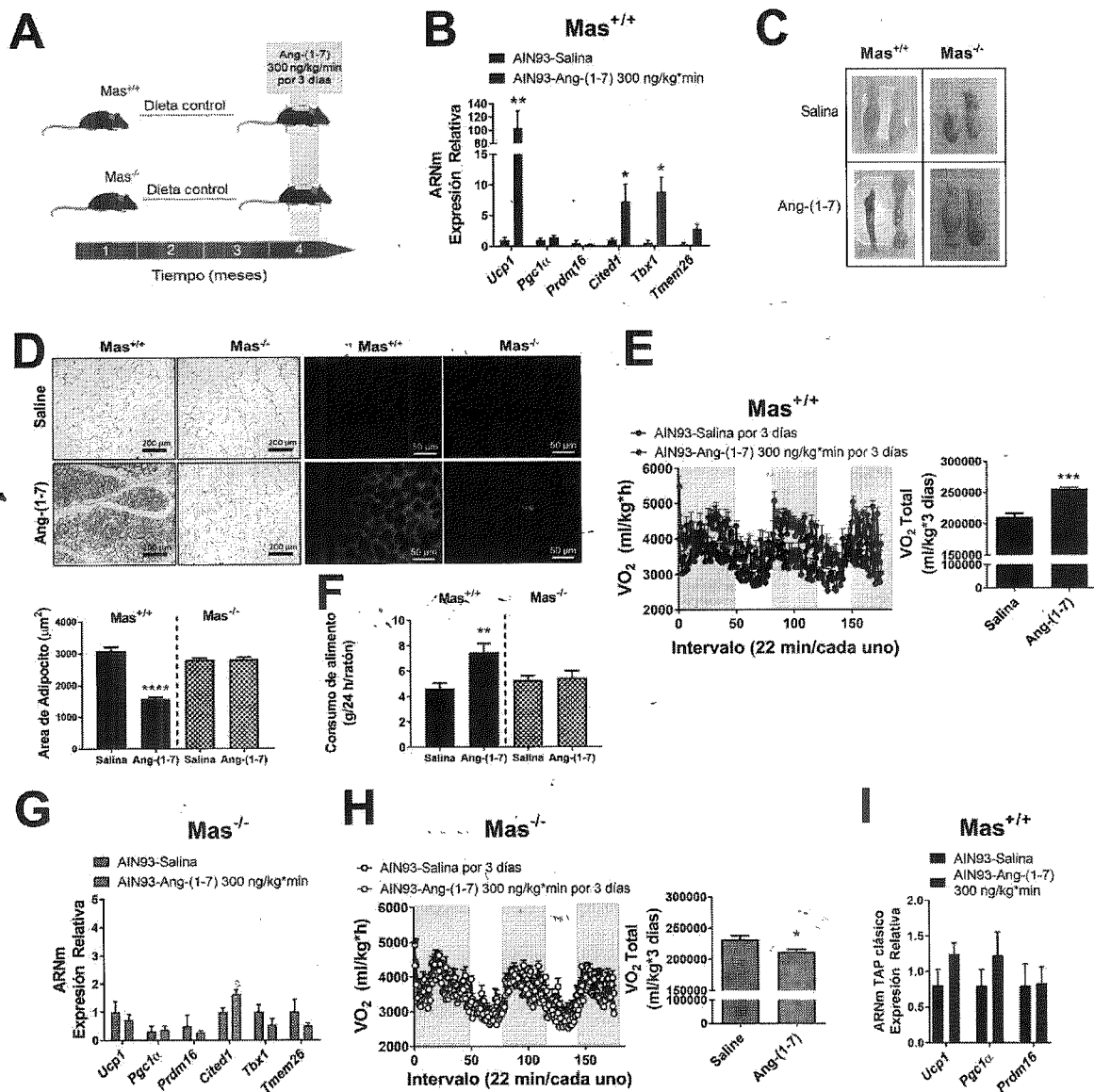
**Figura 20.** El tratamiento crónico con captopril no cambia el peso corporal ni el gasto energético en ratones *Mas<sup>+/+</sup>*. **A)** Foto representativa de ratones *Mas<sup>+/+</sup>* (izquierda) y *Mas<sup>-/-</sup>* (derecha) alimentados con dieta control AIN-93 durante 5 meses. **B)** Curso temporal del incremento de peso corporal ( $\Delta$ ) durante el experimento en ratones *Mas<sup>+/+</sup>* y *Mas<sup>-/-</sup>* alimentados con dieta control AIN-93. El área gris representa el período de tratamiento con 5 mg/kg de captopril o agua durante 1 mes. **C)** Calorimetría indirecta que muestra el consumo de oxígeno ( $VO_2$ ) (panel superior) y el  $VO_2$  total (panel inferior) de ratones *Mas<sup>+/+</sup>* (izquierda) y *Mas<sup>-/-</sup>* (derecha) alimentados con dieta control AIN-93 antes y después de 1 mes de tratamiento con 5 mg/kg de captopril en agua de bebida. **D)** Curso temporal de la prueba de resistencia al frío de ratones *Mas<sup>+/+</sup>* (izquierda) y *Mas<sup>-/-</sup>* (derecha) que fueron expuestos a un ambiente frío (4 °C) durante 6 h. Los datos representan la media  $\pm$  E.E. Los análisis estadísticos se realizaron mediante ANOVA de medidas repetidas (para B y D) o prueba t pareada (para C), n=6.

### 7.7 La infusión aguda de Ang-(1-7) induce el *browning* del tejido adiposo inguinal en ratones *Mas<sup>+/+</sup>* delgados y obesos.

Debido a que el efecto del captopril sobre el *browning* es dependiente del receptor Mas y que la Ang-(1-7) es el ligando natural de este receptor, se diseñaron experimentos con el propósito de demostrar que la Ang-(1-7) es capaz de estimular el *browning* del tejido adiposo inguinal, para ello se infundió el heptapéptido a los ratones delgados *Mas<sup>+/+</sup>* y *Mas<sup>-/-</sup>* mediante bombas mini-osmóticas durante 3 días (**Figura 21A**). Los resultados revelan que la Ang-(1-7) incrementó notablemente la abundancia del ARNm de *Ucp1* y varios marcadores de los adipocitos beige, como *Tbx1*, *Cited1* y *Tmem26* (**Figura 21B**). De hecho, aparecieron áreas de color marrón en el tejido adiposo inguinal, lo que sugiere un mayor *browning* (**Figura 21C**). Además, el análisis histológico del tejido adiposo inguinal reveló que

la Ang-(1-7) cambió la morfología clásica de los adipocitos blancos a adipocitos de apariencia multilocular, que son UCP1<sup>+</sup> y de tamaño menor (**Figura 21D**). De manera interesante, este cambio en el fenotipo no fue estimulado por la Ang-(1-7) en los ratones Mas<sup>-/-</sup> (**Figuras 21C-D**). En consecuencia, se analizó si la inducción del *browning* del tejido adiposo inguinal, particularmente la abundancia elevada de ARNm de *Ucp1*, podría modificar el gasto energético. Los resultados revelaron que la infusión de Ang-(1-7) aumentó significativamente el gasto energético durante el período de infusión de 3 días y, en promedio, hubo un aumento en el consumo de oxígeno de aproximadamente 22% (**Figura 21E**) y fue acompañado de un aumento en el consumo de alimento (**Figura 21F**) para mantener sus requerimientos nutricionales. Por otro lado, cuando se realizaron estos estudios en ratones Mas<sup>-/-</sup>, no hubo un aumento en la abundancia de ARNm de *Ucp1* o marcadores selectivos de adipocitos beige (**Figura 21G**), y este hallazgo fue acompañado por un consumo de oxígeno sin cambios (VO<sub>2</sub>) (**Figura 21H**). También se evaluó la participación del tejido adiposo pardo sobre los efectos termogénicos inducidos por la Ang-(1-7). Los datos revelaron que este péptido no aumentó significativamente la abundancia del ARNm de *Ucp1*, lo que indica que los efectos de la Ang-(1-7) se debieron a la estimulación del *browning* del tejido adiposo inguinal a través del receptor Mas en ratones delgados (**Figura 21I**).

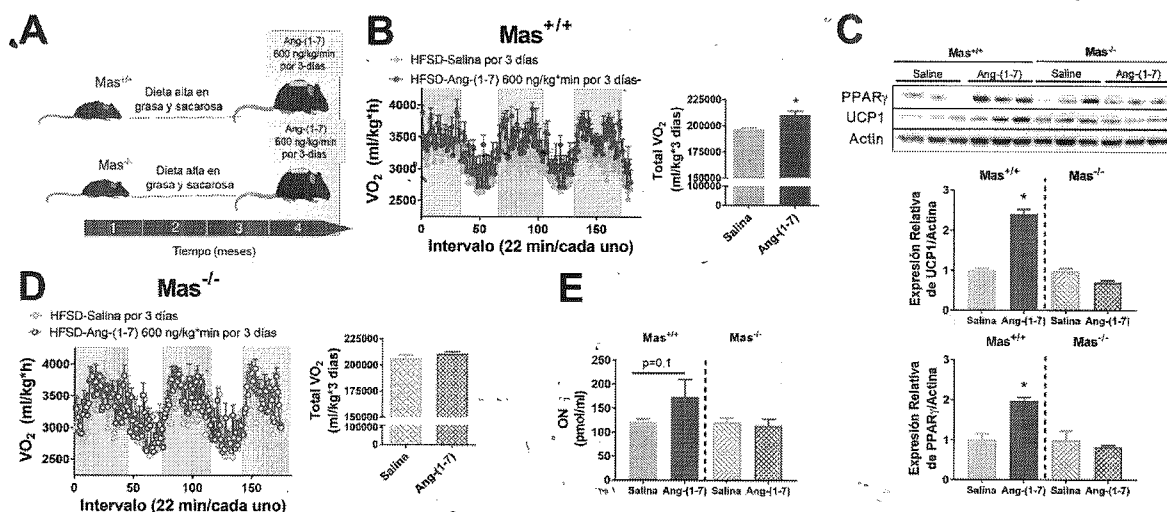
Después de demostrar que la Ang-(1-7) puede inducir el *browning* del tejido adiposo inguinal en ratones delgados y en adipocitos, se evaluó si la Ang-(1-7) induce el *browning* en un modelo de obesidad en ratón. El primer enfoque fue evaluar una infusión aguda de la Ang-(1-7) (3 días) en ratones obesos alimentados con una dieta alta en grasa y sacarosa (**Figura 22A**).



**Figura 21. La infusión aguda (3 días) de Ang-(1-7) induce el *browning* de tejido adiposo inguinal solo en ratones delgados  $Mas^{+/+}$  (Dieta AIN-93). A) Protocolo experimental. B) Análisis de la expresión de genes termogénicos en el tejido adiposo subcutáneo inguinal (TAS-i) de ratones  $Mas^{+/+}$  después de una infusión de 3 días de 300 ng/kg\*min de Ang-(1-7). El vehículo es solución salina. C) Fotos representativas del TAS-i. D) Análisis histológico del TAS-i después de una infusión de 3 días de Ang-(1-7). La tinción con hematoxilina y eosina (panel izquierdo) revela la presencia de adipocitos multiloculares (20x) y el tamaño de adipocitos (panel inferior), los adipocitos UCP1+ teñidos con inmunofluorescencia están en el panel derecho. E) Consumo de oxígeno ( $VO_2$ ) (izquierda) y  $VO_2$  total (derecha) durante la infusión de 3 días de Ang-(1-7) o salina en ratones  $Mas^{+/+}$  (a las 7:00 h los ratones se dejaron en ayuno y a las 19:00 h eran alimentados). F) Ingesta de alimento durante la infusión de 3 días. G) Análisis de la expresión de genes termogénicos en el TAS-i de ratones  $Mas^{-/-}$  después de una infusión de 3 días de Ang-(1-7) o salina. H) Consumo de oxígeno ( $VO_2$ ) (izquierda) y  $VO_2$  total (derecha) durante la infusión de 3 días de Ang-(1-7) o solución salina en ratones  $Mas^{-/-}$  (a las 7:00 h los ratones se dejaron en ayuno y a las 19:00 h eran alimentados). I) Análisis de la expresión de genes termogénicos en el tejido adiposo pardo interescapular (TAP-i) después de la infusión de Ang-(1-7) o salina en ratones  $Mas^{+/+}$ . Los datos representan la media  $\pm$  E.E. Los análisis estadísticos se realizaron mediante una prueba t no pareada (para B, D, E, F, G, H e I). \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ ,  $n = 6$ .**



Los resultados indicaron que la Ang-(1-7) aumentó el gasto energético aproximadamente un 7% en comparación con los ratones tratados con el vehículo (salina) (Figura 22B), y este incremento fue acompañado por un aumento de la expresión de PPAR $\gamma$  y UCP1 (Figura 22C). En contraste, los ratones carentes del receptor Mas no presentaron los efectos inducidos por la Ang-(1-7) sobre la expresión de PPAR $\gamma$  o UCP1 o en el gasto energético (Figuras 22C-D). Por otra parte, existe evidencia sobre la vía de señalización del receptor Mas en las células endoteliales, en la cual se activa la vía de PI3K/AKT/eNOS, por lo tanto, se induce la producción de óxido nítrico (ON) [5]. Adicionalmente, se ha descrito que el ON puede inducir la expresión de genes relacionados con la biogénesis mitocondrial [40] y UCP1 [41]. De manera interesante, los resultados muestran que en el tejido adiposo inguinal de los ratones Mas<sup>+/+</sup>, la infusión aguda de Ang-(1-7) aumenta la producción local de ON, efecto suprimido por la ausencia del receptor Mas (Figura 22E).

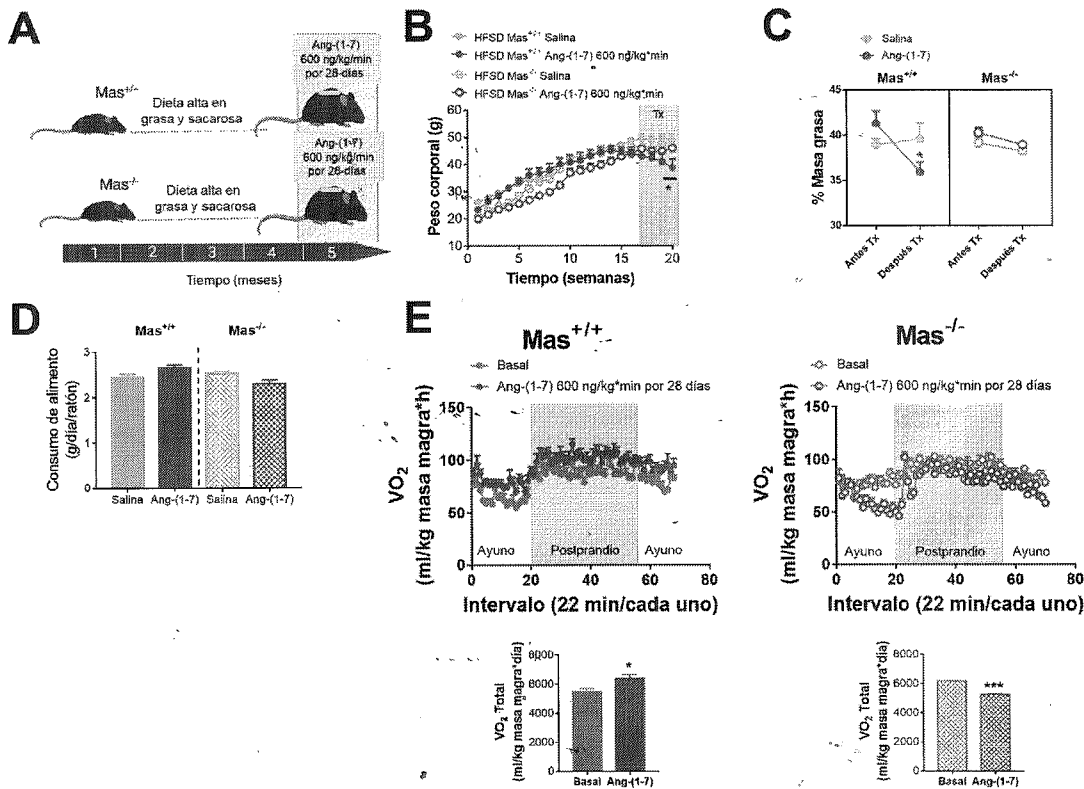


**Figura 22. La infusión aguda (3 días) de Ang-(1-7) induce el *browning* del tejido adiposo inguinal en ratones Mas<sup>+/+</sup> obesos (HFSD).** **A)** Protocolo experimental, **B)** Consumo de oxígeno (VO<sub>2</sub>) (izquierda) y VO<sub>2</sub> total (derecha) durante la infusión de 3 días de 600 ng/kg\*min de Ang-(1-7) o solución salina en ratones obesos Mas<sup>+/+</sup> (a las 7:00 h los ratones se dejaron en ayuno y a las 19:00 h eran alimentados). **C)** Western blot de PPAR $\gamma$  y UCP1 en el tejido adiposo subcutáneo inguinal (TAS-i). **D)** Consumo de oxígeno (VO<sub>2</sub>) (izquierda) y VO<sub>2</sub> total (derecha) durante la infusión de 3 días de Ang-(1-7) o solución salina en ratones obesos Mas<sup>-/-</sup> (a las 7:00 h los ratones se dejaron en ayuno y a las 19:00 h eran alimentados). **E)** Contenido de óxido nítrico en el TAS-i de ratones obesos Mas<sup>+/+</sup> y Mas<sup>-/-</sup>. Los datos representan la media  $\pm$  E.E. Los análisis estadísticos se realizaron mediante una prueba de t no pareada (para B, C, D y E), \*p<0.05, n=5.

### 7.8 La infusión crónica de Ang-(1-7) induce el *browning* del tejido adiposo inguinal en ratones Mas<sup>+/+</sup> obesos.

Los estudios del tratamiento agudo en ratones obesos mostraron que la Ang-(1-7) indujo el *browning* del tejido adiposo inguinal, lo cual sugiere que en un estudio crónico, el péptido podría reducir el peso corporal y modificar la composición corporal a pesar del consumo de una dieta alta en grasa y sacarosa (HFSD). Para probar esta hipótesis, primero se indujo obesidad a los ratones Mas<sup>+/+</sup> y Mas<sup>-/-</sup> durante 5 meses con la dieta HFSD. Como se muestra en la Figura 23B, hubo un aumento significativo en el peso corporal en estos ratones durante la inducción de la obesidad. Posteriormente, la Ang-(1-7) se infundió con bombas osmóticas en los ratones obesos durante los últimos 28 días del experimento (Figura 23A). De manera similar al captopril, la Ang-(1-7) redujo el peso corporal y la grasa

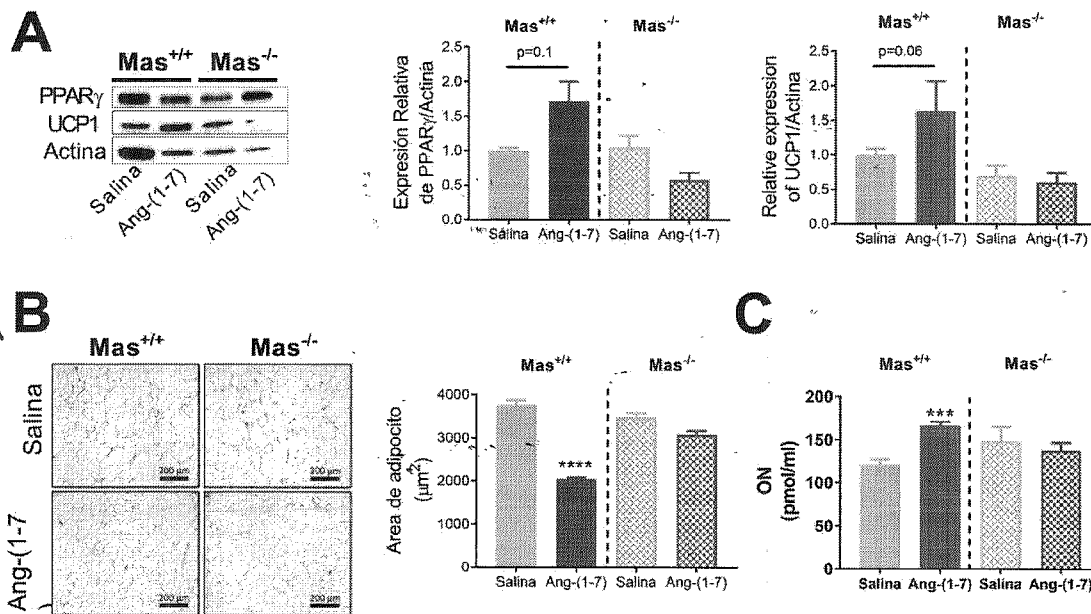
corporal en aproximadamente 14.6% y 13.1%, respectivamente (**Figuras 23B-C**). Sin embargo, la infusión de Ang-(1-7) no pudo modificar el peso corporal en ratones  $Mas^{-/-}$  obesos. Estos resultados ocurrieron sin modificación en la ingesta de alimentos (**Figura 23D**). La disminución en el peso y grasa corporal de los ratones obesos  $Mas^{+/+}$  estuvo acompañada por un aumento en el gasto energético (**Figura 23E**), así como un aumento en la abundancia de PPAR $\gamma$  y UCP1 en el tejido adiposo inguinal (**Figura 24A**).



**Figura 23. La infusión crónica de Ang-(1-7) disminuye el peso corporal y masa grasa en ratones  $Mas^{+/+}$  obesos.** **A)** Protocolo experimental. **B)** Curso temporal del peso corporal (g) durante la inducción de obesidad de ratones  $Mas^{+/+}$  y  $Mas^{-/-}$  alimentados con una dieta alta en grasa y sacarosa (HFSD). El área gris representa el período de tratamiento con 600 ng/kg $\cdot$ min de Ang-(1-7) o solución salina durante 28 días. El vehículo es solución salina. **C)** Porcentaje de masa grasa en ratones obesos  $Mas^{+/+}$  y  $Mas^{-/-}$  antes y después del tratamiento crónico con Ang-(1-7) o solución salina. **D)** Ingesta promedio de alimento (g) al día por ratón. **E)** Calorimetría indirecta que muestra el consumo de oxígeno ( $VO_2$ ) y el  $VO_2$  total de los ratones obesos  $Mas^{+/+}$  (panel izquierdo) y  $Mas^{-/-}$  (panel derecho) antes y después de la infusión crónica de Ang-(1-7), (mediciones de 24 h de 12:00 h a 12:00 h del día siguiente). A las 7:00 h los ratones se dejaron en ayuno y a las 19:00 h eran alimentados). Los datos representan la media  $\pm$  E.E. Los análisis estadísticos se realizaron mediante ANOVA de medidas repetidas seguido de la prueba post-hoc de Dunnett (para B) o la prueba t no pareada (para C y D) y una prueba de t pareada (para E). \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ ,  $n = 5$ . Ver también las **Figuras suplementarias 1, 2 y 3**.

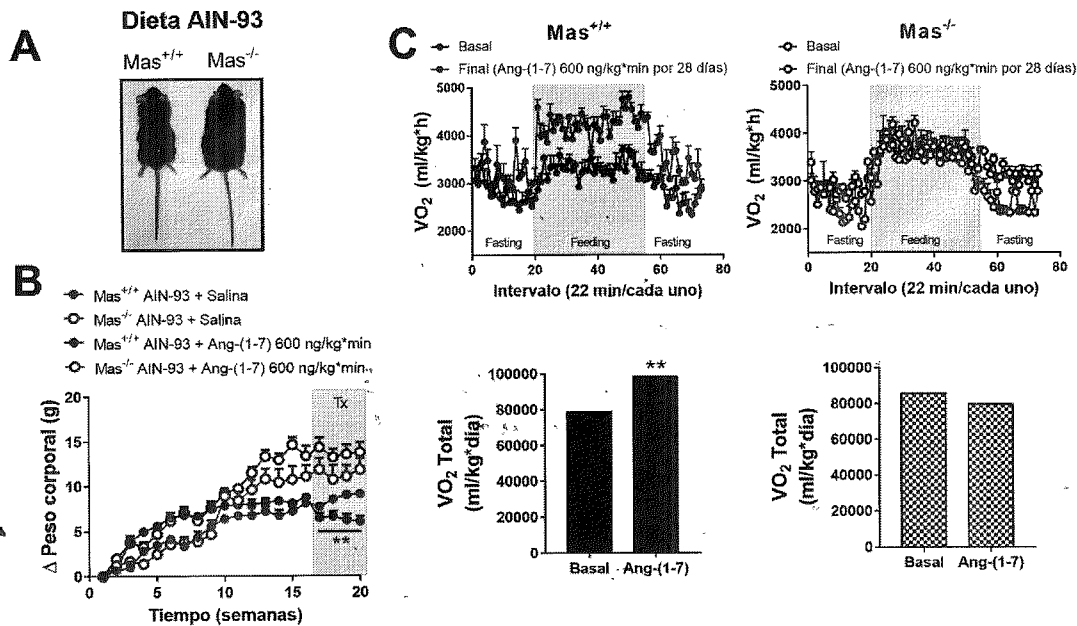
Por otra parte, estos efectos no se observaron en ratones obesos  $Mas^{-/-}$  a pesar de la infusión de Ang-(1-7) (**Figuras 23E, 24A**). Adicionalmente, la producción de  $CO_2$  ( $VCO_2$ ) mostró un patrón similar al consumo de oxígeno ( $VO_2$ ), y los valores del coeficiente de intercambio respiratorio (RER) indicaron que los ratones  $Mas^{+/+}$  tenían una mejor flexibilidad metabólica que los ratones  $Mas^{-/-}$  (**Figuras suplementarias 1 y 2**). El análisis histológico del TAS-i reveló la presencia de adipocitos de menor tamaño frecuentemente observados durante el proceso de *browning* en los ratones tratados con Ang-(1-7) cuyo peso corporal disminuyó (**Figura 24B**). Además, estos ratones presentan una

mejor tolerancia a la glucosa (**Figura suplementaria 3**). Finalmente, se observó un aumento en la cantidad de ON únicamente en los ratones  $Mas^{+/+}$  tratados con Ang-(1-7) (**Figura 24C**). Estos resultados confirman el papel del eje Ang-(1-7)/receptor Mas como un elemento clave en la estimulación del *browning* del tejido adiposo blanco y, por lo tanto, el gasto energético durante la obesidad.



**Figura 24. El tratamiento crónico con Ang-(1-7) induce el *browning* del tejido adiposo inguinal en ratones  $Mas^{+/+}$  obesos.** **A)** Western de PPAR $\gamma$  y UCP1 del tejido adiposo subcutáneo inguinal (TAS-i) de ratones  $Mas^{+/+}$  y  $Mas^{-/-}$  después de la infusión crónica de 600 ng/kg\*min de Ang-(1-7) o solución salina en ratones obesos. **B)** Análisis histológico (panel izquierdo) y tamaño de adipocitos (panel derecho) del TAS-i de ratones  $Mas^{+/+}$  y  $Mas^{-/-}$  después de la infusión crónica de Ang-(1-7) o solución salina. Tinción con hematoxilina y eosina (20x). **C)** Contenido de óxido nítrico en el TAS-i de ratones obesos  $Mas^{+/+}$  y  $Mas^{-/-}$ . Los datos representan la media  $\pm$  E.E. Los análisis estadísticos se realizaron mediante la prueba de t de no pareada (para A, B y C). \*p<0.05; \*\*p<0.01; \*\*\*p<0.001; \*\*\*\*p<0.0001, n=5.

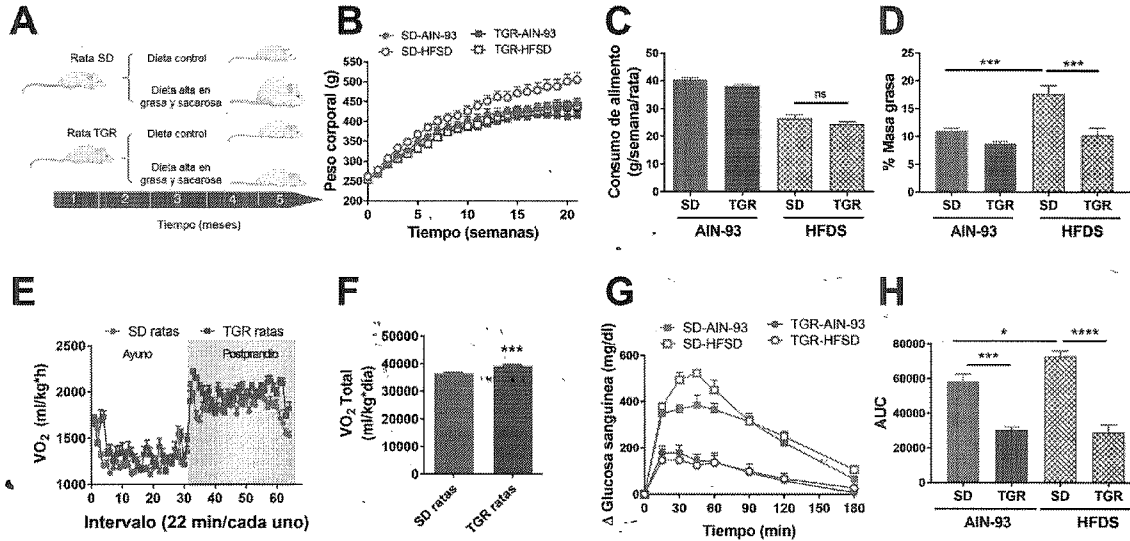
De manera similar a los ratones obesos, los ratones  $Mas^{+/+}$  alimentados con dieta control AIN-93, la infusión crónica de Ang-(1-7) también disminuyó el peso corporal y aumentó el gasto energético. Sin embargo, este efecto no se observó en ratones  $Mas^{-/-}$  (**Figuras 25A-C**).



**Figura 25. El tratamiento crónico con Ang-(1-7) cambia el peso corporal y el gasto energético en ratones Mas<sup>+/+</sup>.** **A)** Foto representativa de ratones Mas<sup>+/+</sup> (izquierda) y Mas<sup>-/-</sup> (derecha) alimentados con dieta control AIN-93 durante 5 meses. **B)** Curso temporal del incremento de peso corporal ( $\Delta$ ) durante el experimento en ratones Mas<sup>+/+</sup> y Mas<sup>-/-</sup> alimentados con dieta control AIN-93. El área gris representa el período de tratamiento con 600 ng/kg\*min de Ang-(1-7) o solución salina durante 28 días. **C)** Calorimetría indirecta que muestra el consumo de oxígeno (VO<sub>2</sub>) (panel superior) y el VO<sub>2</sub> total (panel inferior) de ratones Mas<sup>+/+</sup> (izquierda) y Mas<sup>-/-</sup> (derecha) alimentados con dieta control AIN-93 antes y después de 1 mes de tratamiento con 600 ng/kg\*min de Ang-(1-7) o solución salina durante 28 días. Los datos representan la media  $\pm$  E.E. Los análisis estadísticos se realizaron mediante ANOVA de medidas repetidas (para B) o prueba t pareada (para C). \*p<0.05, \*\*p<0.01, n=6.

### 7.9 La sobreexpresión de Ang-(1-7) promueve la resistencia a la obesidad.

Para evaluar si la sobreexpresión de Ang-(1-7) estimula el *browning* del tejido adiposo blanco (TAB), se utilizaron ratas transgénicas que sobreexpresan Ang-(1-7) (TGR(A1-7)3292) (ratas TGR). Se ha demostrado que las ratas TGR son resistentes a la obesidad (132) y tienen un nivel circulante de Ang-(1-7) que es aproximadamente 2.5 veces mayor que el de las ratas Sprague-Dawley (ratas SD), que son el genotipo *wild-type* (144). Con el objetivo de estudiar el efecto de la Ang-(1-7), las ratas fueron alimentadas con una dieta control AIN-93 o una dieta alta en grasa y sacarosa (HFSD) durante cinco meses (**Figura 26A**). Los datos confirmaron que, al final del tratamiento dietético, las ratas transgénicas alimentadas con una dieta control tuvieron una menor ganancia de peso y grasa corporal en comparación con las ratas SD, aunque la diferencia no alcanzó significancia estadística (**Figura 26B**). De manera interesante, las ratas transgénicas alimentadas con HFSD ganaron significativamente menos peso comparado con las ratas SD a pesar de consumir cantidades similares de alimento (**Figuras 26B-C**). Como consecuencia, las ratas transgénicas tenían un menor porcentaje de grasa corporal que las ratas SD (**Figura 26D**). Estos datos sugerían un aumento en el gasto de energía, por lo que los estudios de calorimetría indirecta mostraron que las ratas transgénicas tienen un mayor consumo de VO<sub>2</sub> en comparación con las ratas SD, con una diferencia de aproximadamente 8% (**Figuras 26E-F**). Además, las ratas transgénicas mostraron una mejor tolerancia a la glucosa que las ratas SD, independientemente de la dieta (**Figuras 26G-H**).

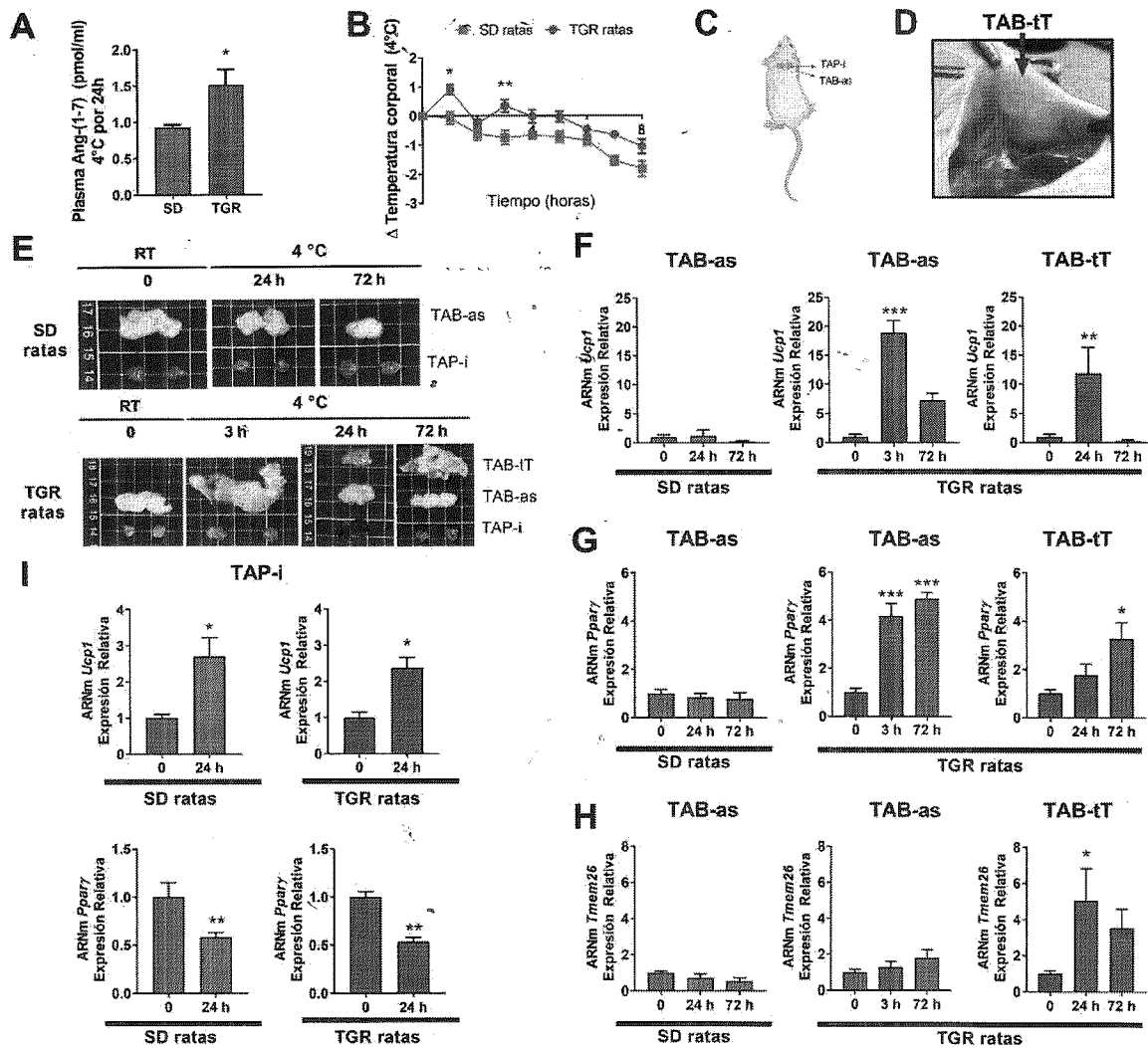


**Figura 26. La sobreexpresión de Ang-(1-7) promueve la resistencia a la obesidad y la formación de nuevo tejido termogénico durante la exposición al frío. A)** Protocolo experimental, **B)** Curso temporal del peso corporal de las ratas transgénicas que sobreexpresan Ang-(1-7) (ratas TGR) y las ratas *wild-type* (ratas SD) alimentadas con dieta AIN-93 y HFSD. **C)** Consumo de alimento por semana de las ratas TGR y SD. **D)** Porcentaje de masa grasa de las ratas TGR y SD. **E y F)** Consumo de oxígeno (VO<sub>2</sub>) de las ratas TGR y SD. **G y H)** Curva de tolerancia a la glucosa de las ratas TGR y SD. Los datos representan la media ± E.E. Prueba de t no pareada (para F), ANOVA de una vía, *post hoc* Tukey (para C, D y H), \**p*<0.05, \*\**p*<0.01, \*\*\**p*<0.001, \*\*\*\**p*<0.0001, *n*=6-7.

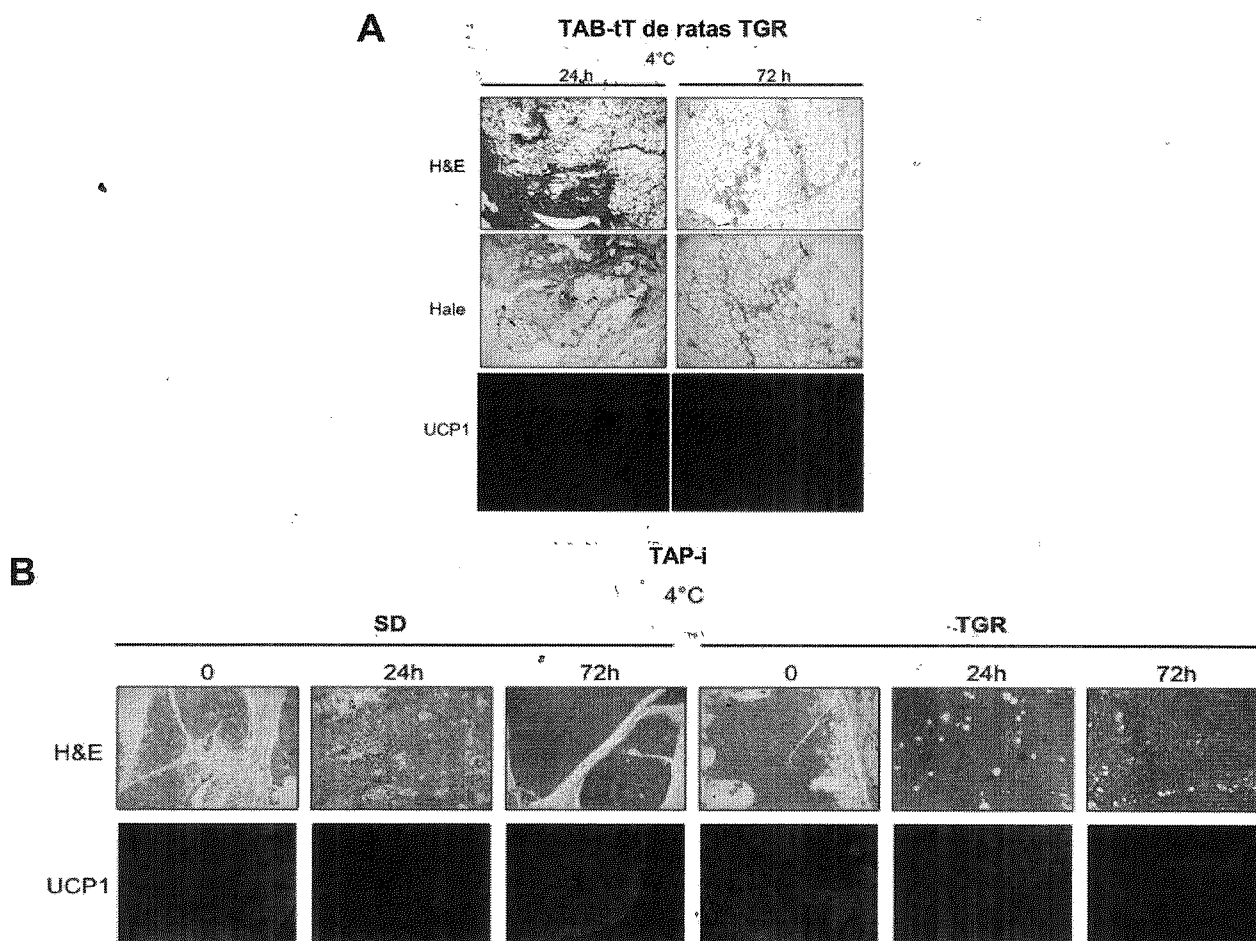
### 7.10 Las ratas transgénicas que sobreexpresan Ang-(1-7) forman un nuevo tejido termogénico dorsal durante la exposición al frío.

La evidencia sugiere que la sobreproducción de Ang-(1-7) aumentó la capacidad termogénica de las ratas transgénicas. Por lo tanto, se estudió si las ratas que sobreexpresan Ang-(1-7) pueden mantener la temperatura corporal durante la exposición a temperaturas frías. Los resultados mostraron que las ratas transgénicas son significativamente más resistentes a la temperatura fría en comparación con las ratas *wild-type* (ratas SD) (**Figuras 27A-B**). De manera inesperada, después de 24 h de exposición al frío, solo las ratas transgénicas mostraron la presencia de un tejido adiposo blanco termogénico transitorio dorsal (TAB-tT), que no se observó después de 3 h de exposición al frío. Este TAB termogénico transitorio se localizó por encima del tejido adiposo blanco que rodea al TAP-i, comúnmente conocido como tejido adiposo blanco anterior subcutáneo (TAB-as) (**Figuras 27C-D**). De manera interesante, el análisis histológico reveló que este tejido está enriquecido de matriz extracelular, particularmente tiene un alto contenido de ácido hialurónico, de acuerdo con la tinción coloidal de hierro de Hale, y también se encuentra constituido por adipocitos (**Figura 28A**). Esto sugiere que el proceso de *browning* fue activado rápidamente por la Ang-(1-7) ya que el análisis de la expresión de marcadores termogénicos reveló que el TAB-as de las ratas TGR tenía una elevación significativa de la abundancia del ARNm de *Ucp1* después de 3 h de exposición al frío, que se acompañó con un aumento de *Pparγ* (**Figuras 27F-G**). En el tejido subcutáneo inguinal (TAS-i) no hubo cambios significativos en cuanto a la expresión de genes termogénicos. Después de 24 h de exposición al frío, se derivó una matriz extracelular del TAB-as, pero alguna porción permaneció termogénica como TAB-tT. Este tejido que tiene alto contenido de matriz extracelular, a su vez contiene adipocitos embebidos que mantienen una alta

expresión de *Ucp1* y *Tmem26* (Figuras 27F, 27H). A las 72 h, el área de la matriz extracelular estaba ocupada principalmente por adipocitos con alta expresión de *Pparγ* (Figuras 27E, 27G) y células positivas para UCP1 (Figura 28A). Es importante destacar que ninguno de estos efectos se observó en las ratas *wild-type* (ratas SD). Adicionalmente, se evaluó la contribución del TAP-i al fenotipo termogénico inducido por la Ang-(1-7) y el frío. De manera esperada, se observó que en las ratas SD y TGR, hubo un aumento en el ARNm de *Ucp1* de aproximadamente 1.7 y 1.4 veces, respectivamente, en comparación con las ratas expuestas a temperatura ambiente. Sin embargo, este aumento no fue significativamente diferente entre los dos genotipos de ratas (Figura 27I). Además, la presencia de adipocitos multiloculares y células positivas para UCP1 en el tejido adiposo pardo (TAP-i) fue evidente después de 24 h y 72 h de exposición al frío en comparación con los expuestos a temperatura ambiente. Sin embargo, los cambios en las ratas SD y TGR fueron similares (Figura 28B). Este hallazgo indica que, aunque el TAP-i puede contribuir al aumento de la termogénesis de manera similar en ambos grupos, el fenotipo observado en las ratas TGR para el metabolismo de la glucosa y la capacidad termogénica se asoció principalmente con el *browning* del tejido adiposo blanco. Por lo tanto, estos resultados respaldan el papel de la Ang-(1-7) como un agente termogénico capaz de inducir el *browning* del tejido adiposo blanco y, por lo tanto, el gasto energético.



**Figura 27. La sobreexpresión de Ang-(1-7) promueve la formación de nuevo tejido termogénico durante la exposición al frío.** **A)** Prueba de resistencia al frío (4°C) de las ratas TGR y SD. **B)** Concentración plasmática de Ang-(1-7) en las ratas expuestas al frío por 24 h. **C, D y E)** Formación de tejido adiposo blanco termogénico transitorio dorsal (TAB-tT) y tejido adiposo blanco anterior subcutáneo (TAB-as) que rodea al tejido pardo interescapular (TAP-i) después de una exposición al frío de 3h, 24h y 72h en las ratas TGR. **F, G y H)** Expresión de genes termogénicos en diferentes depósitos de grasa de las ratas TGR y SD durante la exposición al frío de 3, 24 y 72h. **I)** Expresión de genes termogénicos del TAP-i de las ratas TGR y SD sometidas al ambiente frío. Los datos representan la media ± E.E. Prueba de t no pareada (para A, I), ANOVA de una vía, *post hoc* Dunnett (para F, G y H), ANOVA de una vía, *post hoc* Tukey (para B), \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001, \*\*\*\*p<0.0001, n=6-7.



**Figura 28. La exposición al frío induce un tejido adiposo blanco termogénico transitorio UCP1<sup>+</sup> (TAB-tT) en ratas TGR.** **A)** Datos representativos del análisis histológico del tejido adiposo blanco termogénico transitorio (TAB-tT) de ratas TGR después de 24 y 72 h de exposición al frío (4 °C). Tinción de hematoxilina y eosina, tinción de hierro coloidal de Hale y expresión de UCP1 por inmunofluorescencia (40x). La tinción con hierro coloidal mostró que este tejido está compuesto por una matriz extracelular que consiste principalmente en ácido hialurónico con adipocitos embebidos. **B)** Datos representativos del análisis histológico del tejido adiposo pardo interescapular (TAP-i) de ratas SD y ratas TGR después de 24 h y 72 h de exposición al frío (4 °C). Tinción con hematoxilina y eosina (20x) y expresión de UCP1 por inmunofluorescencia (40x). n=6-7.

## 8. DISCUSIÓN

La obesidad es una condición que aumenta el riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares y diabetes tipo 2 (141). Es un problema de salud que no solamente se presenta a nivel nacional, sino que ha escalado a nivel mundial (104). La terapéutica de la obesidad se encuentra muy limitada dado que las estrategias actualmente aprobadas participan principalmente en dos niveles: i) a nivel del sistema nervioso central, inhibiendo los mecanismos que controlan el apetito, tales como la lorcaserina, la fentermina/topiramato, etc.); o bien ii) a nivel intestinal, inhibiendo la absorción de grasas, como el orlistat (152). Sin embargo, si retomamos la definición de obesidad de la OMS como la acumulación excesiva de grasa que puede alterar la salud (104), notamos que no existe una estrategia seria que vaya dirigida hacia el tejido adiposo, el cual es un factor fundamental en los mecanismos que subyacen a las comorbilidades asociadas a la obesidad. En este sentido, la termogénesis del tejido adiposo es una estrategia potencial que resulta atractiva para tratar la obesidad y los trastornos metabólicos (141).

Un nuevo candidato en esta estrategia es el SRA, que históricamente ha sido reconocido como un mosaico de factores conectados que mantienen la perfusión tisular (151), pero en la actualidad también se ha identificado que tiene un papel en la fisiología de los adipocitos (129). En particular, en el presente estudio utilizando aproximaciones *in vitro* e *in vivo*, se demostró que la Ang-(1-7), un componente del SRA, a través del receptor Mas, induce la diferenciación de adipocitos beige en el tejido adiposo blanco que aumenta la termogénesis.

En los últimos años se ha sugerido que los compuestos que afectan al SRA, como la Ang-(1-7) y el captopril, que es un fármaco antihipertensivo que inhibe a la ECA, podrían reducir el peso corporal en modelos murinos (123, 124, 126, 131, 133). Sin embargo, no está claro el mecanismo que explique este efecto benéfico. Por otra parte, en los últimos años, se especuló que el *browning* del tejido adiposo blanco podría generarse a través del receptor AT<sub>2</sub> tras la unión de Angiotensina II (153) o por una vía independiente de UCP1 estimulada por la Ang-(1-7) (140). Sin embargo, la información presentada aún es muy incipiente. Para estudiar en detalle los efectos de la Ang-(1-7) sobre el *browning* del tejido adiposo blanco, inicialmente se utilizó al captopril, como una estrategia experimental para incrementar las concentraciones de Ang-(1-7) (115, 138), tomando en cuenta que los adipocitos expresan todos los componentes del SRA (127-129).

Los primeros experimentos demostraron que el captopril incrementa la expresión de genes termogénicos e incrementa la respiración mitocondrial en adipocitos derivados de la fracción estromal vascular. Además se pudo notar la participación del eje Ang-(1-7)/receptor Mas debido a que los efectos se inhibieron en las células carentes del receptor Mas. Posteriores estudios *in vivo* demostraron que el tratamiento agudo con captopril indujo la expresión de *Ucp1* y genes marcadores de adipocitos beige de manera dependiente del receptor Mas. Posteriormente, este tratamiento se administró en un modelo de obesidad en ratón y los efectos metabólicos benéficos del *browning* aún se observaron sin cambiar el consumo de alimento. Para comenzar a disectar el mecanismo del captopril, se debe tomar en cuenta que los ratones tratados con el fármaco presentaban una mayor cantidad de Ang-(1-7) circulante y que el efecto era dependiente del receptor Mas, debido a que en los ratones Mas<sup>-/-</sup> no se observaron cambios. Por lo tanto, el efecto del captopril sobre el *browning* del tejido adiposo blanco está mediado por el eje Ang-(1-7)/receptor Mas.



Después de obtener los resultados con el tratamiento de captopril, se diseñaron experimentos administrando directamente la Ang-(1-7) sobre los adipocitos derivados de la fracción estromal vascular. Inicialmente se encontró que la Ang-(1-7) indujo la expresión de genes termogénicos y aumentó la respiración mitocondrial de los adipocitos Mas<sup>+/+</sup>. Hasta el momento se ha reportado que las acciones de la Ang-(1-7) están mediadas por el receptor Mas (109, 111-114, 116, 117). De hecho, en los adipocitos Mas<sup>-/-</sup> no se presentaron los efectos de la Ang-(1-7), lo que demuestra que el efecto de activar la termogénesis estuvo mediado por la interacción entre Ang-(1-7) y el receptor Mas. Esta evidencia se confirmó *in vivo* en ratones Mas<sup>+/+</sup> delgados infundidos con Ang-(1-7) durante 3 días, se incrementó su gasto energético y la expresión de genes termogénicos en el tejido adiposo blanco inguinal. Estos resultados mostraron que la Ang-(1-7) aumenta la termogénesis a través del *browning* del tejido adiposo blanco a través del receptor Mas sin una contribución significativa de la termogénesis del tejido adiposo pardo clásico (TAP-i). Morimoto y col. sugirieron que la Ang-(1-7) activa al TAP; sin embargo, en el presente estudio no se encontró una tendencia significativa que lo confirme (140). Es importante notar que durante la infusión de 3 días, la ingesta de alimento solo aumentó en los ratones Mas<sup>+/+</sup> infundidos con Ang-(1-7). Al parecer, la inducción rápida del *browning* y, por lo tanto, la termogénesis induce un estado de equilibrio energético negativo y, por lo tanto, los ratones contrarrestan su ingesta de alimento aumentando sus necesidades nutricionales de energía durante el corto período de tiempo.

Por otra parte, aunque algunos estimuladores del *browning* ejercen sus efectos por estimulación neural en el tejido adiposo (154), en la actualidad nuestros estudios *in vitro* demuestran que la Ang-(1-7) activa directamente el *browning*. Dado que no hay evidencia del papel de este péptido en la termogénesis inducida por a nivel neural (155), se necesitan más estudios para analizar si la Ang-(1-7) podría seguir este mecanismo.

El año 2009 marcó el inicio de una era en el campo de estudio de la termogénesis, debido a que fue el año en el que se publicaron una serie de artículos donde se reporta el descubrimiento del tejido adiposo pardo funcional en adultos (13-15). Desde ese año se han realizado numerosos esfuerzos por tratar de comprender la termogénesis y el *browning* del tejido adiposo blanco a nivel molecular. Sin embargo, aún no se conocen los mecanismos relacionados con la inducción, activación y regulación de adipocitos beige, así como su origen, ya sea por diferenciación *de novo* o transdiferenciación. En este sentido, existe poca información acerca del mecanismo del efecto que ejerce la Ang-(1-7) a través del receptor Mas. La mayor parte de la investigación sobre la vía de señalización del receptor Mas se ha centrado principalmente en las células endoteliales.

La evidencia ha demostrado que el receptor Mas es un receptor acoplado a una proteína G que activa la vía PI3K/AKT, lo que conlleva a la activación de la sintasa de óxido nítrico endotelial. En consecuencia, se ha demostrado que hay un aumento en la producción de óxido nítrico, el cual participa en la activación de la vía de la guanilato ciclasa (GC)/GMPc/proteína quinasa G (PKG) (113, 156, 157). De hecho, esta vía se ha descrito tanto en el tejido adiposo blanco como en el tejido adiposo pardo (158-160), y se ha demostrado que la falta de GMPc conduce a la regulación negativa de los marcadores termogénicos UCP1 y PPAR $\gamma$ , y a una disminución de la abundancia mitocondrial (158). No obstante, aún se desconoce cómo interactúa esta vía con el promotor del gen *Ucp1* para activar su transcripción. En nuestro estudio, la infusión de Ang-(1-7) aumentó la producción endógena de óxido

nítrico en el TAS-i de los ratones Mas<sup>+/+</sup>, mientras que este efecto estuvo ausente en los ratones carentes de Mas. Los hallazgos del presente trabajo sugieren que la Ang-(1-7) estimula el *browning* del tejido adiposo blanco a través del óxido nítrico vía el receptor Mas. Sin embargo, se requieren más estudios para establecer el control transcripcional del gen *Ucp1* por esta vía.

Los pacientes candidatos para el uso de agentes que inducen el *browning* son sujetos con sobrepeso y obesidad. Se ha descrito tanto en modelos animales como en humanos que la obesidad conduce a resistencia a la insulina, hiperlipidemia y algunas otras comorbilidades (161, 162). En el presente estudio, se demostró en un modelo de obesidad inducida por la dieta, que la infusión crónica de Ang-(1-7) redujo el peso corporal y la grasa corporal, aumentó los niveles de VO<sub>2</sub> y la expresión de UCP1 en el tejido adiposo inguinal de ratones Mas<sup>+/+</sup> obesos. De hecho, se conoce que un aumento en los niveles de Ang-(1-7) se asocia con una mejora en la sensibilidad a la insulina y con el metabolismo de la glucosa y los lípidos (131). Por lo tanto, se evaluó el efecto de la sobreexpresión de Ang-(1-7) circulante en un modelo de rata transgénica.

Las ratas transgénicas que sobreexpresan Ang-(1-7) resultaron ser resistentes al desarrollo de obesidad inducida por dieta, como se ha reportado anteriormente (131, 132). Además, las ratas transgénicas son más tolerantes a la glucosa, tienen mayor gasto energético, menos grasa corporal y una mayor resistencia a los ambientes fríos. De manera inesperada, las ratas transgénicas desarrollaron un tejido mixoide después de 24 h de exposición al frío localizado en la sección dorsal sobre el área interescapular, encima del tejido adiposo blanco anterior subcutáneo. Este tejido, al que nombramos como tejido adiposo blanco transitorio termogénico, se encuentra enriquecido por *Ucp1* y *Tmem26*, pero su fenotipo es notablemente diferente al del tejido adiposo pardo. El análisis microscópico reveló que a las 24 h el tejido termogénico transitorio contenía adipocitos con alta capacidad termogénica embebidos en grandes áreas de matriz extracelular con espacios vacíos, a las 72 h todos los espacios estaban ocupados por adipocitos, lo cual coincide con el incremento en la expresión de *Pparγ* a medida que transcurre el tiempo. Cabe señalar que *Pparγ* es el principal factor que controla la adipogénesis (163). En este sentido, pudimos observar el curso temporal de la génesis de nuevo tejido adiposo termogénico que únicamente ocurre en las ratas transgénicas que sobreexpresan Ang-(1-7) con exposición al frío. En contraste, este efecto no se observó en ratas *wild-type*. Es desconocido el mecanismo que explique la inducción rápida de un tejido altamente termogénico en las ratas transgénicas, pero este hallazgo aumenta las evidencias que fundamentan el potencial uso de la Ang-(1-7) como agente terapéutico que induce el *browning*. Es importante señalar que la exposición al frío contribuyó al aumento de la capacidad termogénica del tejido adiposo pardo, tanto en las ratas *wild-type* como en las ratas transgénicas, en un grado similar, lo que indica que esta contribución es independiente del nivel de Ang-(1-7).

Hasta la fecha no se han reportado estudios asociados con el uso de la Ang- (1-7) como agente para controlar el peso corporal en humanos. Es importante destacar que los tratamientos evaluados en el presente trabajo, es decir, el captopril y la Ang-(1-7) aún fueron capaces de activar el *browning* en el modelo de obesidad inducido por una dieta alta en grasa y sacarosa.

Finalmente, es de gran interés encontrar nuevas moléculas que activen la termogénesis, ya que este proceso, caracterizado por un mayor gasto de energía, podría ser benéfico para el tratamiento de la obesidad (12, 164). Estos

resultados sugieren el uso de la Ang-(1-7) como un agente que aumenta la termogénesis y de esta manera, prevenir o reducir la obesidad. Sin embargo, se necesitan estudios clínicos que demuestren el efecto global de este péptido en humanos, y otros para estudiar si el efecto se puede sostener en el tiempo.

## 9. CONCLUSIONES

- ❖ Este estudio demuestra que la Angiotensina-(1-7), vía el receptor Mas, es un inductor de adipocitos beige en el tejido adiposo blanco. Se ha proporcionado evidencia experimental que demuestra que la Ang-(1-7) aumenta la expresión de genes marcadores de la termogénesis y aumenta la respiración mitocondrial en adipocitos derivados de la fracción estromal vascular del tejido adiposo blanco. Además, una infusión aguda de Ang-(1-7) aumenta el gasto de energía y la expresión de genes marcadores de adipocitos beige en el tejido adiposo subcutáneo inguinal de ratones.
- ❖ Este estudio demuestra que el eje Ang-(1-7)/receptor Mas cumple una función muy importante en la fisiología del adipocito debido a que la falta del receptor Mas genera un fenotipo de ratón obeso y con un metabolismo disfuncional. En contraste, las ratas transgénicas que sobreexpresan la Ang-(1-7) no incrementan el peso corporal y tienen mejor función metabólica a pesar de una dieta alta en grasa y sacarosa.
- ❖ Los datos sugieren que el captopril induce sus efectos al incrementar la respiración mitocondrial y los marcadores termogénicos de adipocitos derivados de la fracción estromal vascular, y al reducir el peso, grasa corporal y al activar el *browning* del tejido adiposo inguinal de ratones a través del eje Ang-(1-7)/receptor Mas.
- ❖ Los resultados del presente estudio proponen que la capacidad de *browning* se reduce en individuos con obesidad. Por lo tanto, resulta muy interesante que la Ang-(1-7) aún sea capaz de inducir el *browning* en ratones obesos después de un tratamiento agudo y crónico, aunque el efecto sea más evidente en ratones delgados.
- ❖ Los resultados muestran que las ratas transgénicas que tienen una mayor cantidad de Ang-(1-7) circulante (ratas TGR) son resistentes a la obesidad inducida por dieta. Los datos presentados en este estudio también demuestran que las ratas TGR tienen menor peso corporal, menor masa grasa y tienen mejor tolerancia a la glucosa en comparación con las ratas *wild-type* después de cinco meses de dieta alta en grasa y sacarosa. Estos efectos podían ser una consecuencia de la inducción del *browning*, debido a que las ratas TGR presentan un mayor gasto energético. De hecho, se demostró que únicamente las ratas TGR tienen la capacidad de formar un nuevo tejido adiposo blanco termogénico ubicado en la misma zona donde se encuentra el tejido adiposo pardo interescapular después de 24 h de exposición al frío.

- ❖ En conjunto, los datos presentados en este estudio demuestran que la Ang-(1-7) es un candidato potencial para el tratamiento de la obesidad. Sin embargo, se necesitan estudios en humanos para estudiar la relevancia del proceso y si el efecto persiste a lo largo del tiempo.

## 10. REFERENCIAS

1. Gessner, K. (1551) *Gesneri medici Tigurine Historiae Animalium. De Quadrupedibus viviparis*
2. Smalley, R. L., and Dryer, R. L. (1963) Brown fat: thermogenic effect during arousal from hibernation in the bat. *Science* **140**, 1333-1334
3. Smith, R. E., and Hock, R. J. (1963) Brown fat: thermogenic effector of arousal in hibernators. *Science* **140**, 199-200
4. Nedergaard, J., and Lindberg, O. (1979) Norepinephrine-stimulated fatty-acid release and oxygen consumption in isolated hamster brown-fat cells. Influence of buffers, albumin, insulin and mitochondrial inhibitors. *Eur J Biochem* **95**, 139-145
5. Cannon, B., and Nedergaard, J. (1985) The biochemistry of an inefficient tissue: brown adipose tissue. *Essays Biochem* **20**, 110-164
6. Nicholls, D. G., and Locke, R. M. (1984) Thermogenic mechanisms in brown fat. *Physiol Rev* **64**, 1-64
7. Klingenspor, M., Fromme, T., Hughes, D. A., Jr., Manzke, L., Polymeropoulos, E., Riemann, T., Trzcionka, M., Hirschberg, V., and Jastroch, M. (2008) An ancient look at UCP1. *Biochim Biophys Acta* **1777**, 637-641
8. Divakaruni, A. S., and Brand, M. D. (2011) The regulation and physiology of mitochondrial proton leak. *Physiology (Bethesda)* **26**, 192-205
9. Hanna, C. B., Fleming, J., Jeffords, V., and Hull, D. C. (1966) A survey of smoking among the students of Spartanburg County, S. C. *J S-C Med Assoc* **62**, 362-363
10. Inagaki, T., Sakai, J., and Kajimura, S. (2016) Transcriptional and epigenetic control of brown and beige adipose cell fate and function. *Nat Rev Mol Cell Biol* **17**, 480-495
11. Wang, W., and Seale, P. (2016) Control of brown and beige fat development. *Nat Rev Mol Cell Biol* **17**, 691-702
12. Vargas-Castillo, A., Fuentes-Romero, R., Rodriguez-Lopez, L. A., Torres, N., and Tovar, A. R. (2017) Understanding the Biology of Thermogenic Fat: Is Browning A New Approach to the Treatment of Obesity? *Arch Med Res* **48**, 401-413
13. Cypess, A. M., Lehman, S., Williams, G., Tal, I., Rodman, D., Goldfine, A. B., Kuo, F. C., Palmer, E. L., Tseng, Y. H., Doria, A., Kolodny, G. M., and Kahn, C. R. (2009) Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans. *N Engl J Med* **360**, 1509-1517
14. van Marken Lichtenbelt, W. D., Vanhommerig, J. W., Smulders, N. M., Drossaerts, J. M., Kemerink, G. J., Bouvy, N. D., Schräuwen, P., and Teule, G. J. (2009) Cold-activated brown adipose tissue in healthy men. *N Engl J Med* **360**, 1500-1508
15. Virtanen, K. A., Lidell, M. E., Orava, J., Heglind, M., Westergren, R., Niemi, T., Taittonen, M., Laine, J., Savisto, N. J., Enerback, S., and Nuutila, P. (2009) Functional brown adipose tissue in healthy adults. *N Engl J Med* **360**, 1518-1525

16. Harms, M., and Seale, P. (2013) Brown and beige fat: development, function and therapeutic potential. *Nat Med* **19**, 1252-1263
17. Heaton, J. M. (1972) The distribution of brown adipose tissue in the human. *J Anat* **112**, 35-39
18. Lidell, M. E., Betz, M. J., Dahlqvist Leinhard, O., Heglind, M., Elander, L., Slawik, M., Mussack, T., Nilsson, D., Romu, T., Nuutila, P., Virtanen, K. A., Beuschlein, F., Persson, A., Borga, M., and Enerback, S. (2013) Evidence for two types of brown adipose tissue in humans. *Nat Med* **19**, 631-634
19. Aldiss, P., Davies, G., Woods, R., Budge, H., Sacks, H. S., and Symonds, M. E. (2017) 'Browning' the cardiac and peri-vascular adipose tissues to modulate cardiovascular risk. *Int J Cardiol* **228**, 265-274
20. Bartelt, A., and Heeren, J. (2014) Adipose tissue browning and metabolic health. *Nat Rev Endocrinol* **10**, 24-36
21. Busiello, R. A., Savarese, S., and Lombardi, A. (2015) Mitochondrial uncoupling proteins and energy metabolism. *Front Physiol* **6**, 36
22. Hull, D. (1966) The structure and function of brown adipose tissue. *Br Med Bull* **22**, 92-96
23. Nedergaard, J., Golozoubova, V., Matthias, A., Åsadi, A., Jacobsson, A., and Cannon, B. (2001) UCP1: the only protein able to mediate adaptive non-shivering thermogenesis and metabolic inefficiency. *Biochim Biophys Acta* **1504**, 82-106
24. The Ruan Laboratory, U. o. M. (2019) Regulation and Function of Adipose Tissue Remodeling. <http://ruan.umn.edu/research/regulation-and-function-adipose-tissue-remodeling> (Consultado en diciembre de 2019).
25. Ramsden, D. B., Ho, P. W., Ho, J. W., Liu, H. F., So, D. H., Tse, H. M., Chan, K. H., and Ho, S. L. (2012) Human neuronal uncoupling proteins 4 and 5 (UCP4 and UCP5): structural properties, regulation, and physiological role in protection against oxidative stress and mitochondrial dysfunction. *Brain Behav* **2**, 468-478
26. Wu, J., Cohen, P., and Spiegelman, B. M. (2013) Adaptive thermogenesis in adipocytes: is beige the new brown? *Genes Dev* **27**, 234-250
27. Wankhade, U. D., Shen, M., Yadav, H., and Thakali, K. M. (2016) Novel Browning Agents, Mechanisms, and Therapeutic Potentials of Brown Adipose Tissue. *Biomed Res Int* **2016**, 2365609
28. Lee, Y. H., Mottillo, E. P., and Granneman, J. G. (2014) Adipose tissue plasticity from WAT to BAT and in between. *Biochim Biophys Acta* **1842**, 358-369
29. Kozak, L. P., and Anunciado-Koza, R. (2008) UCP1: its involvement and utility in obesity. *Int J Obes (Lond)* **32 Suppl 7**, S32-38
30. Lowell, B. B., and Spiegelman, B. M. (2000) Towards a molecular understanding of adaptive thermogenesis. *Nature* **404**, 652-660
31. Cereijo, R., Villarroya, J., and Villarroya, F. (2015) Non-sympathetic control of brown adipose tissue. *Int J Obes Suppl* **5**, S40-44
32. Dempersmier, J., Sambeat, A., Gulyaeva, O., Paul, S. M., Hudak, C. S., Raposo, H. F., Kwan, H. Y., Kang, C., Wong, R. H., and Sul, H. S. (2015) Cold-inducible Zfp516 activates UCP1 transcription to promote browning of white fat and development of brown fat. *Mol Cell* **57**, 235-246
33. Mueller, E. (2014) Understanding the variegation of fat: novel regulators of adipocyte differentiation and fat tissue biology. *Biochim Biophys Acta* **1842**, 352-357

34. Puigserver, P., Wu, Z., Park, C. W., Graves, R., Wright, M., and Spiegelman, B. M. (1998) A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis. *Cell* **92**, 829-839
35. Rosen, E. D., Walkey, C. J., Puigserver, P., and Spiegelman, B. M. (2000) Transcriptional regulation of adipogenesis. *Genes Dev* **14**, 1293-1307
36. Hassan, M., Latif, N., and Yacoub, M. (2012) Adipose tissue: friend or foe? *Nat Rev Cardiol* **9**, 689-702
37. Salma, N., Xiao, H., and Imbalzano, A. N. (2006) Temporal recruitment of CCAAT/enhancer-binding proteins to early and late adipogenic promoters in vivo. *J Mol Endocrinol* **36**, 139-151
38. Kajimura, S., Seale, P., Kubota, K., Lunsford, E., Frangioni, J. V., Gygi, S. P., and Spiegelman, B. M. (2009) Initiation of myoblast to brown fat switch by a PRDM16-C/EBP-beta transcriptional complex. *Nature* **460**, 1154-1158
39. Park, J. H., Kang, H. J., Kang, S. I., Lee, J. E., Hur, J., Ge, K., Mueller, E., Li, H., Lee, B. C., and Lee, S. B. (2013) A multifunctional protein, EWS, is essential for early brown fat lineage determination. *Dev Cell* **26**, 393-404
40. Seale, P., Bjork, B., Yang, W., Kajimura, S., Chin, S., Kuang, S., Scime, A., Devarakonda, S., Conroe, H. M., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Rudnicki, M. A., Beier, D. R., and Spiegelman, B. M. (2008) PRDM16 controls a brown fat/skeletal-muscle switch. *Nature* **454**, 961-967
41. Hondares, E., Rosell, M., Diaz-Delfin, J., Olmos, Y., Monsalve, M., Iglesias, R., Villarroya, F., and Giral, M. (2011) Peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) induces PPARgamma coactivator 1alpha (PGC-1alpha) gene expression and contributes to thermogenic activation of brown fat: involvement of PRDM16. *J Biol Chem* **286**, 43112-43122
42. Ohno, H., Shinoda, K., Spiegelman, B. M., and Kajimura, S. (2012) PPARgamma agonists induce a white-to-brown fat conversion through stabilization of PRDM16 protein. *Cell Metab* **15**, 395-404
43. Young, P., Arch, J. R., and Ashwell, M. (1984) Brown adipose tissue in the parametrial fat pad of the mouse. *FEBS Lett* **167**, 10-14
44. Himms-Hagen, J., Melnyk, A., Zingaretti, M. C., Ceresi, E., Barbatelli, G., and Cinti, S. (2000) Multilocular fat cells in WAT of CL-316243-treated rats derive directly from white adipocytes. *Am J Physiol Cell Physiol* **279**, C670-681
45. Cannon, B., and Nedergaard, J. (2004) Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol Rev* **84**, 277-359
46. Ishibashi, J., and Seale, P. (2010) Medicine. Beige can be slimming. *Science* **328**, 1113-1114
47. Petrovic, N., Walden, T. B., Shabalina, I. G., Timmons, J. A., Cannon, B., and Nedergaard, J. (2010) Chronic peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) activation of epididymally derived white adipocyte cultures reveals a population of thermogenically competent, UCP1-containing adipocytes molecularly distinct from classic brown adipocytes. *J Biol Chem* **285**, 7153-7164
48. Long, J. Z., Svensson, K. J., Tsai, L., Zeng, X., Roh, H. C., Kong, X., Rao, R. R., Lou, J., Lokurkar, I., Baur, W., Castellot, J. J., Jr., Rosen, E. D., and Spiegelman, B. M. (2014) A smooth muscle-like origin for beige adipocytes. *Cell Metab* **19**, 810-820
49. Schulz, T. J., Huang, T. L., Tran, T. T., Zhang, H., Townsend, K. L., Shadrach, J. L., Cerletti, M., McDougall, L. E., Giorgadze, N., Tchkonina, T., Schrier, D., Falb, D., Kirkland, J. L., Wagers, A. J., and Tseng, Y. H. (2011)

- Identification of inducible brown adipocyte progenitors residing in skeletal muscle and white fat. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 143-148
50. Vishvanath, L., MacPherson, K. A., Hepler, C., Wang, Q. A., Shao, M., Spurgin, S. B., Wang, M. Y., Kusminski, C. M., Morley, T. S., and Gupta, R. K. (2016) Pdgfrbeta+ Mural Preadipocytes Contribute to Adipocyte Hyperplasia Induced by High-Fat-Diet Feeding and Prolonged Cold Exposure in Adult Mice. *Cell Metab* **23**, 350-359
  51. Wang, W., Kissig, M., Rajakumari, S., Huang, L., Lim, H. W., Won, K. J., and Seale, P. (2014) Ebf2 is a selective marker of brown and beige adipogenic precursor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**, 14466-14471
  52. Fu, J., Li, Z., Zhang, H., Mao, Y., Wang, A., Wang, X., Zou, Z., and Zhang, X. (2015) Molecular pathways regulating the formation of brown-like adipocytes in white adipose tissue. *Diabetes Metab Res Rev* **31**, 433-452
  53. Rosenwald, M., Perdikari, A., Rulicke, T., and Wolfrum, C. (2013) Bi-directional interconversion of brite and white adipocytes. *Nat Cell Biol* **15**, 659-667
  54. Kajimura, S., Spiegelman, B. M., and Seale, P. (2015) Brown and Beige Fat: Physiological Roles beyond Heat Generation. *Cell Metab* **22**, 546-559
  55. Shao, M., Ishibashi, J., Kusminski, C. M., Wang, Q. A., Hepler, C., Vishvanath, L., MacPherson, K. A., Spurgin, S. B., Sun, K., Holland, W. L., Seale, P., and Gupta, R. K. (2016) Zfp423 Maintains White Adipocyte Identity through Suppression of the Beige Cell Thermogenic Gene Program. *Cell Metab* **23**, 1167-1184
  56. Wu, J., Bostrom, P., Sparks, L. M., Ye, L., Choi, J. H., Giang, A. H., Khandekar, M., Virtanen, K. A., Nuutila, P., Schaart, G., Huang, K., Tu, H., van Marken Lichtenbelt, W. D., Hoeks, J., Enerback, S., Schrauwen, P., and Spiegelman, B. M. (2012) Beige adipocytes are a distinct type of thermogenic fat cell in mouse and human. *Cell* **150**, 366-376
  57. Sharp, L. Z., Shinoda, K., Ohno, H., Scheel, D. W., Tomoda, E., Ruiz, L., Hu, H., Wang, L., Pavlova, Z., Gilsanz, V., and Kajimura, S. (2012) Human BAT possesses molecular signatures that resemble beige/brite cells. *PLoS One* **7**, e49452
  58. Walden, T. B., Hansen, I. R., Timmons, J. A., Cannon, B., and Nedergaard, J. (2012) Recruited vs. nonrecruited molecular signatures of brown, "brite," and white adipose tissues. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **302**, E19-31
  59. Lidell, M. E., Betz, M. J., and Enerback, S. (2014) Two types of brown adipose tissue in humans. *Adipocyte* **3**, 63-66
  60. Seale, P., Conroe, H. M., Estall, J., Kajimura, S., Frontini, A., Ishibashi, J., Cohen, P., Cinti, S., and Spiegelman, B. M. (2011) Prdm16 determines the thermogenic program of subcutaneous white adipose tissue in mice. *J Clin Invest* **121**, 96-105
  61. Jespersen, N. Z., Larsen, T. J., Peijs, L., Dagaard, S., Homoe, P., Loft, A., de Jong, J., Mathur, N., Cannon, B., Nedergaard, J., Pedersen, B. K., Moller, K., and Scheele, C. (2013) A classical brown adipose tissue mRNA signature partly overlaps with brite in the supraclavicular region of adult humans. *Cell Metab* **17**, 798-805
  62. de Jong, J. M., Larsson, O., Cannon, B., and Nedergaard, J. (2015) A stringent validation of mouse adipose tissue identity markers. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **308**, E1085-1105

63. Wang, S., Liang, X., Yang, Q., Fu, X., Rogers, C. J., Zhu, M., Rodgers, B. D., Jiang, Q., Dodson, M. V., and Du, M. (2015) Resveratrol induces brown-like adipocyte formation in white fat through activation of AMP-activated protein kinase (AMPK) alpha1. *Int J Obes (Lond)* **39**, 967-976
64. Seale, P., Kajimura, S., Yang, W., Chin, S., Rohas, L. M., Uldry, M., Tavernier, G., Langin, D., and Spiegelman, B. M. (2007) Transcriptional control of brown fat determination by PRDM16. *Cell Metab* **6**, 38-54
65. Trajkovski, M., Ahmed, K., Esau, C. C., and Stoffel, M. (2012) MyomiR-133 regulates brown fat differentiation through Prdm16. *Nat Cell Biol* **14**, 1330-1335
66. Walden, T. B., Timmons, J. A., Keller, P., Nedergaard, J., and Cannon, B. (2009) Distinct expression of muscle-specific microRNAs (myomirs) in brown adipocytes. *J Cell Physiol* **218**, 444-449
67. Kong, X., Yu, J., Bi, J., Qi, H., Di, W., Wu, L., Wang, L., Zha, J., Lv, S., Zhang, F., Li, Y., Hu, F., Liu, F., Zhou, H., Liu, J., and Ding, G. (2015) Glucocorticoids transcriptionally regulate miR-27b expression promoting body fat accumulation via suppressing the browning of white adipose tissue. *Diabetes* **64**, 393-404
68. Stanford, K. I., Middelbeek, R. J., Townsend, K. L., An, D., Nygaard, E. B., Hitchcox, K. M., Markan, K. R., Nakano, K., Hirshman, M. F., Tseng, Y. H., and Goodyear, L. J. (2013) Brown adipose tissue regulates glucose homeostasis and insulin sensitivity. *J Clin Invest* **123**, 215-223
69. Chevalier, C., Stojanovic, O., Colin, D. J., Suarez-Zamorano, N., Tarallo, V., Veyrat-Durebex, C., Rigo, D., Fabbiano, S., Stevanovic, A., Hagemann, S., Montet, X., Seimbille, Y., Zamboni, N., Hapfelmeier, S., and Trajkovski, M. (2015) Gut Microbiota Orchestrates Energy Homeostasis during Cold. *Cell* **163**, 1360-1374
70. Suarez-Zamorano, N., Fabbiano, S., Chevalier, C., Stojanovic, O., Colin, D. J., Stevanovic, A., Veyrat-Durebex, C., Tarallo, V., Rigo, D., Germain, S., Ilievska, M., Montet, X., Seimbille, Y., Hapfelmeier, S., and Trajkovski, M. (2015) Microbiota depletion promotes browning of white adipose tissue and reduces obesity. *Nat Med* **21**, 1497-1501
71. Cannon, B., and Nedergaard, J. (2004) Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol Rev* **84**
72. Sellayah, D., Bharaj, P., and Sikder, D. (2011) Orexin is required for brown adipose tissue development, differentiation, and function. *Cell Metab* **14**, 478-490
73. Guerra, C., Roncero, C., Porras, A., Fernandez, M., and Benito, M. (1996) Triiodothyronine induces the transcription of the uncoupling protein gene and stabilizes its mRNA in fetal rat brown adipocyte primary cultures. *J Biol Chem* **271**, 2076-2081
74. Lee, J. Y., Takahashi, N., Yasubuchi, M., Kim, Y. I., Hashizaki, H., Kim, M. J., Sakamoto, T., Goto, T., and Kawada, T. (2012) Triiodothyronine induces UCP-1 expression and mitochondrial biogenesis in human adipocytes. *Am J Physiol Cell Physiol* **302**, C463-472
75. Cannon, B., and Nedergaard, J. (2010) Thyroid hormones: igniting brown fat via the brain. *Nat Med* **16**, 965-967
76. Bagchi, M., Kim, L. A., Boucher, J., Walshe, T. E., Kahn, C. R., and D'Amore, P. A. (2013) Vascular endothelial growth factor is important for brown adipose tissue development and maintenance. *FASEB J* **27**, 3257-3271
77. Bostrom, P., Wu, J., Jedrychowski, M. P., Korde, A., Ye, L., Lo, J. C., Rasbach, K. A., Bostrom, E. A., Choi, J. H., Long, J. Z., Kajimura, S., Zingaretti, M. C., Vind, B. F., Tu, H., Cinti, S., Hojlund, K., Gygi, S. P., and



- Spiegelman, B. M. (2012) A PGC1-alpha-dependent myokine that drives brown-fat-like development of white fat and thermogenesis. *Nature* **481**, 463-468
78. Zhang, Y., Li, R., Meng, Y., Li, S., Donelan, W., Zhao, Y., Qi, L., Zhang, M., Wang, X., Cui, T., Yang, L. J., and Tang, D. (2014) Irisin stimulates browning of white adipocytes through mitogen-activated protein kinase p38 MAP kinase and ERK MAP kinase signaling. *Diabetes* **63**, 514-525
79. Rao, R. R., Long, J. Z., White, J. P., Svensson, K. J., Lou, J., Lokurkar, I., Jedrychowski, M. P., Ruas, J. L., Wrann, C. D., Lo, J. C., Camera, D. M., Lachey, J., Gygi, S., Seehra, J., Hawley, J. A., and Spiegelman, B. M. (2014) Meteorin-like is a hormone that regulates immune-adipose interactions to increase beige fat thermogenesis. *Cell* **157**, 1279-1291
80. Roberts, L. D., Bostrom, P., O'Sullivan, J. F., Schinzel, R. T., Lewis, G. D., Dejam, A., Lee, Y. K., Palma, M. J., Calhoun, S., Georgiadi, A., Chen, M. H., Ramachandran, V. S., Larson, M. G., Bouchard, C., Rankinen, T., Souza, A. L., Clish, C. B., Wang, T. J., Estall, J. L., Soukas, A. A., Cowan, C. A., Spiegelman, B. M., and Gerszten, R. E. (2014) beta-Aminoisobutyric acid induces browning of white fat and hepatic beta-oxidation and is inversely correlated with cardiometabolic risk factors. *Cell Metab* **19**, 96-108
81. Bordicchia, M., Liu, D., Amri, E. Z., Ailhaud, G., Dessi-Fulgheri, P., Zhang, C., Takahashi, N., Sarzani, R., and Collins, S. (2012) Cardiac natriuretic peptides act via p38 MAPK to induce the brown fat thermogenic program in mouse and human adipocytes. *J Clin Invest* **122**, 1022-1036
82. Fisher, F. M., Kleiner, S., Douris, N., Fox, E. C., Mepani, R. J., Verdeguer, F., Wu, J., Kharitonkov, A., Flier, J. S., Maratos-Flier, E., and Spiegelman, B. M. (2012) FGF21 regulates PGC-1alpha and browning of white adipose tissues in adaptive thermogenesis. *Genes Dev* **26**, 271-281
83. Watanabe, M., Houten, S. M., Matakai, C., Christoffolete, M. A., Kim, B. W., Sato, H., Messaddeq, N., Harney, J. W., Ezaki, O., and Kodama, T. (2006) Bile acids induce energy expenditure by promoting intracellular thyroid hormone activation. *Nature* **439**
84. Thomas, C., Gioiello, A., Noriega, L., Strehle, A., Oury, J., Rizzo, G., Macchiarulo, A., Yamamoto, H., Matakai, C., Pruzanski, M., Pellicciari, R., Auwerx, J., and Schoonjans, K. (2009) TGR5-mediated bile acid sensing controls glucose homeostasis. *Cell Metab* **10**, 167-177
85. Schulz, T. J., Huang, P., Huang, T. L., Xue, R., McDougall, L. E., Townsend, K. L., Cypess, A. M., Mishina, Y., Gussoni, E., and Tseng, Y. H. (2013) Brown-fat paucity due to impaired BMP signalling induces compensatory browning of white fat. *Nature* **495**, 379-383
86. Tseng, Y. H., Kokkotou, E., Schulz, T. J., Huang, T. L., Winnay, J. N., Taniguchi, C. M., Tran, T. T., Suzuki, R., Espinoza, D. O., Yamamoto, Y., Ahrens, M. J., Dudley, A. T., Norris, A. W., Kulkarni, R. N., and Kahn, C. R. (2008) New role of bone morphogenetic protein 7 in brown adipogenesis and energy expenditure. *Nature* **454**, 1000-1004
87. Qian, S. W., Tang, Y., Li, X., Liu, Y., Zhang, Y. Y., Huang, H. Y., Xue, R. D., Yu, H. Y., Guo, L., Gao, H. D., Liu, Y., Sun, X., Li, Y. M., Jia, W. P., and Tang, Q. Q. (2013) BMP4-mediated brown fat-like changes in white adipose tissue alter glucose and energy homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**, E798-807
88. Whittle, A. J., Carobbio, S., Martins, L., Slawik, M., Hondares, E., Vazquez, M. J., Morgan, D., Csikasz, R. I., Gallego, R., Rodriguez-Cuenca, S., Dale, M., Virtue, S., Villarroya, F., Cannon, B., Rahmouni, K., Lopez, M., and Vidal-Puig, A. (2012) BMP8B increases brown adipose tissue thermogenesis through both central and peripheral actions. *Cell* **149**, 871-885

89. Madsen, L., Pedersen, L. M., Lillefosse, H. H., Fjaere, E., Bronstad, I., Hao, Q., Petersen, R. K., Hallenborg, P., Ma, T., De Matteis, R., Araujo, P., Mercader, J., Bonet, M. L., Hansen, J. B., Cannon, B., Nedergaard, J., Wang, J., Cinti, S., Voshol, P., Doskeland, S. O., and Kristiansen, K. (2010) UCP1 induction during recruitment of brown adipocytes in white adipose tissue is dependent on cyclooxygenase activity. *PLoS One* **5**, e11391
90. Vegiopoulos, A., Muller-Decker, K., Strzoda, D., Schmitt, I., Chichelnitskiy, E., Ostertag, A., Berriel Diaz, M., Rozman, J., Hrabe de Angelis, M., Nusing, R. M., Meyer, C. W., Wahli, W., Klingenspor, M., and Herzig, S. (2010) Cyclooxygenase-2 controls energy homeostasis in mice by de novo recruitment of brown adipocytes. *Science* **328**, 1158-1161
91. Cypess, A. M., Weiner, L. S., Roberts-Toler, C., Franquet Elia, E., Kessler, S. H., Kahn, P. A., English, J., Chatman, K., Trauger, S. A., Doria, A., and Kolodny, G. M. (2015) Activation of human brown adipose tissue by a beta3-adrenergic receptor agonist. *Cell Metab* **21**, 33-38
92. Verty, A. N., Allen, A. M., and Oldfield, B. J. (2009) The effects of rimonabant on brown adipose tissue in rat: implications for energy expenditure. *Obesity (Silver Spring, Md.)* **17**, 254-261
93. Ma, S., Yu, H., Zhao, Z., Luo, Z., Chen, J., Ni, Y., Jin, R., Ma, L., Wang, P., Zhu, Z., Li, L., Zhong, J., Liu, D., Nilius, B., and Zhu, Z. (2012) Activation of the cold-sensing TRPM8 channel triggers UCP1-dependent thermogenesis and prevents obesity. *J Mol Cell Biol* **4**, 88-96
94. Baskaran, P., Krishnan, V., Ren, J., and Thyagarajan, B. (2016) Capsaicin induces browning of white adipose tissue and counters obesity by activating TRPV1 channel-dependent mechanisms. *Br J Pharmacol* **173**
95. Mercader, J., Ribot, J., Murano, I., Felipe, F., Cinti, S., Bonet, M. L., and Palou, A. (2006) Remodeling of white adipose tissue after retinoic acid administration in mice. *Endocrinology* **147**, 5325-5332
96. Alvarez, R., de Andres, J., Yubero, P., Vinas, O., Mampel, T., Iglesias, R., Giral, M., and Villarroya, F. (1995) A novel regulatory pathway of brown fat thermogenesis. Retinoic acid is a transcriptional activator of the mitochondrial uncoupling protein gene. *J Biol Chem* **270**, 5666-5673
97. Matta, J. A., Miyares, R. L., and Ahern, G. P. (2007) TRPV1 is a novel target for omega-3 polyunsaturated fatty acids. *J Physiol* **578**, 397-411
98. Kim, M., Goto, T., Yu, R., Uchida, K., Tominaga, M., Kano, Y., Takahashi, N., and Kawada, T. (2015) Fish oil intake induces UCP1 upregulation in brown and white adipose tissue via the sympathetic nervous system. *Sci Rep* **5**, 18013
99. Quesada-Lopez, T., Cereijo, R., Turatsinze, J. V., Planavila, A., Cairo, M., Gavaldà-Navarro, A., Peyrou, M., Moure, R., Iglesias, R., Giral, M., Eizirik, D. L., and Villarroya, F. (2016) The lipid sensor GPR120 promotes brown fat activation and FGF21 release from adipocytes. *Nat Commun* **7**, 13479
100. Alberdi, G., Rodriguez, V. M., Miranda, J., Macarulla, M. T., Churrua, I., and Portillo, M. P. (2013) Thermogenesis is involved in the body-fat lowering effects of resveratrol in rats. *Food Chem* **141**
101. Tsoi, M., Moore, M., Burg, D., Painter, A., Taylor, R., Lockie, S. H., Turner, N., Warren, A., Cooney, G., Oldfield, B., Clarke, S., and Robertson, G. (2012) Activation of thermogenesis in brown adipose tissue and dysregulated lipid metabolism associated with cancer cachexia in mice. *Cancer Res* **72**, 4372-4382
102. Kir, S., White, J. P., Kleiner, S., Kazak, L., Cohen, P., Baracos, V. E., and Spiegelman, B. M. (2014) Tumour-derived PTH-related protein triggers adipose tissue browning and cancer cachexia. *Nature* **513**, 100-104

103. Patsouris, D., Qi, P., Abdullahi, A., Stanojic, M., Chen, P., Parousis, A., Amini-Nik, S., and Jeschke, M. G. (2015) Burn Induces Browning of the Subcutaneous White Adipose Tissue in Mice and Humans. *Cell Rep* **13**, 1538-1544
104. Organization, W. H. (2019) Obesity and overweight. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight> (Consultado en diciembre de 2019)
105. Lazar, M. A. (2005) How obesity causes diabetes: not a tall tale. *Science* **307**, 373-375
106. Cypess, A. M., and Kahn, C. R. (2010) Brown fat as a therapy for obesity and diabetes. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* **17**, 143-149
107. Hokanson, J. E., and Austin, M. A. (1996) Plasma triglyceride level is a risk factor for cardiovascular disease independent of high-density lipoprotein cholesterol level: a meta-analysis of population-based prospective studies. *J Cardiovasc Risk* **3**, 213-219
108. Bartelt, A., Bruns, O. T., Reimer, R., Hohenberg, H., Ittrich, H., Peldschus, K., Kaul, M. G., Tromsdorf, U. I., Weller, H., Waurisch, C., Eychmuller, A., Gordts, P. L., Rinninger, F., Bruegelmann, K., Freund, B., Nielsen, P., Merkel, M., and Heeren, J. (2011) Brown adipose tissue activity controls triglyceride clearance. *Nat Med* **17**, 200-205
109. Santos, R. A. S., Sampaio, W. O., Alzamora, A. C., Motta-Santos, D., Alenina, N., Bader, M., and Campagnole-Santos, M. J. (2018) The ACE2/Angiotensin-(1-7)/MAS Axis of the Renin-Angiotensin System: Focus on Angiotensin-(1-7). *Physiol Rev* **98**, 505-553
110. Kobori, H., Nangaku, M., Navar, L. G., and Nishiyama, A. (2007) The intrarenal renin-angiotensin system: from physiology to the pathobiology of hypertension and kidney disease. *Pharmacol Rev* **59**, 251-287
111. Costa-Besada, M. A., Valenzuela, R., Garrido-Gil, P., Villar-Cheda, B., Parga, J. A., Lanciego, J. L., and Labandeira-Garcia, J. L. (2018) Paracrine and Intracrine Angiotensin 1-7/Mas Receptor Axis in the Substantia Nigra of Rodents, Monkeys, and Humans. *Mol Neurobiol* **55**, 5847-5867
112. Forte, B. L., Slosky, L. M., Zhang, H., Arnold, M. R., Staatz, W. D., Hay, M., Largent-Milnes, T. M., and Vanderah, T. W. (2016) Angiotensin-(1-7)/Mas receptor as an antinociceptive agent in cancer-induced bone pain. *Pain* **157**, 2709-2721
113. Sampaio, W. O., Souza dos Santos, R. A., Faria-Silva, R., da Mata Machado, L. T., Schiffrin, E. L., and Touyz, R. M. (2007) Angiotensin-(1-7) through receptor Mas mediates endothelial nitric oxide synthase activation via Akt-dependent pathways. *Hypertension* **49**, 185-192
114. Santos, R. A. (2014) Angiotensin-(1-7). *Hypertension* **63**, 1138-1147
115. Santos, R. A., Ferreira, A. J., Verano-Braga, T., and Bader, M. (2013) Angiotensin-converting enzyme 2, angiotensin-(1-7) and Mas: new players of the renin-angiotensin system. *J Endocrinol* **216**, R1-R17
116. Santos, R. A., Simoes e Silva, A. C., Maric, C., Silva, D. M., Machado, R. P., de Buhr, I., Heringer-Walther, S., Pinheiro, S. V., Lopes, M. T., Bader, M., Mendes, E. P., Lemos, V. S., Campagnole-Santos, M. J., Schultheiss, H. P., Speth, R., and Walther, T. (2003) Angiotensin-(1-7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 8258-8263
117. Than, A., Leow, M. K., and Chen, P. (2013) Control of adipogenesis by the autocrine interplays between angiotensin 1-7/Mas receptor and angiotensin II/AT1 receptor signaling pathways. *J Biol Chem* **288**, 15520-15531

118. Paz Ocaranza, M., Riquelme, J. A., Garcia, L., Jalil, J. E., Chiong, M., Santos, R. A. S., and Lavandero, S. (2019) Counter-regulatory renin-angiotensin system in cardiovascular disease. *Nat Rev Cardiol*
119. Takahashi, N., Li, F., Hua, K., Deng, J., Wang, C. H., Bowers, R. R., Bartness, T. J., Kim, H. S., and Harp, J. B. (2007) Increased energy expenditure, dietary fat wasting, and resistance to diet-induced obesity in mice lacking renin. *Cell Metab* **6**, 506-512
120. Kouyama, R., Suganami, T., Nishida, J., Tanaka, M., Toyoda, T., Kiso, M., Chiwata, T., Miyamoto, Y., Yoshimasa, Y., Fukamizu, A., Horiuchi, M., Hirata, Y., and Ogawa, Y. (2005) Attenuation of diet-induced weight gain and adiposity through increased energy expenditure in mice lacking angiotensin II type 1a receptor. *Endocrinology* **146**, 3481-3489
121. Massiera, F., Seydoux, J., Geloën, A., Quignard-Boulangé, A., Turban, S., Saint-Marc, P., Fukamizu, A., Negrel, R., Ailhaud, G., and Teboul, M. (2001) Angiotensinogen-deficient mice exhibit impairment of diet-induced weight gain with alteration in adipose tissue development and increased locomotor activity. *Endocrinology* **142**, 5220-5225
122. Yvan-Charvet, L., Even, P., Bloch-Faure, M., Guerre-Millo, M., Moustaid-Moussa, N., Ferre, P., and Quignard-Boulangé, A. (2005) Deletion of the angiotensin type 2 receptor (AT2R) reduces adipose cell size and protects from diet-induced obesity and insulin resistance. *Diabetes* **54**, 991-999
123. de Kloet, A. D., Krause, E. G., Kim, D. H., Sakai, R. R., Seeley, R. J., and Woods, S. C. (2009) The effect of angiotensin-converting enzyme inhibition using captopril on energy balance and glucose homeostasis. *Endocrinology* **150**, 4114-4123
124. Mathai, M. L., Naik, S., Sinclair, A. J., Weisinger, H. S., and Weisinger, R. S. (2008) Selective reduction in body fat mass and plasma leptin induced by angiotensin-converting enzyme inhibition in rats. *Int J Obes (Lond)* **32**, 1576-1584
125. Stucchi, P., Cano, V., Ruiz-Gayo, M., and Fernandez-Alfonso, M. S. (2009) Aliskiren reduces body-weight gain, adiposity and plasma leptin during diet-induced obesity. *Br J Pharmacol* **158**, 771-778
126. Oh, Y. B., Kim, J. H., Park, B. M., Park, B. H., and Kim, S. H. (2012) Captopril intake decreases body weight gain via angiotensin-(1-7). *Peptides* **37**, 79-85
127. Engeli, S., Gorzelniak, K., Kreutz, R., Runkel, N., Distler, A., and Sharma, A. M. (1999) Co-expression of renin-angiotensin system genes in human adipose tissue. *J Hypertens* **17**, 555-560
128. Gupte, M., Boustany-Kari, C. M., Bharadwaj, K., Police, S., Thatcher, S., Gong, M. C., English, V. L., and Cassis, L. A. (2008) ACE2 is expressed in mouse adipocytes and regulated by a high-fat diet. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **295**, R781-788
129. Pahlavani, M., Kalupahana, N. S., Ramalingam, L., and Moustaid-Moussa, N. (2017) Regulation and Functions of the Renin-Angiotensin System in White and Brown Adipose Tissue. *Compr Physiol* **7**, 1137-1150
130. Santos, S. H., Fernandes, L. R., Mario, E. G., Ferreira, A. V., Porto, L. C., Alvarez-Leite, J. I., Botion, L. M., Bader, M., Alenina, N., and Santos, R. A. (2008) Mas deficiency in FVB/N mice produces marked changes in lipid and glycemic metabolism. *Diabetes* **57**, 340-347
131. Santos, S. H., Braga, J. F., Mario, E. G., Porto, L. C., Rodrigues-Machado Mda, G., Murari, A., Botion, L. M., Alenina, N., Bader, M., and Santos, R. A. (2010) Improved lipid and glucose metabolism in transgenic rats with increased circulating angiotensin-(1-7). *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **30**, 953-961

132. Schuchard, J., Winkler, M., Stolting, I., Schuster, F., Vogt, F. M., Barkhausen, J., Thorns, C., Santos, R. A., Bader, M., and Raasch, W. (2015) Lack of weight gain after angiotensin AT1 receptor blockade in diet-induced obesity is partly mediated by an angiotensin-(1-7)/Mas-dependent pathway. *Br J Pharmacol* **172**, 3764-3778
133. Santos, S. H., Fernandes, L. R., Pereira, C. S., Guimaraes, A. L., de Paula, A. M., Campagnole-Santos, M. J., Alvarez-Leite, J. I., Bader, M., and Santos, R. A. (2012) Increased circulating angiotensin-(1-7) protects white adipose tissue against development of a proinflammatory state stimulated by a high-fat diet. *Regulatory Peptides* **178**, 64-70
134. Segura, J., and Rulope, L. M. (2007) Obesity, essential hypertension and renin-angiotensin system. *Public Health Nutrition* **10**, 1151-1155
135. Bylund, D. B. (2017) Captopril. *Reference Module in Biomedical Sciences*, 1-6
136. Weisinger, H. S., Begg, D. P., Egan, G. F., Jayasooriya, A. P., Lie, F., Mathai, M. L., Sinclair, A. J., Wark, J. D., and Weisinger, R. S. (2008) Angiotensin converting enzyme inhibition from birth reduces body weight and body fat in Sprague-Dawley rats. *Physiol Behav* **93**, 820-825
137. Weisinger, R. S., Stanley, T. K., Begg, D. P., Weisinger, H. S., Spark, K. J., and Jois, M. (2009) Angiotensin converting enzyme inhibition lowers body weight and improves glucose tolerance in C57BL/6J mice maintained on a high fat diet. *Physiol Behav* **98**, 192-197
138. Ferrario, C. M., Chappell, M. C., Tallant, E. A., Brosnihan, K. B., and Diz, D. I. (1997) Counterregulatory actions of angiotensin-(1-7). *Hypertension* **30**, 535-541
139. Nisoli, E., Clementi, E., Paolucci, C., Cozzi, V., Tonello, C., Sciorati, C., Bracale, R., Valerio, A., Francolini, M., Moncada, S., and Carruba, M. O. (2003) Mitochondrial biogenesis in mammals: the role of endogenous nitric oxide. *Science* **299**, 896-899
140. Morimoto, H., Mori, J., Nakajima, H., Kawabe, Y., Tsuma, Y., Fukuhara, S., Kodo, K., Ikoma, K., Matoba, S., Oudit, G. Y., and Hosoi, H. (2018) Angiotensin 1-7 stimulates brown adipose tissue and reduces diet-induced obesity. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **314**, E131-E138
141. Chouchani, E. T., Kazak, L., and Spiegelman, B. M. (2019) New Advances in Adaptive Thermogenesis: UCP1 and Beyond. *Cell Metab* **29**, 27-37
142. Tseng, Y. H., Cypess, A. M., and Kahn, C. R. (2010) Cellular bioenergetics as a target for obesity therapy. *Nat Rev Drug Discov* **9**, 465-482
143. Reeves, P. G., Nielsen, F. H., and Fahey, G. C., Jr. (1993) AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr* **123**, 1939-1951
144. Santos, R. A., Ferreira, A. J., Nadu, A. P., Braga, A. N., de Almeida, A. P., Campagnole-Santos, M. J., Baltatu, O., Iliescu, R., Reudelhuber, T. L., and Bader, M. (2004) Expression of an angiotensin-(1-7)-producing fusion protein produces cardioprotective effects in rats. *Physiol Genomics* **17**, 292-299
145. Tenorio-Lopez, F. A., Zarco-Olvera, G., Sanchez-Mendoza, A., Rosas-Peralta, M., Pastelin-Hernandez, G., and del Valle-Mondragon, L. (2010) Simultaneous determination of angiotensins II and 1-7 by capillary zone electrophoresis in plasma and urine from hypertensive rats. *Talanta* **80**, 1702-1712
146. Gonzalez, G., Alvarado-Vasquez, N., Fernandez, G. J., Cruz-Robles, D., Del Valle, L., Pinzon, E., Torres, I., Rodriguez, E., Zapata, E., Gomez-Vidales, V., Montano, L. F., and de la Pena, A. (2010) The antithrombotic

- effect of the aminoestrogen prolame (N-(3-hydroxy-1,3,5(10)-estratrien-17B-YL)-3-hydroxypropylamine) is linked to an increase in nitric oxide production by platelets and endothelial cells. *Atherosclerosis* **208**, 62-68
147. Tenorio F.; Del Valle L.; Pastelín, G. (2005) Validación de un método analítico espectrofotométrico para la cuantificación de metabolitos estables de óxido nítrico en fluidos biológicos. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas* **36**, 31-41
  148. Gasic, G., and Berwick, L. (1963) Hale Stain for Sialic Acid-Containing Mucins. Adaptation to Electron Microscopy. *J Cell Biol* **19**, 223-228
  149. Cassis, L. A., Police, S. B., Yiannikouris, F., and Thatcher, S. E. (2008) Local adipose tissue renin-angiotensin system. *Curr Hypertens Rep* **10**, 93-98
  150. Frigolet, M. E., Torres, N., and Tovar, A. R. (2013) The renin-angiotensin system in adipose tissue and its metabolic consequences during obesity. *J Nutr Biochem* **24**, 2003-2015
  151. Ferrario, C. M., Trask, A. J., and Jessup, J. A. (2005) Advances in biochemical and functional roles of angiotensin-converting enzyme 2 and angiotensin-(1-7) in regulation of cardiovascular function. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **289**, H2281-2290
  152. Srivastava, G., and Apovian, C. M. (2018) Current pharmacotherapy for obesity. *Nat Rev Endocrinol* **14**, 12-24
  153. Than, A., Xu, S., Li, R., Leow, M. K., Sun, L., and Chen, P. (2017) Angiotensin type 2 receptor activation promotes browning of white adipose tissue and brown adipogenesis. *Signal Transduct Target Ther* **2**, 17022
  154. Bartness, T. J., and Ryu, V. (2015) Neural control of white, beige and brown adipocytes. *Int J Obes Suppl* **5**, S35-39
  155. Bruce, E. B., and de Kloet, A. -D. (2017) The intricacies of the renin-angiotensin-system in metabolic regulation. *Physiol Behav* **178**, 157-165
  156. Dias-Peixoto, M. F., Santos, R. A., Gomes, E. R., Alves, M. N., Almeida, P. W., Greco, L., Rosa, M., Fauler, B., Bader, M., Alenina, N., and Guatimosim, S. (2008) Molecular mechanisms involved in the angiotensin-(1-7)/Mas signaling pathway in cardiomyocytes. *Hypertension* **52**, 542-548
  157. Verano-Braga, T., Schwammle, V., Sylvester, M., Passos-Silva, D. G., Peluso, A. A., Etelvino, G. M., Santos, R. A., and Roepstorff, P. (2012) Time-resolved quantitative phosphoproteomics: new insights into Angiotensin-(1-7) signaling networks in human endothelial cells. *J Proteome Res* **11**, 3370-3381
  158. Haas, B., Mayer, P., Jennissen, K., Scholz, D., Berriel Diaz, M., Bloch, W., Herzig, S., Fassler, R., and Pfeifer, A. (2009) Protein kinase G controls brown fat cell differentiation and mitochondrial biogenesis. *Sci Signal* **2**, ra78
  159. Leiss, V., Illison, J., Domes, K., Hofmann, F., and Lukowski, R. (2014) Expression of cGMP-dependent protein kinase type I in mature white adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun* **452**, 151-156
  160. Mitschke, M. M., Hoffmann, L. S., Gnad, T., Scholz, D., Kruithoff, K., Mayer, P., Haas, B., Sassmann, A., Pfeifer, A., and Kilic, A. (2013) Increased cGMP promotes healthy expansion and browning of white adipose tissue. *FASEB J* **27**, 1621-1630
  161. Shulman, G. I. (2014) Ectopic fat in insulin resistance, dyslipidemia, and cardiometabolic disease. *N Engl J Med* **371**, 2237-2238
  162. Stepan, C. M., Bailey, S. T., Bhat, S., Brown, E. J., Banerjee, R. R., Wright, C. M., Patel, H. R., Ahima, R. S., and Lazar, M. A. (2001) The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature* **409**, 307-312

163. Tontonoz, P., Hu, E., and Spiegelman, B. M. (1994) Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR gamma 2, a lipid-activated transcription factor. *Cell* **79**, 1147-1156
164. Li, G., Xie, C., Lu, S., Nichols, R. G., Tian, Y., Li, L., Patel, D., Ma, Y., Brocker, C. N., Yan, T., Krausz, K. W., Xiang, R., Gavrilova, O., Patterson, A. D., and Gonzalez, F. J. (2017) Intermittent Fasting Promotes White Adipose Browning and Decreases Obesity by Shaping the Gut Microbiota. *Cell Metab* **26**, 672-685 e674

Productos de investigación derivados del protocolo:

**“Estudio *in vitro* e *in vivo* de la participación del eje Ang-(1-7)/Receptor Mas sobre la diferenciación de adipocitos beige en un modelo de obesidad en ratón”**

Registro CICUAL:

**FNU-1379-14/18-1**

1. Artículo publicado en la revista ***Metabolism*** (Factor de Impacto: 6.1 [2019]).
  - ❖ Vargas-Castillo A, Tobon-Cornejo S, Del Valle-Mondragon L, Torre-Villalvazo I, Scholnik-Cabrera A, Guevara-Cruz M, Pichardo-Ontiveros E, Fuentes-Romero R, Bader M, Alenina N, Vidal-Puig A, Hong E, Torres N, Tovar AR. Angiotensin-(1-7) induces beige fat thermogenesis through the Mas receptor. *Metabolism*. 2020 Feb;103:154048. doi: 10.1016/j.metabol.2019.154048. Epub 2019 Dec 13. PMID: 31843339
  - ❖ El segundo artículo se encuentra en escritura:  
Vargas-Castillo A, Tobon-Cornejo S, Del Valle-Mondragon L, Torre-Villalvazo I, Bader M, Alenina N, Hong E, Torres N, Tovar AR. Inhibition of Angiotensin Converting Enzyme induces browning of white adipose tissue in obese mice.
2. Con el artículo publicado, la primera autora fue seleccionada ganadora del premio que otorga la revista y se titula **“2020 Metabolism Award for Junior Investigators”**.
3. Tesis doctoral titulada: **“Estudio *in vitro* e *in vivo* de la participación del eje Ang-(1-7)/receptor Mas sobre la diferenciación de adipocitos beige”**. Obtención del grado: enero de 2020. Institución: Cinvestav sede sur.
4. Tres posters presentados en 3 congresos internacionales:
  - **“Experimental Biology 2016”** en San Diego, California (2-6 de abril de 2016).  
Ariana E Vargas-Castillo, Leonardo Del Valle-Mondragon, Nimbe Torres, Enrique Hong, Armando R Tovar. Poster Presentation. “Inhibition of Angiotensin Converting Enzyme Induces Beige Adipocytes through Angiotensin-(1-7) in 3T3-L1 Adipocytes and Obese Mice.”
  - **“Bioenergetics and Metabolic Disease”** del Keystone Symposia 2018 en Keystone, Colorado (21-25 de enero de 2018).



Ariana E Vargas-Castillo, Leonardo Del Valle-Mondragon, Enrique Hong, Nimbe Torres, Michael Bader, Armando R Tovar. Poster presentation: "Angiotensin-(1-7) induces browning through Mas receptors in C57BL/6 mice and 3T3-L1 adipocytes".

- **"Nutrition 2018"** organizado por la American Society of Nutrition en Boston, Massachusetts (9-12 de junio de 2018).

Ariana E Vargas-Castillo, Leonardo Del Valle-Mondragon, Enrique Hong, Nimbe Torres, Michael Bader, Armando R Tovar. Poster presentation: "High Fat-Sucrose Diet reduces browning due to the impairment of the Angiotensin-(1-7)/Receptor Mas axis in Subcutaneous Adipose Tissue of C57BL/6 mice".

Productos de investigación derivados del protocolo:

**“Estudio *in vitro* e *in vivo* de la participación del eje Ang-(1-7)/Receptor Mas sobre la diferenciación de adipocitos beige en un modelo de obesidad en ratón”**

Registro CICUAL:

**FNU-1379-14/18-1**

1. Artículo publicado en la revista ***Metabolism*** (Factor de Impacto: 6.1 [2019]).
  - ❖ Vargas-Castillo A, Tobon-Cornejo S, Del Valle-Mondragon L, Torre-Villalvazo I, Schcolnik-Cabrera A, Guevara-Cruz M, Pichardo-Ontiveros E, Fuentes-Romero R, Bader M, Alenina N, Vidal-Puig A, Hong E, Torres N, Tovar AR. Angiotensin-(1-7) induces beige fat thermogenesis through the Mas receptor. *Metabolism*. 2020 Feb;103:154048. doi: 10.1016/j.metabol.2019.154048. Epub 2019 Dec 13. PMID: 31843339
  - ❖ El segundo artículo se encuentra en escritura:  
Vargas-Castillo A, Tobon-Cornejo S, Del Valle-Mondragon L, Torre-Villalvazo I, Bader M, Alenina N, Hong E, Torres N, Tovar AR. Inhibition of Angiotensin Converting Enzyme induces browning of white adipose tissue in obese mice.
2. Con el artículo publicado, la primera autora fue seleccionada ganadora del premio que otorga la revista y se titula **“2020 Metabolism Award for Junior Investigators”**.
3. Tesis doctoral titulada: **“Estudio *in vitro* e *in vivo* de la participación del eje Ang-(1-7)/receptor Mas sobre la diferenciación de adipocitos beige”**. Obtención del grado: enero de 2020. Institución: Cinvestav sede sur.
4. Tres posters presentados en 3 congresos internacionales:
  - **“Experimental Biology 2016”** en San Diego, California (2-6 de abril de 2016).  
Ariana E Vargas-Castillo, Leonardo Del Valle-Mondragon, Nimbe Torres, Enrique Hong, Armando R Tovar. Poster Presentation. “Inhibition of Angiotensin Converting Enzyme Induces Beige Adipocytes through Angiotensin-(1-7) in 3T3-L1 Adipocytes and Obese Mice.”
  - **“Bioenergetics and Metabolic Disease”** del Keystone Symposia 2018 en Keystone, Colorado (21-25 de enero de 2018).

Ariana E Vargas-Castillo, Leonardo Del Valle-Mondragon, Enrique Hong, Nimbe Torres, Michael Bader, Armando R Tovar. Poster presentation: "Angiotensin-(1-7) induces browning through Mas receptors in C57BL/6 mice and 3T3-L1 adipocytes".

- **"Nutrition 2018"** organizado por la American Society of Nutrition en Boston, Massachusetts (9-12 de junio de 2018).

Ariana E Vargas-Castillo, Leonardo Del Valle-Mondragon, Enrique Hong, Nimbe Torres, Michael Bader, Armando R Tovar. Poster presentation: "High Fat-Sucrose Diet reduces browning due to the impairment of the Angiotensin-(1-7)/Receptor Mas axis in Subcutaneous Adipose Tissue of C57BL/6 mice".



**SALUD**  
SECRETARÍA DE SALUD



INSTITUTO NACIONAL DE  
CIENCIAS MÉDICAS  
Y NUTRICIÓN  
SALVADOR ZUBIRÁN

Ciudad de México a 25 de Agosto de 2020

No. Oficio CICAL -085- 2020

**DR. ARMANDO ROBERTO TOVAR PALACIO**  
**DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA DE LA NUTRICIÓN**  
**P R E S E N T E**

Estimado Dr. Tovar

En respuesta al documento, con fecha del 13 de agosto de 2020, solicitando se apruebe un adendum, al protocolo con clave CINVA-FNU-1379-14/18-1 intitulado ESTUDIO IN VITRO E IN VIVO DE LA PARTICIPACIÓN DEL EJE Ang-(1-7) RECEPTOR MAS SOBRE LA DIFERENCIACIÓN DE ADIPOCITOS BEIGE EN LA OBESIDAD; me es grato informarle que le fue aprobada su solicitud; siempre y cuando, solicite prorroga o cierre del proyecto debido a que se encuentra vencido.

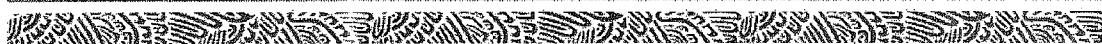
Sin más por el momento quedo de usted para cualquier duda o comentario

ATENTAMENTE

**DR. JORGE ALBERTO BARRIOS PAYÁN**  
**COORDINADOR DEL COMITÉ INTERNO PARA EL CUIDADO Y USO**  
**DE LOS ANIMALES DE LABORATORIO**

Ccp. MVZ. Mariela G. Contreras Escamilla- Departamento de Investigación Experimental y Bioterio

JABP/bdr





Ciudad de México a 13 de agosto de 2020

**Dr. Jorge Alberto Barrios Payán**

**Coordinador del Comité Interno para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio (CICUAL)**

**Presente.**

Por este medio, me permito enviar este addendum al Comité Interno para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio sobre el siguiente protocolo experimental:

- "Estudio *in vitro* e *in vivo* de la participación del eje Ang-(1-7)/Receptor Mas sobre la diferenciación de adipocitos beige en un modelo de obesidad en ratón"

Con clave de protocolo **FNU-1379-14/18-1**

El objetivo de este addendum es informar al CICUAL que durante el periodo de tiempo que se mantuvieron los modelos animales de este protocolo, se recolectaron las heces de todos los animales, con la finalidad de estudiar si los tratamientos en estudio modifican la composición de la microbiota intestinal. Se informa que nos encontramos midiendo las muestras y en breve solicitaremos el cierre del protocolo.

Resulta interesante estudiar la microbiota intestinal de los animales dado que se conoce que el microbioma intestinal se ha convertido en un regulador clave del metabolismo del hospedero. Se ha propuesto que existen interacciones complejas entre los microbios intestinales, sus metabolitos y las células del hospedero. Además, algunos metabolitos microbianos afectan el gasto energético sistémico al influir en la termogénesis y el browning del tejido adiposo blanco. Se conocen mecanismos de acción tanto directos como indirectos para metabolitos específicos, como ácidos biliares, aminoácidos de cadena ramificada, ácido indol propiónico y endocannabinoides (1). Sin embargo, el primer paso es estudiar qué bacterias se encuentran en mayor cantidad durante la obesidad y si se modifican con los tratamientos que incrementaron el browning del tejido adiposo de los animales obesos, en este sentido, nuestros resultados aportarían información valiosa en este campo.

1. Cani, P.D., Van Hul, M., Lefort, C. et al. Microbial regulation of organismal energy homeostasis. *Nat Metab* 1, 34–46 (2019). <https://doi.org/10.1038/s42255-018-0017-4>

Atentamente

Dr. Armando Tovar Palacio

Jefe del Departamento de Fisiología de la Nutrición





INSTITUTO NACIONAL DE  
CIENCIAS MÉDICAS  
Y NUTRICIÓN  
SALVADOR ZUBIRÁN

*A cere*



**2019**  
AÑO DEL CAUDILLO DEL SUR  
EMILIANO ZAPATA

CdMX., a 16 de abril de de 2019.

**DR. ARMANDO TOVAR PALACIO**  
Depto. de Fisiología de la Nutrición  
P r e s e n t e.

**REF: CICUAL-FNU-1379-14/18-1**

Estimado Dr. Tovar:

Este comité ha dictaminado que se **AUTORIZA** prórroga por 1 año a su proyecto intitulado **“ESTUDIO IN VITRO E IN VIVO DE LA PARTICIPACIÓN DEL EJE Ang-(1-7) RECEPTOR MAS SOBRE LA DIFERENCIACIÓN DE ADIPOCITOS BEIGE EN LA OBESIDAD”**

Sin más por el momento quedo de usted.

Atentamente,

Dra. Norma Bobadilla Sandoval  
Coordinadora del Comité Interno para el cuidado y uso de  
los Animales de Laboratorio.

2347 12:55  
INVEST. EXPERIMENTAL  
BIOTERIO  
DMSC  
INST. NAL. CIENCIAS MÉDICAS  
Y NUTRICIÓN ILOMUN CL

*Recibo original  
16/4/15*

*Omar Granadas*

c.c.p. M.V.Z. Mariela Contreras Escamilla, Jefa del DIEB

NAB/nom

Avenida Vasco de  
Quiroga No. 15  
Colonia Belisario  
Domínguez Sección XVI  
Delegación Tlalpan  
Código Postal 14080  
Ciudad de México  
(52-55)54870900  
v.incmnsz.mx



INSTITUTO NACIONAL DE  
CIENCIAS MÉDICAS  
Y NUTRICIÓN  
SALVADOR ZUBIRÁN

Ciudad de México, a 2 de abril de 2019

**Comité Interno para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán**

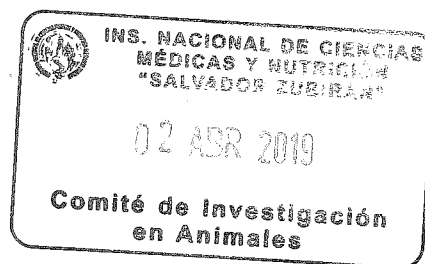
Presente.

En respuesta a la carta con fecha del día 21 de febrero de 2019, No. Oficio CICUAL-100-19 acerca del proyecto "ESTUDIO *IN VITRO* E *IN VIVO* DE LA PARTICIPACIÓN DEL EJE ANGIOTENSINA-(1-7)/RECEPTOR MAS SOBRE LA DIFERENCIACIÓN DE ADIPOCITOS BEIGE EN LA OBESIDAD" con registro FNU-1379-14/18-1, me permito solicitar una prórroga debido a que nos encontramos en el proceso de envío del artículo derivado de este protocolo. Únicamente se requerirían más animales en caso de que los revisores nos soliciten hacer más experimentos, en ese caso y si no estaba contemplado en el protocolo, se redactará un addendum para solicitar animales. Si ya no se requieren animales, se cerrará el protocolo inmediatamente. Por lo tanto, solicitamos atentamente que el CICUAL nos permita extender un periodo de prórroga de 6 meses.

Sin más por el momento, me pongo a sus órdenes para cualquier aclaración.

Atentamente,

Dr. Armando Tovar Palacio



c.c.p. M.V.Z. Mariela Guadalupe Contreras Escamilla, Jefa del DIEB

Avenida Vasco de  
Quiroga No. 15  
Colonia Belisario  
Domínguez Sección XVI  
Delegación Tlalpan  
Código Postal 14080  
Ciudad de México  
Tel. (52-55)54870900  
www.incmnsz.mx



"2019. Año del Caudillo de Sur, Emiliano Zapata"

INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN SALVADOR ZUBIRÁN



ACUSE

México Cd., Mx a 21 de febrero de 2019.

No. Oficio CICUAL-100-19

**DR. TOVAR PALACIO, ARMANDO ROBERTO**

Depto. Fisiología de la Nutrición

Presente.

Estimado Dr. Tovar.:

Por este conducto le informo que su proyecto intitulado: "ESTUDIO IN VITRO E IN VIVO DE LA PARTICIPACIÓN DEL EJE Ang-(1-7) RECEPTOR MAS SOBRE LA DIFERENCIACIÓN DE ADIPOCITOS BEIGE EN LA OBESIDAD", con registro FNU-1379-14/18-1 finalizó en diciembre 2018. Por lo que, le solicito de la manera más atenta me haga saber si el proyecto requerirá una prórroga. En caso afirmativo, favor de enviar al CICUAL el periodo de extensión que solicita y de requerir un mayor número de animales especificar y justificar como se utilizarán y los procedimientos experimentales que se llevarán a cabo con los mismos. En caso de no requerir una prórroga favor de llenar el formato de cierre del proyecto que se anexa a la presente (en hoja membretada e impresa) y adjunte los siguientes documentos indispensables para la conclusión del proyecto:

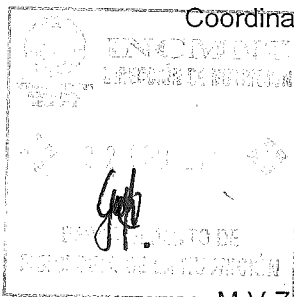
1. En caso de no requerir prórroga se necesita que entregue el: Formato de cierre
2. Informe final
3. Productos de Investigación derivados del proyecto (artículos, tesis, libros, capítulos de libro, patentes, presentaciones en congreso, entre otros).

Sin más por el momento quedo de usted..

Atentamente,

Dra. Norma A. Bobadilla Sandoval

Coordinadora de la Comisión de Investigación en Animales



2224 12:35  
INVEST. EXPERIMENTAL Y BIOTERIO

INCMYN  
INST. NAL. CIENCIAS MEDICAS Y NUTRUCIÓN INCMYN "C.Z."

c.c.p. M.V.Z. Mariela Contreras Escamilla, Jefa del DIBB

NABS/nom

Avenida Vasco de Quiroga No. 15  
Colonia Belisario Domínguez Sección XVI  
Delegación Tlalpan  
Código Postal 14080  
Ciudad de México  
Tel. (52-55)54870900  
www.incmnsz.mx





INSTITUTO NACIONAL DE  
CIENCIAS MÉDICAS  
Y NUTRICIÓN  
SALVADOR ZUBIRÁN

"2019. Año del Caudillo de Sur, Emiliano Zapata"

acuse

Ciudad de México, a 18 de febrero de 2019.

**DR. ARMANDO TOVAR PALACIO**  
**DEPTO. DE FISIOLÓGIA DE LA NUTRICIÓN**  
**Presente.**

**REF: CICUAL FNU-1379-14/18-1**

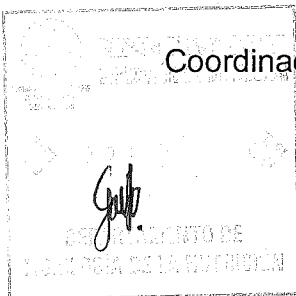
Estimado Dr. Tovar:

Este comité ha dictaminado que se **AUTORIZA** el adendum a su proyecto intitulado **"ESTUDIO IN VITRO E IN VIVO DE LA PARTICIPACIÓN DEL EJE Ang-(1-7) RECEPTOR MAS SOBRE LA DIFERENCIACIÓN DE ADIPOCITOS BEIGE EN LA OBESIDAD"** y queda asentado que no se volverá a aprobar ningún adendum extemporáneo.

Sin más por el momento quedo de usted.

Atentamente,

Dra. Norma Bobadilla Sandoval  
Coordinadora del Comité Interno para el Cuidado y Uso de  
los Animales de Laboratorio



c.c.p. M.V.Z. Mariela Contreras Escamilla, Jefa del DIEB

NAB/nom

Avenida Vasco de  
Quiroga No. 15  
Colonia Belisario  
Domínguez Sección XVI  
Delegación Tlalpan  
Código Postal 14080  
Ciudad de México  
Tel. (52-55)54870900  
www.incmnsz.mx

2242 10:30  
INVEST. EXPERIMENTAL Y  
BIOTERIO

2019  
DINSE  
INST. NAL. CIENCIAS MEDICAS  
Y NUTRICIÓN INCMYN "S.Z."



INSTITUTO NACIONAL DE  
CIENCIAS MÉDICAS  
Y NUTRICIÓN  
SALVADOR ZUBIRÁN

Ciudad de México, a 01 de febrero de 2019

**Comité Interno para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán**

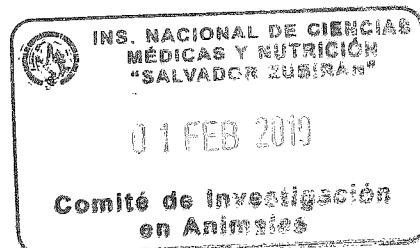
Presente.

En respuesta a la carta con fecha el día 17 de enero de 2019 acerca del proyecto “ESTUDIO *IN VITRO* E *IN VIVO* DE LA PARTICIPACIÓN DEL EJE ANGIOTENSINA-(1-7)/RECEPTOR MAS SOBRE LA DIFERENCIACIÓN DE ADIPOCITOS BEIGE EN UN MODELO DE OBESIDAD EN RATON” (PROTOCOLO FNU-1379-14/18-1), me permito explicarles el número de animales que se usaron para cada experimento que se llevó a cabo y se explicó en la carta del 11 de enero del 2019.

Para los estudios de los tratamientos agudos de captopril se hicieron los siguientes grupos:

Cepa de ratón	Dieta	Tratamiento	n
C57BL/6	AIN-93	Control (agua) por 24 horas	12
	AIN-93	Control (agua) por 48 horas	12
	AIN-93	Control (agua) por 72 horas	12
	AIN-93	Captopril 5 mg/kg por 24 horas	12
	AIN-93	Captopril 5 mg/kg por 48 horas	12
	AIN-93	Captopril 5 mg/kg por 72 horas	12
			Total: 72

Avenida Vasco de Quiroga No. 15  
Colonia Belisario Domínguez Sección XVI  
Delegación Tlalpan  
Código Postal 14080  
México, Distrito Federal  
Tel. (52)54870900  
www.incmnsz.mx





**INSTITUTO NACIONAL DE  
CIENCIAS MÉDICAS  
Y NUTRICIÓN  
SALVADOR ZUBIRÁN**

Para los estudios de los tratamientos agudos de angiotensina-(1-7) se hicieron los siguientes grupos:

Cepa de ratón	Dieta	Tratamiento	n
C57BL/6	AIN-93	Control (Salina) por 3 días	12
	AIN-93	Ang-(1-7) 300 mg/kg/min por 3 días	12
	HFSD	Control (Salina) por 3 días	12
	HFSD	Ang-(1-7) 300 mg/kg/min por 3 días	12
	HFSD	Ang-(1-7) 600 mg/kg/min por 3 días	12
	HFSD	Ang-(1-7) 1000 mg/kg/min por 3 días	12
			Total: 72

Para los estudios del Seahorse se utilizaron en total 140 ratones, de los cuales se extrajo la grasa subcutánea inguinal y se aislaron las células mesenquimales para estandarizar el proceso de diferenciación a adipocito en las placas de 96 pozos del Seahorse. Posteriormente se realizaron experimentos para estandarizar las concentraciones de los compuestos del kit MitoStress y por último se realizaron los experimentos en triplicado. Los tratamientos que se evaluaron son varias concentraciones de captopril, ang-(1-7), el control positivo de triiodotironina+pioglitazona y sus respectivos vehículos.



INSTITUTO NACIONAL DE  
CIENCIAS MÉDICAS  
Y NUTRICIÓN  
SALVADOR ZUBIRÁN

El total de ratones utilizados en los experimentos que se añadieron al protocolo 1379 fue de 284, entre los estudios de los tratamientos agudos y del Seahorse. Cabe señalar que estos procedimientos se llevaron a cabo durante los años 2016-2018, cuando no teníamos conocimiento acerca de los addendums, por lo que de ahora en adelante notificaremos en tiempo y forma al CICUAL acerca de los experimentos adicionales al protocolo original.

Sin más por el momento, agradezco el favor de su atención y me pongo a su disposición para cualquier aclaración.

Atentamente,

Dr. Armando Tovar Palacio  
Departamento de Fisiología de la Nutrición



INSTITUTO NACIONAL DE  
CIENCIAS MÉDICAS  
Y NUTRICIÓN  
SALVADOR ZUBIRÁN

Recibi  
Inmamoto  
220119



Ciudad de México, a 17 de enero de 2019.

DR. ARMANDO TOVAR PALACIO  
DEPTO. DE FISIOLÓGIA DE LA NUTRICIÓN  
Presente.

REF: CICUAL FNU-1379-14/18-1

Estimado Dr. Tovar:

Este comité ha dictaminado **NO APROBAR** el adendum, a su proyecto intitulado "ESTUDIO IN VITRO E IN VIVO DE LA PARTICIPACIÓN DEL EJE Ang-(1-7) RECEPTOR MAS SOBRE LA DIFERENCIACIÓN DE ADIPOCITOS BEIGE EN LA OBESIDAD", es necesario incluir el número de animales que se van a utilizar.

Sin más por el momento quedo de usted.

Atentamente,

Dra. Norma Bobadilla Sandoval  
Coordinadora del Comité Interno para el Cuidado y Uso de  
los Animales de Laboratorio.

2180 11:32  
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE  
SALVADOR  
DMSG

c.c.p. M.V.Z. Mariela Contreras Escamilla, Jefa del DIEB

NAB/nom

Avenida Vasco de  
Quiroga No. 15  
Colonia Belisario  
Dominguez Sección XVI  
Delegación Tlalpan  
Código Postal 14080  
Ciudad de México  
Tel. (52-55)54870900  
www.incmnsz.mx



**INSTITUTO NACIONAL DE  
CIENCIAS MÉDICAS  
Y NUTRICIÓN  
SALVADOR ZUBIRÁN**

Ciudad de México a 11 de enero del 2019

Comisión de Investigación en Animales del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición  
Salvador Zubirán,

PRESENTE:

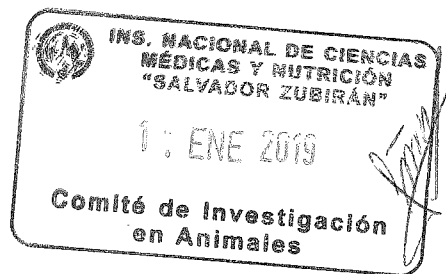
• Por este medio, me permito enviar este adendum a la Comisión de Investigación en Animales del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán sobre el protocolo experimental:

- "Estudio *in vitro* e *in vivo* de la participación del eje Ang-(1-7)/Receptor Mas sobre la diferenciación de adipocitos beige en un modelo de obesidad en ratón"

Con clave de protocolo FNU-1379-14/18-1

Durante el desarrollo de este protocolo, que forma parte de la tesis doctoral de mi alumna Ariana Elizabeth Vargas Castillo, hemos obtenido datos inesperados aunado a que conforme obtuvimos resultados, hemos tenido que ajustar los tiempos de los tratamientos evaluados, que nos han llevado a solicitar una mayor cantidad de animales, superando la cifra acordada para la aprobación del protocolo. Es por ello que me permito explicar a continuación, los puntos que nos llevaron a solicitar más animales.

Para los estudios crónicos de los ratones tratados con captopril y con angiotensina-(1-7), en el protocolo 1379 describimos un tratamiento de un mes, sin embargo, al medir los genes marcadores del browning, observamos en todos los grupos que la expresión de los genes ya se encontraba a la baja. Por lo tanto, probamos con tratamientos más cortos, es decir, durante 3 días. En consecuencia, tuvimos que solicitar otros ratones C57BL/6. Esta medida fue un éxito, ya que aprendimos que los genes del browning se pueden medir en tratamientos agudos y las proteínas para estudios crónicos.



Avenida Vasco de  
Quiroga No. 15  
Colonia Belisario  
Domínguez Sección XVI  
Delegación Tlalpan  
Código Postal 14080  
Ciudad de México  
Tel. (52-55)54870900  
www.incmnsz.mx



**INSTITUTO NACIONAL DE  
CIENCIAS MÉDICAS  
Y NUTRICIÓN  
SALVADOR ZUBIRÁN**

Para la administración de los tratamientos, se siguió la metodología descrita en el protocolo 1379, solamente que en lugar de 30 días de tratamiento, se hizo en 3 días.

Adicionalmente, se realizaron estudios en el equipo Seahorse para medir los efectos de los tratamientos, captopril y angiotensina-(1-7), sobre la respiración mitocondrial en los adipocitos diferenciados a partir de la fracción estromal de la grasa subcutánea de los ratones C57BL/6. Cabe mencionar que el equipo Seahorse llegó al laboratorio en el año 2017, que es posterior a la aprobación del protocolo y la información obtenida a partir de este equipo, es muy valiosa para complementar la hipótesis del proyecto. Para medir los efectos de los tratamientos en el Seahorse, inicialmente se estandarizó el cultivo primario de los adipocitos diferenciados a partir de las células del estroma vascular en las placas de 96 pozos especiales para el equipo Seahorse (cuyo tamaño de pozo es aún menor que una placa de 96 pozos convencional); esto significó un reto para mi alumna, dado que a través de ensayos de prueba y error fue afinando el cultivo. Posterior a la estandarización del cultivo, se tuvo que estandarizar la concentración de los compuestos que se utilizan en el ensayo MitoStress, que consiste en interrumpir varias proteínas de la cadena respiratoria. Debido a esto, se tuvo que pedir en varias ocasiones ratones C57BL/6. Dado que este tipo de experimentos es la primera vez que se hacen en el laboratorio, optamos por preguntar a los asesores de la empresa para que nos orientaran, sin embargo ninguno pudo proporcionarnos información sobre este tipo de cultivo primario. Es por ello que nos tomó un tiempo y varios ratones, poder obtener los resultados.

Para la obtención del tejido para hacer el cultivo, los ratones se sacrificaron mediante una sobredosis de sevoflurano y se disectó el área inguinal de cada lado de las patas para obtener el tejido adiposo subcutáneo. Posteriormente, el tejido se disgregó en una solución de colagenasa al 0.1% por 35 min a 37°C en agitación, se filtró y se centrifugó a 1400 rpm por 15 min, seguido de 2 lavados. Finalmente, el pellet de células corresponden al estroma vascular y se sembraron en un flask de 25 cm<sup>2</sup> con la finalidad de expandir las células y tener suficientes para completar los experimentos.



**INSTITUTO NACIONAL DE  
CIENCIAS MÉDICAS  
Y NUTRICIÓN  
SALVADOR ZUBIRÁN**

Finalmente, agradezco su apoyo al proporcionar los animales para haber completado los experimentos de ambos protocolos. Agradezco el favor de su atención y me pongo a sus órdenes para cualquier aclaración.

Atentamente

Dr. Armando Tovar Palacio

Jefe del Departamento de Fisiología de la Nutrición





**INSTITUTO NACIONAL DE  
CIENCIAS MÉDICAS  
Y NUTRICIÓN  
SALVADOR ZUBIRÁN**

Ciudad de México a 10 de enero del 2019

Comisión de Investigación en Animales del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición  
Salvador Zubirán,

**PRESENTE:**

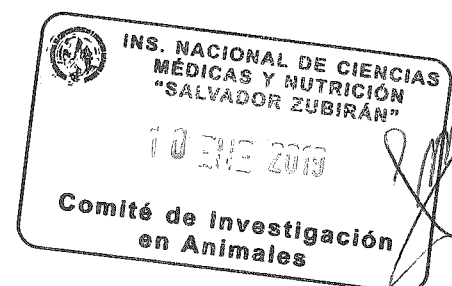
Por este medio, me permito enviar este adendum a la Comisión de Investigación en Animales del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán sobre dos protocolos experimentales:

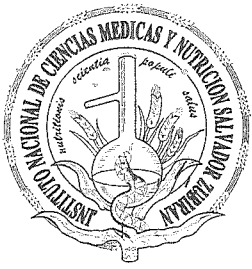
- "Estudio in vitro e in vivo de la participación del eje Ang-(1-7)/Receptor Mas sobre la diferenciación de adipocitos beige en un modelo de obesidad en ratón"  
Con clave de protocolo **FNU-1379-14/18-1**
- Efecto de la Angiotensina-(1-7) sobre la diferenciación de adipocitos beige en ratones knock out del receptor Mas y en ratas que sobreexpresan Angiotensina-(1-7).  
Con clave de protocolo **FNU-1811-16/19-1**

Durante el desarrollo de estos protocolos, que forman parte de la tesis doctoral de mi alumna Ariana Elizabeth Vargas Castillo, han surgido más interrogantes, hemos ajustado los tiempos de los tratamientos, por lo tanto, se incrementaron la cantidad de grupos, o bien, hemos obtenido datos inesperados que nos han llevado a solicitar una mayor cantidad de animales, que supera a la cifra acordada para la aprobación de ambos protocolos. Es por ello que me permito explicar los puntos que nos llevaron a solicitar una mayor cantidad de animales.

Para los estudios crónicos de los ratones tratados con captopril y con Angiotensina-(1-7), en el protocolo indicamos un tratamiento de 1 mes, sin embargo, al medir la expresión de los genes marcadores del browning, observamos que en todos los grupos ya se encontraban en cantidades muy pequeñas. Por lo tanto, probamos con tratamientos más cortos, es decir, durante 3

Avenida Vasco de  
Quiroga No. 15  
Colonia Belisario  
Dominguez Sección XVI  
Delegación Tlalpan  
Código Postal 14080  
Ciudad de México  
Tel. (52-55)54870900  
www.incmnsz.mx





**INSTITUTO NACIONAL DE  
CIENCIAS MÉDICAS  
Y NUTRICIÓN  
SALVADOR ZUBIRÁN**

Esto significó un incremento en la cantidad de ratones C57BL/6 (protocolo 1379) y de ratones KO del receptor Mas (protocolo 1811). Esta medida fue un éxito, ya que aprendimos que los genes del browning se pueden medir en tratamientos agudos y las proteínas para estudios crónicos. Para la administración de los tratamientos, se siguió la metodología descrita en ambos protocolos, solamente en lugar de 30 días de tratamiento, se hizo en 3 días.

Adicionalmente, se realizaron estudios en el equipo Seahorse para medir los efectos de los tratamientos, captopril y angiotensina-(1-7), sobre la respiración mitocondrial en los adipocitos diferenciados a partir de la grasa subcutánea de los ratones C57BL/6 (protocolo 1379) y de ratones KO del receptor Mas (protocolo 1811). Cabe mencionar que el equipo Seahorse llegó al laboratorio en el año 2017, que es posterior a la aprobación de ambos protocolos y la información obtenida a partir de este equipo, es muy valiosa para complementar la hipótesis del proyecto. Para poder medir los efectos de los tratamientos en el Seahorse, inicialmente se tuvo que estandarizar el cultivo primario de los adipocitos diferenciados a partir de las células del estroma vascular en las placas de 96 pozos del Seahorse (cuyo tamaño de pozo es aún menor que una placa de 96 pozos convencional); esto significó un reto para mi alumna, dado que a través de ensayos de prueba y error fue afinando el cultivo. Posterior a la estandarización del cultivo, se tuvo que estandarizar la concentración de los compuestos que se utilizan en el ensayo MitoStress, que consiste en interrumpir varias proteínas de la cadena respiratoria. Debido a esto, se tuvo que pedir en varias ocasiones ratones de ambos protocolos. Dado que este tipo de experimentos es la primera vez que se hacen en el laboratorio, optamos por preguntar a los asesores de la empresa para que nos orientaran, sin embargo ninguno pudo proporcionarnos información sobre este tipo de cultivo primario. Es por ello que nos tomó un tiempo y varios ratones, poder obtener los resultados. Para la obtención del tejido para hacer el cultivo, los ratones se sacrificaron mediante una sobredosis de sevoflurano y se disectó el área inguinal de cada lado de las patas para obtener el tejido adiposo subcutáneo. Posteriormente, el tejido se disgregó en una solución de colagenasa a 0.1% por 35 min a 37°C, se filtró y se centrifugó a 1400 rpm por 15 min, seguido de 2 lavados. Finalmente, el pellet de células corresponden al estroma vascular y se sembraron en flask de 25 cm<sup>2</sup> con la finalidad de expandir las células y tener suficientes para hacer los experimentos.

Avenida Vasco de  
Quiroga No. 15  
Colonia Belisario  
Domínguez Sección XVI  
Delegación Tlalpan  
Código Postal 14080  
Ciudad de México  
Tel. (52-55)54870900  
www.incmnsz.mx



**INSTITUTO NACIONAL DE  
CIENCIAS MÉDICAS  
Y NUTRICIÓN  
SALVADOR ZUBIRÁN**

Por otra parte, encontramos que el estudio llevado a cabo en ratas nos dejó varias dudas sobre si los animales que sobreexpresan la Ang-(1-7) tienen mayor browning que una rata Wild type, por lo que tuvimos que darles un estímulo para activar el fenómeno de manera natural, en este caso, fue el frío. Por lo tanto, solicitamos más ratas transgénicas que sobreexpresan Angiotensina-(1-7), del protocolo 1811, para hacer un estudio en el cuarto frío durante 3 y 24 horas. Al final, obtuvimos un dato inesperado, pero muy interesante que nos ha ayudado a completar la historia de lo que ocurre en el estudio de las ratas.

Para el estudio en el cuarto frío, las ratas se colocaron en jaulas individuales en un cuarto frío a 4°C por 3 y otras por 24 horas. El bienestar de las ratas fue monitoreando constantemente, se vigiló que los animales no manifesten señales de automutilación, anorexia, deshidratación, hiperactividad, postración o sueño prolongado o comportamiento agresivo – defensivo. Transcurrido el tiempo en el cuarto frío, las ratas se sacrificaron escalonadamente mediante una sobredosis de sevoflurano. Se obtuvo el hígado, músculo esquelético, el tejido adiposo visceral (gonadal y retroperitoneal) y subcutáneo localizado en la zona inguinal e intercostal de todos los grupos, así como tejido adiposo pardo. Las muestras se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -70°C hasta el día de las determinaciones.

Finalmente, agradezco su apoyo al proporcionar los animales para haber completado los experimentos de ambos protocolos. Agradezco el favor de su atención y me pongo a sus órdenes para cualquier aclaración.

Atentamente

Dr. Armando Tovar Palacio

Jefe del Departamento de Fisiología de la Nutrición

Avenida Vasco de  
Quiroga No. 15  
Colonia Belisario  
Domínguez Sección XVI  
Delegación Tlalpan  
Código Postal 14080  
Ciudad de México  
Tel. (52-55)54870900  
www.incmnsz.mx



INSTITUTO NACIONAL DE  
CIENCIAS MÉDICAS  
Y NUTRICIÓN  
SALVADOR ZUBIRÁN

"2014, Año de Octavio Paz"

Acuse

México, D. F., a 10 de Diciembre del 2014.

Recibi  
Peto 12/12/2014

Dr. Armando Tovar Palacio  
Depto. de Fisiología de la Nutrición  
Presente.

REF.: CINVA 1379, Clave FNU-1379-14/18-1

Estimado Dr. Tovar:

Habiendo dado respuesta de manera satisfactoria a todas las observaciones de su Protocolo de Investigación Experimental titulado:

"ESTUDIO IN VITRO E IN VIVO DE LA PARTICIPACIÓN DEL EJE Ang-(1-7) RECEPTOR MAS SOBRE LA DIFERENCIACIÓN DE ADIPOCITOS BEIGE EN LA OBESIDAD."

Este comité ha dictaminado **aprobarlo** a partir de esta fecha.

Sin más por el momento quedo de usted.

Atentamente,

Dra. Norma A. Bobadilla Sandoval  
Coordinadora de la Comisión de Investigación en Animales

Atovar  
Recibi Original  
Dr. Armando Tovar  
c.c.p. Dr. Gerardo Gamba, Director de Investigación  
Dra. Ma. Elena Flores, Encargada del Bioterio

16/12/14

INS. NACIONAL DE CIENCIAS  
MÉDICAS Y NUTRICIÓN  
"SALVADOR ZUBIRÁN"  
15 DIC 2014  
DIRECCIÓN DE  
INVESTIGACIÓN



B79  
México, D.F. a 2 de diciembre de 2014

**Dra. Norma A. Bobadilla Sandoval**  
Coordinadora de la Comisión de Investigación en Animales  
Presente.

**Estimada Dra. Bobadilla:**

A continuación le respondo cada punto que solicitó después de analizar el Protocolo de Investigación Experimental titulado:

**“Estudio *in vitro* e *in vivo* de la participación del eje Ang-(1-7)/Receptor Mas sobre la diferenciación de adipocitos beige en la obesidad”**

**a) Es necesario justificar el tamaño de muestra.**

Dado que el tema de investigación es nuevo, sería la primera vez que se estudia al sistema renina angiotensina en el proceso de browning, por lo tanto, se tomó como referencia los datos de las gráficas del artículo de Zhang y cols, 2014, para calcular el tamaño de muestra. En dicho estudio, utilizaron como estímulo a la irisina, que es un péptido capaz de inducir el browning y se cuantificó con la medición de varios genes característicos del fenotipo pardo, algunos de esos genes también se medirán en este proyecto, tales como el gen UCP-1, Tmem26 y Cidea.

Para calcular el tamaño de la muestra, se empleó la fórmula para comparación de medias:

$$n = \frac{2s^2(Z\alpha + Z\beta)^2}{\Delta^2}$$

Donde:

$n$  = el valor del tamaño de la muestra

$s$  = varianza

$Z\alpha = 1.96$

$Z\beta = 0.84$

$\Delta$  = diferencia de magnitud entre medias de los tratamientos (amplitud).

Después de aplicar la fórmula con un error alfa de 0.05 y un poder del 80% con los datos de los 3 genes, se calculó una  $n$  de 1, 10 y 15, respectivamente para cada gene. Con la finalidad de reducir el número de animales, se tomará en cuenta un valor de muestra de 10 ratones de la cepa C57BL/6 para cada grupo experimental de este proyecto.

**b) En relación a la toma de muestra de sangre del corazón, explicar cómo se realizará, no menciona que se hará bajo anestesia.**

Transcurridos los 4 meses del estudio, los ratones serán sacrificados mediante la inhalación de  $\text{CO}_2$  dentro de una cámara dedicada a este procedimiento. Inmediatamente, se tomarán muestras de sangre por punción cardíaca a través de una incisión en la cavidad torácica, para posteriormente separar el plasma y cuantificar parámetros bioquímicos como la glucosa, triglicéridos, colesterol HDL y LDL, mediante pruebas enzimáticas (únicamente se hará punción cardíaca el día del sacrificio, después de haber sacrificado al animal).

**c) El título debería incluir la especie animal con la que se va a trabajar.**

El título quedaría así:

Recibi  
Caf. 3/12/14

“Estudio *in vitro* e *in vivo* de la participación del eje Ang-(1-7)/Receptor Mas sobre la diferenciación de adipocitos beige en un modelo de obesidad en ratón”.

- d) **Investigadores participantes:** Únicamente se encuentran el Dr. Armando Tovar (como investigador principal) y la Dra. Nimbe Torres (como investigador asociado). Favor de incluir todos los investigadores que van a participar y especificar los nombres de los estudiantes que estarán vinculados al protocolo.

Hemos agregado a la alumna que desarrollará el estudio, M. en C. Ariana Elizabeth Vargas Castillo y al Dr. Enrique Hong, del Cinvestav-sur como investigador asociado, dado que es co-tutor de la alumna en dicha institución.

- e) **No se menciona el patrocinio del estudio.**

El proyecto será financiado con el presupuesto del Departamento de Fisiología de la Nutrición.

- f) **Vigencia del protocolo:** en la propuesta se indica en la página 13, inciso G que durará 3 meses, sin embargo en la página 10 indica que la fecha estimada de inicio será el 01/09/2014 y de fin el 29/08/2018. El manual del CINVA especifica que lo máximo serán tres años. Se solicita corregir el periodo del estudio.

La duración del estudio será de 7/1/2015- 7/1/2018.

- g) **Se recomienda detallar la dieta a utilizar y no únicamente especificar que será una dieta modificada a partir de las recomendaciones del AIN aumentando la composición de grasa (¿qué tipo de grasa?, ¿será hipercalórica e hiperlipídica? ¿Si es isocalórica, qué nutrimento van a reducir?)**

Para el grupo control (Tratamiento A), se utilizará una dieta con caseína al 20% (dieta AIN-93) de acuerdo a las recomendaciones del AIN (American Institute of Nutrition) y el grupo obeso (Tratamiento B), desarrollará obesidad inducida por dieta (OID) durante un periodo de 4 meses, los ratones consumirán una dieta basada en la dieta estándar (AIN-93), pero modificada con un porcentaje alto en grasa saturada (16.5%), la cual se preparará en el laboratorio. La dieta es hipercalórica, el componente incrementado es la manteca (grasa saturada) y el componente reducido son los carbohidratos: almidón, maltodextrina y sacarosa.

Componentes	Dieta control	Componentes	OID
L-Cisteína	0.3	L-Cisteína	0.35
Colina	0.25	Colina	0.25
Vitaminas	1	Vitaminas	1
Celulosa	5	Celulosa	5
Minerales	3.5	Minerales	3.5
Aceite de soya	7	Aceite de soya	7
Almidón	39.7	Almidón	26.42
Maltodextrina	13.2	Maltodextrina	8.78
Sacarosa	10	Sacarosa	6.65
Caseína	20	Caseína	24.55
TOTAL	99.95	Manteca	16.5
		TOTAL	100

- h) Se plantea tener un grupo de dieta control, otro llamado obeso y luego cuatro más de obesos más un fármaco, ¿por qué no utilizan los grupos control respectivos con los diferentes fármacos para ver el efecto *per se* del fármaco sin obesidad?

Se han agregado los respectivos grupos que recibirán dieta control y los distintos tratamientos, de 6 grupos propuestos inicialmente, ahora en total serían 10 grupos:

1. Tratamiento A (Control, dieta estándar)
2. Tratamiento B (Obeso, dieta alta en grasa saturada)
3. Tratamiento C (Control + Captopril 40 mg/kg)
4. Tratamiento D (Control + Losartan 10 mg/kg)
5. Tratamiento E (Control + Ang-(1-7) 560 µg/kg/día)
6. Tratamiento F (Obeso + Captopril 40 mg/kg)
7. Tratamiento G (Obeso + Losartan 10 mg/kg)
8. Tratamiento H (Obeso + Ang-(1-7) 560 µg/kg/día)
9. Tratamiento I (Control + Tratamiento + A779 24 µg/kg/día)
10. Tratamiento J (Obeso + Tratamiento + A779 24 µg/kg/día)

- i) Favor de especificar el procedimiento de la prueba de tolerancia oral a la glucosa. ¿De dónde se hará la toma de muestra sanguínea? ¿Los animales serán anestesiados?

La prueba de tolerancia oral a la glucosa se realiza en animales con ayuno de 8 h. Inicialmente se toma una muestra de glucosa sanguínea basal a partir de un piquete con una aguja en la punta de la cola, únicamente se toma una gota de sangre y se coloca en una tira reactiva de glucosa (que será cuantificada por un glucómetro). Los animales no serán anestesiados, ya que al tomar la muestra de esta manera aunado a una adecuada manipulación, se evita el estrés de los animales. Posteriormente, se administra una carga de glucosa (dosis: 3 g/kg) por vía intraperitoneal (el volumen de administración será de 0.01 ml/g) y durante cada media hora dentro de un lapso de 2 h se cuantificará la glucosa sanguínea, únicamente se removerá la costra (formada en la punta de la cola por el piquete, y se hará un masaje ligero para extraer una gota de sangre. La glucosa sanguínea se cuantificará a través de tiras reactivas y un glucómetro.

- j) En el protocolo se especifica que se tomarán muestras de sangre por punción cardíaca para posteriormente separar el plasma y cuantificar parámetros bioquímicos. ¿Esto se hará el día del sacrificio? ¿Los animales estarán anestesiados?

Transcurridos los 4 meses del estudio, los ratones serán sacrificados mediante la inhalación de CO<sub>2</sub> dentro de una cámara dedicada a este procedimiento. Inmediatamente, se tomarán muestras de sangre por punción cardíaca a través de una incisión en la cavidad torácica, para posteriormente separar el plasma y cuantificar parámetros bioquímicos como la glucosa, triglicéridos, colesterol HDL y LDL, mediante pruebas enzimáticas (únicamente se hará punción cardíaca el día del sacrificio, después de haber sacrificado al animal).

- k) Los criterios de selección de protocolo están mal redactados. Dice "A) Ser ratones macho... B) Ser ratones hembra... C) Se eliminarán del estudio los ratones que no aumenten de peso que presenten un bajo peso, en comparación con los ratones que reciban dieta esta". A) son los de inclusión B) son los animales de exclusión y C) seguramente van a aumentar de peso por crecimiento, los investigadores se refieren a que si no aumentan de peso en la dieta alta en grasa en comparación con los de la dieta control, sin embargo, con los diferentes fármacos ¿se espera que no aumenten de peso? ¿Si no aumentan los eliminarán?

A) Como criterio de inclusión se tomarán en cuenta: ratones machos de la cepa C57BL/6 de cuatro semanas de edad, de peso entre 15-17 g.

B) Como criterio de exclusión se tomará en cuenta: ratones hembra de la cepa C57BL/6.

C) Como criterio de eliminación se tomará en cuenta: ratones C57BL/6 que no aumenten de peso después de recibir la dieta alta en grasa los primeros 3 meses del periodo de inducción de obesidad, en comparación con los ratones que reciban dieta estándar. En cuanto a los tratamientos, se administrarán durante el último mes de la inducción de obesidad, es decir, al 4to mes y sí se espera que no suban mucho de peso durante ese mes, pero durante los primeros 3 meses deben de incrementar de peso los ratones que reciban la dieta alta en grasa en comparación con los ratones que reciban la dieta estándar.

**l) Corregir sintasa de óxido nítrico endotelial en lugar de epitelial.**

Se ha corregido en la sección de antecedentes.

**m) Corregir el protocolo experimental, dado que se repite dos veces.**

Se ha corregido el protocolo experimental.

**n) Describir criterios de punto final y disposición de cadáveres.**

**Criterios de punto final**

Se tomará en cuenta que los tratamientos a evaluar tienen un efecto modesto en la reducción del peso corporal, por lo que es de esperar que éste, cambie, aunque no más de un 20%. Además, las dosis a utilizar, son las que mayormente se reportan en la literatura en ratón y no se ha reportado un efecto tóxico. Sin embargo, como criterios de punto final, se pueden considerar ciertas variables, por ejemplo: el peso corporal, cambios en la conducta motora, el consumo de alimento, el consumo de agua, la temperatura, que presente convulsiones o hemorragias, entre otras. La escala será la siguiente y se asignará un score final al cuantificar los valores asignados a cada variable.

0 si es normal.

1 si el parámetro en cuestión se ve ligeramente alterado

2 si está afectado

3 si está muy afectado.

Cuando un score sea de 3 en alguna variable o que en total sumen  $>5$  como score final, se considerará que al animal habrá que hacerle la eutanasia (asfixia con  $\text{CO}_2$ )

**Disposición de cadáveres**

Los cadáveres de los animales se almacenarán en bolsas amarillas para residuos sólidos patológicos y se llevarán a un congelador destinado para el desecho de dichos residuos, para posteriormente ser entregados a la empresa contratada para su manejo posterior.

**o) Especificar si los animales permanecerán en el bioterio durante todo el estudio.**

Los animales permanecerán en el bioterio durante todo el tiempo del experimento.

Hemos corregido lo solicitado en el Sistema de Latis y en el Formato rápido de apoyo para la solicitud de proyectos.

Sin más por el momento, quedo a sus órdenes.

Atentamente,



**Dr. Armando Roberto Tovar Palacio**  
Jefe del Departamento de Fisiología de la Nutrición





INCMNSZ  
DIRECCIÓN DE NUTRICIÓN

14 OCT 2014

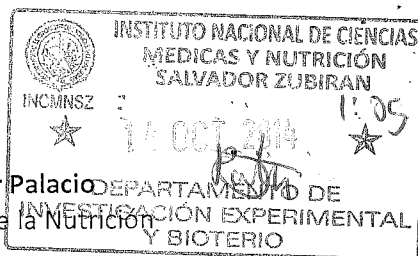
14 OCT 2014

DEPARTAMENTO DE  
FISIOLOGÍA DE LA NUTRICIÓN

*Acuse*

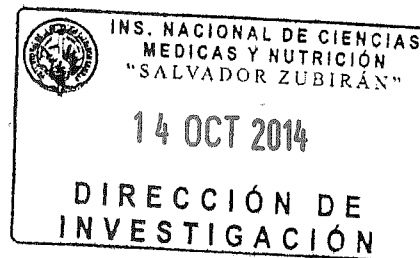
"2014, Año de Octavio Paz"

INSTITUTO NACIONAL DE  
CIENCIAS MÉDICAS  
Y NUTRICIÓN  
SALVADOR ZUBIRÁN



México, D. F., a 13 de octubre del 2014.

Dr. Armando R. Tovar Palacio  
Depto. de Fisiología de la Nutrición  
Presente.



Estimado Dr. Tovar:

Habiendo analizado detalladamente el Protocolo de Investigación Experimental titulado:

"Estudio in vitro e in vivo de la participación del eje Ang-(1-7)/Receptor Mas sobre la diferenciación de adipocitos beige en la obesidad."

Este comité ha dictaminado dejar **Pendiente** la aprobación hasta que se aclaren los siguientes puntos:

- Es necesario justificar el tamaño de muestra.
- En relación a la toma de muestra de sangre del corazón, explicar cómo se realizará, no menciona que se hará bajo anestesia.
- El título debería incluir la especie animal con la que se va a trabajar.
- Investigadores participantes: Únicamente se encuentran el Dr. Armando Tovar (como investigador principal) y la Dra. Nimbe Torres (como investigador asociado). Favor de incluir todos los investigadores que van a participar y especificar los nombres de los estudiantes que estarán vinculados al protocolo.
- No se menciona el patrocinio del estudio.
- Vigencia del protocolo: en la propuesta se indica en la página 13, inciso G que durará 3 meses, sin embargo en la página 10 se indica que la fecha estimada de inicio será el 01/09/2014 y de fin el 29/08/2018. El manual del CINVA especifica que lo máximo serán 3 años. Se solicita corregir el periodo del estudio.
- Se recomienda detallar la dieta a utilizar y no únicamente especificar que será una dieta modificada a partir de las recomendaciones del AIN aumentando la composición de grasa (¿qué tipo de grasa?, ¿será hipercalórica e hiperlipídica? ¿Si es isocalórica, qué nutrimento van a reducir?
- Se plantea tener un grupo con dieta control, otro llamado obeso y luego cuatro más de obesos más un fármaco, ¿por qué no utilizan los grupos control respectivos con los diferentes fármacos para ver el efecto *per se* del fármaco sin obesidad?
- Favor de especificar el procedimiento de la prueba de tolerancia oral a la glucosa. ¿De dónde se hará la toma de muestra sanguínea? ¿los animales serán anestesiados?.



INSTITUTO NACIONAL DE  
CIENCIAS MÉDICAS  
Y NUTRICIÓN  
SALVADOR ZUBIRÁN

- j) En el protocolo se especifica que se tomarán muestras de sangre por punción cardiaca para posteriormente separar el plasma y cuantificar parámetros bioquímicos. ¿Esto se hará el día del sacrificio? ¿Los animales estarán anestesiados?
- k) Los criterios de selección de protocolo están mal redactados. Dice "A) Ser ratones macho... B) ser ratones hembra... C) se eliminarán del estudio los ratones que no aumenten de peso o que presenten un bajo peso, en comparación con los ratones que reciban dieta esta.", A) son los de inclusión B) son los animales de exclusión y C) son los animales de eliminación. Además, los ratones son muy jóvenes, seguramente van a aumentar de peso por crecimiento, los investigadores se refieren a que si no aumentan de peso en la dieta alta en grasa en comparación con los de la dieta control, sin embargo, con los diferentes fármacos ¿se espera que no aumenten de peso? ¿Si no aumentan los eliminarán?
- l) Corregir Sintasa de óxido nítrico endotelial en lugar de epitelial
- m) Corregir el protocolo experimental, dado que se repite dos veces.
- n) Describir criterios de punto final y disposición de cadáveres.
- o) Especificar si los animales permanecerán en el bioterio durante todo el estudio.

Es importante que las correcciones las haga en el Sistema de Latis y envíe una carta especificando la respuesta a cada punto solicitado.

Su proyecto queda registrado en esta Institución como **CINVA 1379**, Clave: **FNU-1379-14/18-1**.

Sin más por el momento quedo de usted.

Atentamente,

Dra. Norma A. Bobadilla Sandoval  
Coordinadora de la Comisión de Investigación en Animales

c.c.p. Dr. Gerardo Gamba, Director de Investigación  
Dra. Ma. Elena Flores, Jefe del Bioterio

	<b>INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN</b>  <b>SALVADOR ZUBIRAN</b>  Dirección de Investigación  <b>FORMA ÚNICA PARA REGISTRO DE PROYECTOS</b>
--	---

**FECHA DE RECEPCIÓN:** 21/08/2014

**CLAVE:** FNU-1379-14/18-1

**TÍTULO:** Estudio in vitro e in vivo de la participación del eje Ang-(1-7)/Receptor Mas sobre la diferenciación de adipocitos beige en la obesidad

**INVESTIGADOR RESPONSABLE:** TOVAR PALACIO ARMANDO ROBERTO

**DEPARTAMENTO O SERVICIO:** DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGIA DE LA NUTRICIÓN

**TIPO DE INVESTIGACIÓN:** INVESTIGACIÓN EXPERIMENTAL

**PATROCINADORES:**

Patrocinador	Cantidad
--------------	----------



**VIGENCIA DEL PROYECTO:** Del 01/09/2014 al 29/08/2018

Trimestre 1

Trimestre 2

Trimestre 3

Trimestre 4

COSTO TOTALES DE LA INVESTIGACIÓN		INSTITUCIONES PARTICIPANTES	
Personal	\$ 0.00		
(sueldos y sobresueldos al personal)			
Equipos	\$ 0.00		
(de laboratorio, cómputo, transporte, etc.)		FIRMAS	
Materiales	\$ 0.00	Investigador responsable	Jefe de Departamento
(reactivos, consumibles, desechables, etc.)			
Animales	\$ 0.00	Comité de Investigación en Humanos	Comité de Investigación en Animales
(adquisición, cuidado, procedimientos, etc.)			
Estudios	\$ 0.00	Director de Investigación	Director General
(de laboratorio, gabinete, especiales, etc.)			
Viaticos	\$ 0.00	Fecha de resolución	
(reuniones científicas y trabajo de campo)			
Publicaciones	\$ 0.00		
costo directos de publicación, sobregiro)			

Suscripciones	\$ 0.00
libros, revistas, software, periódicos, etc)	
Varios	\$ 0.00
(teléfono, fax, fotocopias, mensajería, etc)	
Admon. Gastos pacientes	\$ 0.00
Fondo de apoyo	\$ 0.00
15% de la cantidad total del proyecto	
Total :	\$ 0.00



FORMATO DE APOYO PARA LA EVALUACIÓN DE PROTOCOLOS POR LA CINVA DEL INCMNSZ.

No. CINVA:  
CLAVE:

Fecha de registro del Protocolo:

Título del Protocolo: "Estudio *in vitro* e *in vivo* de la participación del eje Ang-(1-7)/Receptor Mas sobre la diferenciación de adipocitos beige en un modelo de obesidad en ratón"

Propuesta: a) Nueva      b) Renovación

Investigador Responsable del Proyecto.	
Nombre del Investigador Titular	Dr. Armando Roberto Tovar Palacio
Institución de Adscripción	Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán"
Departamento de Adscripción	Fisiología de la Nutrición
Teléfono	55-56553038
Correo electrónico	tovar.ar@gmail.com

Investigadores que Participaran en el Protocolo			
Nombre	Grado	Teléfono	e-mail
Nimbe Torres y Torres	Doctora	56553038	Ø
Enrique Hong Chong	Doctor	54832864	ehong@cinvestav.mx

Estudiantes			
Nombre	Grado a obtener	Teléfono	e-mail
Ø	Doctora	55-48703947	Ø

Vigencia del Proyecto.			
Fecha de inicio del proyecto	7	enero	2015
Fecha tentativa de finalización.	7	enero	2018

PROTOCOLO PARA EL USO DE ANIMALES EN INVESTIGACIÓN.

- 1) Institución en donde se realizará el proyecto.  
Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán"



## FORMATO DE APOYO PARA LA EVALUACIÓN DE PROTOCOLOS POR LA CINVA DEL INCMNSZ.

### 2) Objetivos generales y específicos del protocolo:

#### Objetivo general.

Determinar la participación y el mecanismo potencial mediante el cual el eje Ang-(1-7)/Receptor Mas pueda estar influyendo en el fenómeno de diferenciación de adipocitos beige en un modelo *in vitro* y en un modelo *in vivo* de obesidad en ratón.

#### Objetivos específicos.

1. Evaluar el efecto del captopril y losartan sobre el peso corporal, la ingesta calórica, la tolerancia a la glucosa y el gasto energético en un modelo de obesidad en ratón inducido por dieta (OID) alta en grasa.
2. Determinar el efecto del captopril y losartan sobre la concentración sistémica y local (plasma y tejido adiposo subcutáneo, respectivamente) de la Ang-(1-7) y Ang II mediante la técnica de electroforesis capilar.
3. Determinar el efecto del captopril y/o losartan, vía el receptor Mas, sobre la diferenciación de adipocitos blancos a beige mediante el estudio de la morfología y tamaño de adipocitos subcutáneos a través de análisis histológicos y de microscopía electrónica.
4. Determinar el efecto del captopril y/o losartan, vía el receptor Mas, sobre la diferenciación del adipocito blanco a beige mediante la cuantificación de la expresión del ARNm de PPAR $\gamma$ , genes "brown like" y genes específicos de los adipocitos beige a través de la técnica de PCR en tiempo real.
5. Determinar el efecto del captopril y/o losartan, vía el receptor Mas, sobre la diferenciación del adipocito blanco a beige mediante la cuantificación de la expresión proteica de PPAR $\gamma$ , UCP-1 y Tbx1 a través de la técnica de Western blot.
6. Determinar el efecto del captopril y/o losartan, vía el receptor Mas y activación de la NOS $_3$  sobre la diferenciación del adipocito blanco a beige mediante la cuantificación de la actividad de la NOS y la cantidad de nitritos a partir del tejido adiposo subcutáneo.

### 3) Justificación del experimento y los procedimientos en el uso de animales:

Existe evidencia experimental de la relación entre los adipocitos pardos y beige respecto a la obesidad. Se conoce que los animales con mayor cantidad de adipocitos pardos y beige son más resistentes al desarrollo de obesidad y diabetes tipo 2. De manera opuesta, los animales con menos adipocitos pardos y carentes de receptores  $\beta$ -adrenérgicos son más susceptibles a desarrollar ambas enfermedades. Por lo tanto, investigar los mecanismos que incrementen la actividad de adipocitos pardos y beige, o bien aumenten la diferenciación de adipocitos beige constituye un nuevo campo de estudio para las nuevas alternativas de tratamiento de la obesidad.

Existen varios estímulos capaces de activar la diferenciación de adipocitos beige, tales como el frío y la estimulación  $\beta_3$ -adrenérgica, sin embargo esta última no fue exitosa en los ensayos clínicos. Por otra parte, hay información en la literatura que sugiere que el SRA tiene influencia la diferenciación de adipocitos beige, aunque no ha sido demostrado experimentalmente. Primeramente, hay que tomar en cuenta que existe un SRA local en el tejido adiposo. Segundo, el eje Ang-(1-7)/Receptor Mas es capaz de activar PPAR $\gamma$ , el cual es necesario para la diferenciación y activación de los adipocitos beige. Tercero, la Ang-(1-7) puede liberar ON vía el receptor Mas, el ON promueve la génesis mitocondrial y activa a los adipocitos pardos. Por lo



## FORMATO DE APOYO PARA LA EVALUACIÓN DE PROTOCOLOS POR LA CINVA DEL INCMNSZ.

tanto, en este trabajo se propone que el eje Ang-(1-7)/Receptor Mas está participando en la diferenciación de adipocitos beige y en parte podría explicar el efecto de los inhibidores de la ECA y los antagonistas del receptor AT<sub>1</sub> sobre la disminución del peso y el mejoramiento de la sensibilidad a la insulina.

El fenómeno de diferenciación a adipocitos beige implica un mecanismo de reprogramación genómica. Este mecanismo podría ser utilizado como estrategia terapéutica que prevenga el desarrollo excesivo de adipocitos blancos y aumente la cantidad de adipocitos beige. Por lo tanto, entender los mecanismos moleculares de diferenciación a estas células constituye un tema de importancia en la salud humana dada la creciente prevalencia de la obesidad y diabetes tipo 2 a nivel nacional y mundial. Aprovechando la plasticidad de los adipocitos blancos y beige, y su capacidad única para cambiar de fenotipo y función, se estudiará si el eje Ang-(1-7)/Receptor Mas induce la diferenciación de adipocitos beige y por lo tanto incrementa la cantidad de adipocitos beige.

#### 4) Clasificación del proyecto de acuerdo al nivel de invasividad en los animales.

##### **Categoría A**

Experimentos o ejercicios de enseñanza que involucran animales invertebrados, embriones de vertebrados, huevos embrionados de aves o de reptiles hasta antes del 90% de su total desarrollo, órganos aislados, tejidos y células vivas.

##### **Categoría B.**

Experimentos o ejercicios de enseñanza que se espera produzcan poca o ninguna angustia, incomodidad o dolor en especies animales vertebradas.

##### **Categoría C**

Experimentos o ejercicios de enseñanza que provocan angustia leve, molestia o dolor leve de corta duración en animales vertebrados. Los procedimientos dentro de esta categoría representan una atención adicional en proporción del nivel y la duración de las molestias, la angustia o el dolor inevitables. Los ejercicios de enseñanza que involucran procedimientos dentro de esta categoría requieren de una fuerte justificación de sus objetivos académicos.

##### **Categoría D**

Experimentos que provocan angustia, molestia o dolor significativo e inevitable en especies vertebradas. Los experimentos en esta categoría exigen la responsabilidad explícita del investigador para buscar diseños experimentales que aseguren que las molestias, la angustia o el dolor del animal se minimicen o se eliminen.

##### **Categoría E**

Procedimientos que involucran infligir angustia severa o dolor, por encima del umbral de tolerancia, en animales vertebrados conscientes, no anestesiados. Los experimentos en esta categoría no se aprobarán sin la justificación completa, profunda y detallada por parte del investigador responsable del proyecto.

Para mas información consultar: [www.ccac.ca/Documents/Standards/Guidelines/Spanish/ANEX15B.pdf](http://www.ccac.ca/Documents/Standards/Guidelines/Spanish/ANEX15B.pdf)

Categoría:	A:	B: X	C:	D:	E:
------------	----	------	----	----	----

#### 5) Justificación de la cantidad de animales participantes en el estudio tomando en cuenta los principios básicos de las tres "R's", remplazo, reducción y refinamiento.

**Para mayor información consultar:**

<http://ec.europa.eu/health/opinions/en/non-human-primates/glossary/tuv/three-rs-principle.htm>



**FORMATO DE APOYO PARA LA EVALUACIÓN DE PROTOCOLOS POR LA CINVA DEL INCMNSZ.**

Se ha tomado la decisión de utilizar ratones, dado que el proyecto inicialmente se realizará en células adiposas para ver si los tratamientos evaluados promueven la diferenciación de adipocitos blancos a beige, sin embargo, es de suma importancia evaluar los compuestos en un modelo *in vivo* de obesidad, debido a que esta enfermedad involucra varios sistemas y está relacionada con otras patologías como la resistencia a la insulina y la hipertensión; un organismo completo puede proveer un ambiente más complejo y real, a diferencia de un tejido, donde se observarían los efectos de manera directa, sin la influencia de otros sistemas. Además, queremos saber si los tratamientos promueven una disminución de peso, un mejoramiento en la tolerancia a la glucosa y un aumento del gasto energético. Adicionalmente, en la literatura científica, para este tipo de estudios se utilizan ratones y principalmente de la cepa C57BL/6.

Los animales no serán sometidos a estrés crónico y únicamente para 2 grupos experimentales (de 10 grupos) habrá un procedimiento invasivo (colocación de una mini bomba osmótica de infusión vía subcutánea), en el que previamente serán anestesiados.

**6)** Describir como se realizará la transportación o movilización de los animales experimentales, en caso de ser necesario.

No se requerirá el transporte o movilización de animales.

**7)** Mencione el número y las especies animales, así como el género que serán usados en las actividades de este protocolo.

Género – Especie.	Cantidad	Rango de peso	Rango de edad	Sexo
<i>Mus musculus</i> (cepa C57BL/6)	100	20-25 g	3-4 semanas	machos
No. de Grupos experimentales:		10		
No. de animales por grupo:		10		
No. TOTAL DE ANIMALES:		100		

**8)** Especificar el tiempo que permanecerán los animales en el bioterio.

Los animales permanecerán en el bioterio aproximadamente seis meses.

**9)** Procedimientos que se realizarán con los animales.

Procedimiento	NO	SI	Frecuencia, cantidad y vía.
Restricción de agua y/o alimento por más de 8 horas.	X		
Toma de muestra sanguínea.		X	Una vez inmediatamente después del sacrificio mediante punción





**FORMATO DE APOYO PARA LA EVALUACIÓN DE PROTOCOLOS POR LA CINVA DEL INCMNSZ.**

			cardíaca para cuantificar parámetros bioquímicos
Colocación de cánula.	X		
Técnica para modificar conducta.	X		
Inoculaciones de agentes.		X	Tratamiento por un mes de Ang-(1-7) o A779 (compuestos peptídicos) mediante mini bombas osmóticas de infusión por vía subcutánea.
Procedimientos quirúrgicos con recuperación.		X	Tratamiento por un mes de Ang-(1-7) o A779 (compuestos peptídicos) mediante mini bombas osmóticas de infusión por vía subcutánea.
Procedimientos quirúrgicos sin recuperación.	X		
Uso de adyuvantes (indicar cuál)	X		
Estudios LD50 o ID50	X		
Restricción física (máximo 6 horas)	X		
Restricción física (menos de 6 horas)	X		
Confinamiento o aislamiento		X	Únicamente durante la prueba de calorimetría, se mantendrán solos en una jaula durante un día.
Producción de anticuerpos monoclonales o policlonales.	X		
Inducción de lesiones	X		
Agentes teratogénicos o carcinogénicos	X		
Sustancias químicas tóxicas	X		
Implantes	X		
Estudios estereotáxicos.	X		
Otros:			

10) Describir detalladamente los procedimientos a realizar incluyendo material, sujeción, vías de administración o toma de muestra, frecuencia, número de veces de muestreo, volumen de aplicación y volumen de toma de muestra, etc.

Los ratones C57BL/6 se dividirán en 10 grupos:

Tratamiento A (Control): Dieta con caseína al 20% (AIN-93) de acuerdo a las recomendaciones del AIN (American Institute of Nutrition).

Componentes	Dieta control
L-Cisteína	0.3
Colina	0.25
Vitaminas	1
Celulosa	5
Minerales	3.5
Aceite de soya	7
Almidón	39.7
Maltodextrina	13.2



## FORMATO DE APOYO PARA LA EVALUACIÓN DE PROTOCOLOS POR LA CINVA DEL INCMNSZ.

Sacarosa	10
Caseína	20
TOTAL	99.95

Tratamiento B (Obeso): El grupo que desarrollará obesidad inducida por dieta (OID) durante un periodo de 4 meses, los ratones consumirán una dieta basada en la dieta estándar (AIN-93), pero modificada con un porcentaje alto en grasa (17%), la cual se preparará en el laboratorio. La dieta es hipercalórica, el componente incrementado es la grasa saturada (manteca) y el componente reducido son los carbohidratos: almidón, maltodextrina y sacarosa.

Componentes	OID
L-Cisteína	0.35
Colina	0.25
Vitaminas	1
Celulosa	5
Miñerales	3.5
Aceite de soya	7
Almidón	26.42
Maltodextrina	8.78
Sacarosa	6.65
Caseína	24.55
Manteca	16.5
TOTAL	100

Tratamiento C (Control + Captopril 40 mg/kg): Los ratones recibirán la dieta estándar (AIN-93) por 4 meses, durante el último mes recibirán el tratamiento con captopril, el cual será administrado en el agua de beber (vía oral).

Tratamiento D (Control + Losartan 10 mg/kg) Los ratones recibirán la dieta estándar (AIN-93) por 4 meses, durante el último mes recibirán el tratamiento con Losartan, el cual será administrado en el agua de beber (vía oral).

Tratamiento E (Control + Ang-(1-7) 560 µg/kg/día): Los ratones recibirán la dieta estándar (AIN-93) por 4 meses, durante el último mes recibirán el tratamiento con Ang-(1-7), la cual será infundida mediante mini bombas osmóticas por vía subcutánea. La Ang-(1-7) es un compuesto peptídico, es por ello el uso de las bombas de infusión.

Tratamiento F (Obeso + Captopril 40 mg/kg): Los ratones consumirán una dieta basada en la dieta estándar (AIN-93), pero modificada con un porcentaje alto en grasa (17%). Durante el último mes del periodo de inducción de obesidad, los ratones recibirán el tratamiento con Captopril, el cual será administrado en el agua de beber (vía oral).

Tratamiento G (Obeso + Losartan 10 mg/kg) Los ratones consumirán una dieta basada en la dieta estándar (AIN-93), pero modificada con un porcentaje alto en grasa (17%). Durante el último mes del periodo de inducción de obesidad, los ratones recibirán el tratamiento con Losartan, el cual será administrado en el agua de beber (vía oral).

Tratamiento H (Obeso + Ang-(1-7)-560 µg/kg/día): Los ratones consumirán una dieta basada en la dieta estándar (AIN-93), pero modificada con un porcentaje alto en grasa (17%). Durante el último mes del periodo de inducción de obesidad, los ratones recibirán el tratamiento con Ang-(1-7), la cual será infundida mediante mini bombas osmóticas por vía subcutánea. La Ang-(1-7)



## FORMATO DE APOYO PARA LA EVALUACIÓN DE PROTOCOLOS POR LA CINVA DEL INCMNSZ.

es un compuesto peptídico, es por ello el uso de las bombas de infusión.

Tratamiento I y J (Obeso): Después del análisis de los grupos control y obeso tratados con captopril, control y obeso tratados con losartan y control y obeso tratados con Ang-(1-7), se determinará qué tratamiento promueve mejor la diferenciación de adipocitos blancos a beige y se continuará con la siguiente fase experimental para determinar *in vivo* si es mediado vía receptor Mas con los grupos Tratamiento I: Control + Tx + A779 (24 µg/kg/día) y Tratamiento J: Obeso + Tx + A779 (24 µg/kg/día). En estos grupos, el antagonista del receptor Mas (A779) se administrará mediante mini-bombas osmóticas de infusión durante las últimas 4 semanas del periodo de inducción de obesidad. El antagonista del receptor Mas es un compuesto peptídico, es por ello, el uso de las bombas de infusión.

La implantación de las mini bombas de infusión (ALZET®) se realizará en la parte posterior a la escápula de los ratones, con previa anestesia con una dosis de ketamina/xilacina vía intraperitoneal. El volumen máximo de administración por vía intraperitoneal será de 0.02 ml/g.

Todos los grupos experimentales tendrán acceso a beber agua *ad libitum*. Durante el tiempo de inducción de la obesidad, se tendrá un registro del peso corporal semanal, de la ingesta calórica y al término se realizará una prueba de tolerancia oral a la glucosa (PTOG) y una prueba en el calorímetro.

La prueba de tolerancia oral a la glucosa se realiza en animales con ayuno de 8 h. Inicialmente se toma una muestra de glucosa sanguínea basal a partir de un piquete con una aguja en la punta de la cola, únicamente se toma una gota de sangre y se coloca en una tira reactiva de glucosa (que será cuantificada por un glucómetro). Posteriormente, se administra una carga de glucosa (dosis: 2 g/kg) por vía intragástrica (el volumen de administración será de 0.1 ml/g) utilizando una cánula de metal y durante cada media hora dentro de un lapso de 2 h se cuantificará la glucosa sanguínea, únicamente se removerá la costra (formada en la punta de la cola por el piquete, y se hará un masaje ligero para extraer una gota de sangre. La glucosa sanguínea se cuantificará a través de tiras reactivas y un glucómetro.

Adicionalmente, los roedores se someterán a una prueba de calorimetría, la cual consiste en medir constantemente el consumo total de oxígeno ( $VO_2$ ) y la producción de dióxido de carbono ( $VCO_2$ ). Estas mediciones se utilizarán para calcular la oxidación de los carbohidratos y de las grasas utilizando el coeficiente de intercambio respiratorio ( $RER = VCO_2/VO_2$ ), así como la cantidad de calor producido en kcal/hr. Para este experimento, los animales se colocan de manera individual en jaulas durante 24 horas.

- 11) Si el protocolo incluye la restricción de movimiento de los animales consientes, indique el grado y tiempo de inmovilización y los dispositivos para lograrlo.

Los animales no se privarán de movimiento, ni se les inmovilizará.

- 12) Agentes analgésicos, anestésicos y/o tranquilizantes que se utilizarán.

Especie	Agente	Dosis	Vía de admón.	Frecuencia.
Ratón	Ketamina	90 mg/kg	intraperitoneal	1 vez
	Xilacina	10 mg/kg		



## FORMATO DE APOYO PARA LA EVALUACIÓN DE PROTOCOLOS POR LA CINVA DEL INCMNSZ.

- 13) ¿Qué parámetros empleará para conocer el grado de Anestesia o analgesia del agente a utilizar?

Se considerará que el animal está anestesiado cuando no haya una reacción (reflejo) ante un pellizco de cola (gentilmente se genera presión en la porción proximal de la cola, puede ser con los dedos o con una pinza). Otra técnica consiste en pellizcar las garras, ya sea con los dedos o con pinza, un animal anestesiado no debe tener una respuesta de retiro de la pata.

Además, puede considerarse que permanezca en posición decúbito dorsal sin moverse y que las vibrisas no estén en movimiento.

También se monitorean los signos vitales, dado que la frecuencia cardíaca y respiratoria se incrementan si no está anestesiado.

- 14) Cuando el protocolo incluya procedimientos invasivos (cirugías) especificar los cuidados pre y post-operatorios (utilización de antibióticos, analgésicos, limpieza y desinfección).

La única intervención quirúrgica que se llevaría a cabo es la implantación de la mini bomba osmótica de infusión en la parte dorsal del ratón (vía subcutánea) únicamente en dos grupos experimentales.

Como medida pre-operatoria, se preparará un área limpia para llevar a cabo el procedimiento quirúrgico, los instrumentos se esterilizarán, el estudiante deberá portar guantes limpios, cubrebocas y tomará medidas antisépticas en todo momento.

Se preparará al roedor de la siguiente manera: se removerá el pelo en el lugar que se vaya a implantar la mini bomba osmótica. Luego se limpiará el área con un algodón y alcohol para retirar el pelo excedente y debris de la piel.

Posteriormente, se procederá a anestesiarse a los roedores utilizando una mezcla de ketamina y xilacina (90 mg/kg y 10 mg/kg, respectivamente). Se comprobará si el animal realmente está anestesiado mediante pellizco de la cola y de las patas, en ausencia de retiro y tomando en cuenta que el ritmo cardíaco y respiración no se encuentren acelerados, se considerará que el animal está bajo anestesia.

Como medida post-operatoria, los animales se colocarán en un área de recuperación limpia. Además, se colocará una lámpara (que emite calor) para mantener la temperatura corporal de los ratones, habrá que monitorear que no se quemen. Los animales en recuperación no estarán en el mismo lugar que los animales despiertos. El estudiante supervisará que el animal vuelva en sí, una vez que los animales estén despiertos y ambulatorios, se pueden dejar solos.

- 15) Evaluación de signos de dolor de su proyecto piloto.

Los parámetros generales a observar son:

- Cambios en peso corporal
- Apariencia física: pilo-erección, posturas indicativas de dolor, etc.
- Comportamiento: aparición de comportamientos estereotipados, agresividad, cambios en comportamiento social...
- Respuesta a estímulos externos
- Signos clínicos:
  - i. Respiración: normal, laboriosa...
  - ii. Temperatura
  - iii. Temblores
  - iv. Convulsiones
  - v. Descarga nasal, salivación



## FORMATO DE APOYO PARA LA EVALUACIÓN DE PROTOCOLOS POR LA CINVA DEL INCMNSZ.

Escala: 0 si es normal, 1 si el parámetro en cuestión se ve ligeramente alterado, 2 si está afectado y 3 si está muy afectado.

Parámetro	0	1	2	3
a) Peso corporal		X		
b) Apariencia	X			
c) Signos clínicos (Temp., FC., FR., etc.)	X			
d) Conducta espontánea.	X			
e) Conducta provocada.	X			

### 16) ¿Cuáles serán los criterios para establecer el "punto final humanitario"?

#### Criterios de punto final

Basándose en los parámetros seleccionados para evaluar la condición del animal hay que determinar en que momento se procederá a la eutanasia humanitaria del mismo. Los parámetros observados pueden "cuantificarse" asignando valores arbitrarios según la gravedad que presenten.

#### a. Variación de peso corporal:

1. Aceptable una disminución del 5-10%
2. Moderada del 10-20%
3. Substancial > al 20% (criterio de punto final).

#### b. Los valores como la postura, piloerección, comportamiento social etc., pueden valorarse según la-escala:

1. 0 si es normal.
2. 1 si el parámetro en cuestión se ve ligeramente alterado
3. 2 si está afectado
4. 3 si está muy afectado.

Hay que tener en cuenta que no existe un criterio de punto final adaptable a todos los procedimientos y es el **Investigador Responsable** del experimento el que, basándose en observaciones de ensayos piloto o por datos de experimentos similares ya publicados, debe confeccionar su propio protocolo de determinación de punto final de manera que cumpla la normativa vigente en cuanto a protección de los animales utilizados en experimentación y por otra se evite la pérdida de datos del estudio.

Se tomará en cuenta que los tratamientos a evaluar tienen un efecto modesto en la reducción del peso corporal, por lo que es de esperar que éste, cambie, aunque no más de un 20%. Además, las dosis a utilizar, son las que mayormente se reportan en la literatura en ratón y no se ha reportado un efecto tóxico. Sin embargo, como criterios de punto final, se pueden considerar ciertas variables, por ejemplo: el peso corporal, cambios en la conducta motora, el consumo de alimento, el consumo de agua, la temperatura, que presente convulsiones o hemorragias, entre otras. La escala será la siguiente y se asignará un score final al cuantificar los valores asignados a cada variable.

- 0 si es normal.
- 1 si el parámetro en cuestión se ve ligeramente alterado
- 2 si está afectado
- 3 si está muy afectado.

Cuando un score sea de 3 en alguna variable o que en total sumen >5 como score final, se considerará que al animal habrá que hacerle la eutanasia (asfixia con CO<sub>2</sub>)



FORMATO DE APOYO PARA LA EVALUACIÓN DE PROTOCOLOS POR LA CINVA DEL INCMNSZ.

17) ¿Cuál será el método de eutanasia que utilizará?

El método de eutanasia a utilizar será el de asfixia con CO<sub>2</sub> dentro de una cámara dedicada a este procedimiento.

Recomendaciones para el Sacrificio Humanitario de los Animales de Experimentación.			
Especie	Método	Dosis	Via
Ratón	Pentobarbital <del>Asfixia con CO<sub>2</sub></del> X	210 mg/kg	IV, IP
Rata	Pentobarbital Asfixia con CO <sub>2</sub>	120 mg/kg	IV, IP
Jerbo	Pentobarbital Asfixia con CO <sub>2</sub>	270 mg/kg	IV, IP
Conejo	Pentobarbital Pistola de perno cautivo Asfixia con CO <sub>2</sub>	120 mg/kg	IV, IP
Cerdo	Pentobarbital	90 mg/kg	IV
Rana	Pentobarbital	100 mg/kg	IP

\* Método aceptado únicamente bajo ciertas condiciones establecidas por el comité. Su aplicación requiere una justificación científica por parte del Investigador Responsable

18) El protocolo representa riesgo biológico?

~~a) No~~                      b) Si

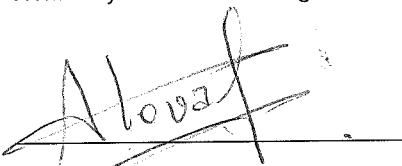
Si la respuesta es afirmativa, defina el Nivel de Bioseguridad para Animales (ABSL) requerido. Se recomienda consultar la clasificación del Center for Disease Control and Prevention.  
[http://www.cdc.gov/biosafety/publications/bmb15/BMBL5\\_sect\\_V.pdf](http://www.cdc.gov/biosafety/publications/bmb15/BMBL5_sect_V.pdf)

19) ¿Cuál será el destino final de los animales utilizados en el proyecto experimental?

Los cadáveres de los animales se almacenarán en bolsas amarillas para residuos sólidos patológicos y se llevarán a un congelador destinado para el desecho de dichos residuos, para posteriormente ser entregados a la empresa contratada para su manejo posterior.

Me comprometo a conducir mi proyecto de Investigación de acuerdo con los lineamientos éticos y humanitarios que rigen la experimentación con animales, así como cumplir los aspectos relativos al cuidado, manejo y uso de los animales de laboratorio que se describen en la NOM-062-ZOO-1999.

Nombre y firma del Investigador Responsable

  
Dr. Armando Roberto Tovar Palacio



FORMATO DE APOYO PARA LA EVALUACIÓN DE PROTOCOLOS POR  
LA CINVA DEL INCMNSZ.

Integrantes de la CINVA	Cargo	Firma
Dra. Norma Bobadilla Sandoval	Coordinadora	
Dr. Jorge Alberto Barrios Payán	Secretario	
M. en C. Octavio Villanueva Sánchez	Vocal	
Dra. Elena Zambrano González	Vocal	
Dr. Alejandro Zentella Dehesa	Vocal	
Dra. Nimbe Torres y Torres	Vocal	
Dr. Gonzalo Torres Villalobos	Vocal	
Dra. María Elena Flores Carrasco	Vocal Externo	



FORMATO DE APOYO PARA LA EVALUACIÓN DE PROTOCOLOS POR LA CINVA DEL INCMNSZ.

No. CINVA:  
CLAVE:

Fecha de registro del Protocolo:

**Título del Protocolo:** "Estudio in vitro e in vivo de la participación del eje Ang-(1-7)/Receptor Mas sobre la diferenciación de adipocitos beige en la obesidad"

Propuesta: a) Nueva b) Renovación

Investigador Responsable del Proyecto.	
Nombre del Investigador Titular	Dr. Armando Roberto Tovar Palacio
Institución de Adscripción	Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán"
Departamento de Adscripción	Fisiología de la Nutrición
Teléfono	55-56553038
Correo electrónico	tovar.ar@gmail.com

Investigadores que Participaran en el Protocolo			
Nombre	Grado	Teléfono	e-mail
Nimbe Torres y Torres	Doctora	56553038	○
Enrique Hong Chong	Doctor	54832864	ehong@cinvestav.mx

Estudiantes			
Nombre	Grado a obtener	Teléfono	e-mail
CE	Doctora	55-48703947	Ô

Vigencia del Proyecto.			
Fecha de inicio del proyecto	1	Agosto	2014
Fecha tentativa de finalización.	1	Agosto	2018

PROTOCOLO PARA EL USO DE ANIMALES EN INVESTIGACIÓN.

1) Institución en donde se realizará el proyecto.  
Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán"

2) Objetivos generales y específicos del protocolo:  
**Objetivo general.**  
Determinar la participación y el mecanismo potencial mediante el cual el eje Ang-(1-7)/Receptor Mas pueda estar influyendo en el fenómeno de diferenciación de adipocitos beige en un modelo *in vitro* y en un modelo *in vivo* de obesidad.





## FORMATO DE APOYO PARA LA EVALUACIÓN DE PROTOCOLOS POR LA CINVA DEL INCMNSZ.

### Objetivos específicos.

1. Evaluar el efecto del captopril y losartan sobre el peso corporal, la ingesta calórica, la tolerancia a la glucosa y el gasto energético en un modelo de obesidad inducido por dieta (OID) alta en grasa.
2. Determinar el efecto del captopril y losartan sobre la concentración sistémica y local (plasma y tejido adiposo subcutáneo, respectivamente) de la Ang-(1-7) y Ang II mediante la técnica de electroforesis capilar.
3. Determinar el efecto del captopril y/o losartan, vía el receptor Mas, sobre la diferenciación de adipocitos blancos a beige mediante el estudio de la morfología y tamaño de adipocitos subcutáneos a través de análisis histológicos y de microscopía electrónica.
4. Determinar el efecto del captopril y/o losartan, vía el receptor Mas, sobre la diferenciación del adipocito blanco a beige mediante la cuantificación de la expresión del ARNm de PPAR $\gamma$ , genes "brown like" y genes específicos de los adipocitos beige a través de la técnica de PCR en tiempo real.
5. Determinar el efecto del captopril y/o losartan, vía el receptor Mas, sobre la diferenciación del adipocito blanco a beige mediante la cuantificación de la expresión proteica de PPAR $\gamma$ , UCP-1 y Tbx1 a través de la técnica de Western blot.
6. Determinar el efecto del captopril y/o losartan, vía el receptor Mas y activación de la NOS, sobre la diferenciación del adipocito blanco a beige mediante la cuantificación de la actividad de la NOS y la cantidad de nitritos a partir del tejido adiposo subcutáneo.

### 3) Justificación del experimento y los procedimientos en el uso de animales:

Existe evidencia experimental de la relación entre los adipocitos pardos y beige respecto a la obesidad. Se conoce que los animales con mayor cantidad de adipocitos pardos y beige son más resistentes al desarrollo de obesidad y diabetes tipo 2. De manera opuesta, los animales con menos adipocitos pardos y carentes de receptores  $\beta$ -adrenérgicos son más susceptibles a desarrollar ambas enfermedades. Por lo tanto, investigar los mecanismos que incrementen la actividad de adipocitos pardos y beige, o bien aumenten la diferenciación de adipocitos beige constituye un nuevo campo de estudio para las nuevas alternativas de tratamiento de la obesidad.

Existen varios estímulos capaces de activar la diferenciación de adipocitos beige, tales como el frío y la estimulación  $\beta_3$ -adrenérgica, sin embargo esta última no fue exitosa en los ensayos clínicos. Por otra parte, hay información en la literatura que sugiere que el SRA tiene influencia la diferenciación de adipocitos beige, aunque no ha sido demostrado experimentalmente. Primeramente, hay que tomar en cuenta que existe un SRA local en el tejido adiposo. Segundo, el eje Ang-(1-7)/Receptor Mas es capaz de activar PPAR $\gamma$ , el cual es necesario para la diferenciación y activación de los adipocitos beige. Tercero, la Ang-(1-7) puede liberar ON vía el receptor Mas, el ON promueve la génesis mitocondrial y activa a los adipocitos pardos. Por lo tanto, en este trabajo se propone que el eje Ang-(1-7)/Receptor Mas está participando en la diferenciación de adipocitos beige y en parte podría explicar el efecto de los inhibidores de la ECA y los antagonistas del receptor AT $_1$  sobre la disminución del peso y el mejoramiento de la sensibilidad a la insulina.

El fenómeno de diferenciación a adipocitos beige implica un mecanismo de reprogramación genómica. Este mecanismo podría ser utilizado como estrategia terapéutica que prevenga el



## FORMATO DE APOYO PARA LA EVALUACIÓN DE PROTOCOLOS POR LA CINVA DEL INCMNSZ.

desarrollo excesivo de adipocitos blancos y aumente la cantidad de adipocitos beige. Por lo tanto, entender los mecanismos moleculares de diferenciación a estas células constituye un tema de importancia en la salud humana dada la creciente prevalencia de la obesidad y diabetes tipo 2 a nivel nacional y mundial. Aprovechando la plasticidad de los adipocitos blancos y beige, y su capacidad única para cambiar de fenotipo y función, se estudiará si el eje Ang-(1-7)/Receptor Mas induce la diferenciación de adipocitos beige y por lo tanto incrementa la cantidad de adipocitos beige.

#### 4) Clasificación del proyecto de acuerdo al nivel de invasividad en los animales.

##### **Categoría A**

Experimentos o ejercicios de enseñanza que involucran animales invertebrados, embriones de vertebrados, huevos embrionados de aves o de reptiles hasta antes del 90% de su total desarrollo, órganos aislados, tejidos y células vivas.

##### **Categoría B.**

Experimentos o ejercicios de enseñanza que se espera produzcan poca o ninguna angustia, incomodidad o dolor en especies animales vertebradas.

##### **Categoría C**

Experimentos o ejercicios de enseñanza que provocan angustia leve, molestia o dolor leve de corta duración en animales vertebrados. Los procedimientos dentro de esta categoría representan una atención adicional en proporción del nivel y la duración de las molestias, la angustia o el dolor inevitables. Los ejercicios de enseñanza que involucran procedimientos dentro de esta categoría requieren de una fuerte justificación de sus objetivos académicos.

##### **Categoría D**

Experimentos que provocan angustia, molestia o dolor significativo e inevitable en especies vertebradas. Los experimentos en esta categoría exigen la responsabilidad explícita del investigador para buscar diseños experimentales que aseguren que las molestias, la angustia o el dolor del animal se minimicen o se eliminen.

##### **Categoría E**

Procedimientos que involucran infligir angustia severa o dolor, por encima del umbral de tolerancia, en animales vertebrados conscientes, no anestesiados. Los experimentos en esta categoría no se aprobarán sin la justificación completa, profunda y detallada por parte del investigador responsable del proyecto.

Para mas información consultar: [www.ccac.ca/Documents/Standards/Guidelines/Spanish/ANEX15B.pdf](http://www.ccac.ca/Documents/Standards/Guidelines/Spanish/ANEX15B.pdf)

Categoría:	A:	B: X	C:	D:	E:
------------	----	------	----	----	----

#### 5) Justificación de la cantidad de animales participantes en el estudio tomando en cuenta los principios básicos de las tres "R's", remplazo, reducción y refinamiento.

##### **Para mayor información consultar:**

<http://ec.europa.eu/health/opinions/en/non-human-primates/glossary/tuv/three-rs-principle.htm>

Se ha tomado la decisión de utilizar ratones, dado que el proyecto inicialmente se realizará en células adiposas para ver si los tratamientos evaluados promueven la diferenciación de adipocitos blancos a beige, sin embargo, es de suma importancia evaluar los compuestos en un modelo *in vivo* de obesidad, debido a que esta enfermedad involucra varios sistemas y está relacionada con otras patologías como la resistencia a la insulina y la hipertensión; un organismo completo puede proveer un ambiente más complejo y real, a diferencia de un tejido, donde se observarían los



**FORMATO DE APOYO PARA LA EVALUACIÓN DE PROTOCOLOS POR LA CINVA DEL INCMNSZ.**

efectos de manera directa, sin la influencia de otros sistemas. Además, queremos saber si los tratamientos promueven una disminución de peso, un mejoramiento en la tolerancia a la glucosa y un aumento del gasto energético. Adicionalmente, en la literatura científica, para este tipo de estudios se utilizan ratones y principalmente de la cepa C57BL/6.

Los animales no serán sometidos a estrés crónico y únicamente para 2 grupos experimentales (de 6 grupos) habrá un procedimiento invasivo (colocación de una mini bomba osmótica de infusión vía subcutánea), en el que previamente serán anestesiados.

- 6) Describir como se realizará la transportación o movilización de los animales experimentales, en caso de ser necesario.

No se requerirá el transporte o movilización de animales.

- 7) Mencione el número y las especies animales, así como el género que serán usados en las actividades de este protocolo.

Género – Especie.	Cantidad	Rango de peso	Rango de edad	Sexo
<i>Mus musculus</i> (cepa C57BL/6)	48	20-25 g	3-4 semanas	machos
No. de Grupos experimentales:		6		
No. de animales por grupo:		8		
No. TOTAL DE ANIMALES:		48		

- 8) Especificar el tiempo que permanecerán los animales en el bioterio.

Los animales permanecerán en el bioterio aproximadamente seis meses.

- 9) Procedimientos que se realizarán con los animales.

Procedimiento	NO	SI	Frecuencia, cantidad y vía.
Restricción de agua y/o alimento por más de 8 horas.	X		
Toma de muestra sanguínea.		X	Una vez inmediatamente después del sacrificio mediante punción cardíaca para cuantificar parámetros bioquímicos
Colocación de cánula.	X		
Técnica para modificar conducta.	X		
Inoculaciones de agentes.		X	Tratamiento por un mes de Ang-(1-7) o A779 (compuestos peptídicos) mediante mini bombas osmóticas de infusión por vía subcutánea.
Procedimientos quirúrgicos con recuperación.		X	Tratamiento por un mes de Ang-(1-7) o A779 (compuestos peptídicos) mediante mini bombas osmóticas de infusión por vía



**FORMATO DE APOYO PARA LA EVALUACIÓN DE PROTOCOLOS POR LA CINVA DEL INCMNSZ.**

			subcutánea.
Procedimientos quirúrgicos sin recuperación.	X		
Uso de adyuvantes (indicar cuál)	X		
Estudios LD50 o ID50	X		
Restricción física (máximo 6 horas)	X		
Restricción física (menos de 6 horas)	X		
Confinamiento o aislamiento		X	Únicamente durante la prueba de calorimetría, se mantendrán solos en una jaula durante un día.
Producción de anticuerpos monoclonales o policlonales.	X		
Inducción de lesiones	X		
Agentes teratogénicos o carcinogénicos	X		
Sustancias químicas tóxicas	X		
Implantes	X		
Estudios estereotáxicos.	X		
Otros:			

- 10) Describir detalladamente los procedimientos a realizar incluyendo material, sujeción, vías de administración o toma de muestra, frecuencia, número de veces de muestreo, volumen de aplicación y volumen de toma de muestra, etc.

Los ratones C57BL/6 se dividirán inicialmente en 4 grupos:

- i) Control (C) recibirá una dieta estándar basada en las recomendaciones de la AIN (American Institute of Nutrition).
- ii) El grupo que desarrollará obesidad inducida por dieta (OID): durante un periodo de 4 meses, los ratones consumirán una dieta basada en la dieta estándar, pero modificada con un porcentaje alto en grasa, la cual se preparará en el laboratorio.

Los grupos con tratamiento serán:

- iii) El grupo obeso+captopril (40 mg/kg) (OID+C): Durante el último mes del periodo de inducción de obesidad, los ratones recibirán el tratamiento con captopril, el cual será administrado en el agua de beber (vía oral).
- iv) El grupo obeso+losartan (10 mg/kg) (OID+L): Durante el último mes del periodo de inducción de obesidad, los ratones recibirán el tratamiento con losartan, el cual será administrado en el agua de beber (vía oral).
- v) El grupo obeso+Ang-(1-7) (560 µg/kg/día): Durante el último mes del periodo de inducción de obesidad, los ratones recibirán el tratamiento con Ang-(1-7), la cual será infundida mediante mini bombas osmóticas por vía subcutánea. La Ang-(1-7) es un compuesto peptídico, es por ello el uso de las bombas de infusión.
- vi) Después del análisis de los grupos iii) obeso+captopril, iv)obeso +losartan y v) obeso+Ang-(1-7), se determinará qué tratamiento promueve mejor la diferenciación de andipocitos blancos a beige y se continuará con la siguiente fase experimental para determinar *in vivo* si es mediado vía receptor Mas con el grupo vi) obeso + Tx + A779 (24 µg/kg/día) (OID + Tx + A779). En este grupo, el antagonista del receptor Mas (A779) se administrará mediante mini-bombas osmóticas de infusión durante las últimas 4 semanas del periodo de inducción de obesidad. El antagonista del receptor Mas es un compuesto peptídico, es por ello, el uso de las bombas de infusión.

La implantación de las mini bombas de infusión (ALZET®) se realizará en la parte posterior a la escápula de los ratones, con previa anestesia con una dosis de ketamina/xilacina vía intraperitoneal. El volumen máximo de administración por vía intraperitoneal será de 0.02 ml/g.



## FORMATO DE APOYO PARA LA EVALUACIÓN DE PROTOCOLOS POR LA CINVA DEL INCMNSZ.

Todos los grupos experimentales tendrán acceso a beber agua *ad libitum*. Durante el tiempo de inducción de la obesidad, se tendrá un registro del peso corporal semanal, de la ingesta calórica y al término se realizará una prueba de tolerancia oral a la glucosa (PTOG) y una prueba en el calorímetro.

La prueba de tolerancia oral a la glucosa se realiza en animales con ayuno de 8 h. Inicialmente se toma una muestra de glucosa sanguínea basal a partir de un piquete con una aguja en la punta de la cola, únicamente se toma una gota de sangre y se coloca en una tira reactiva de glucosa (que será cuantificada por un glucómetro). Posteriormente, se administra una carga de glucosa (dosis: 2 g/kg) por vía intragástrica (el volumen de administración será de 0.1 ml/g) utilizando una cánula de metal y, durante cada media hora dentro de un lapso de 2 h se cuantificará la glucosa sanguínea, únicamente se removerá la costra (formada en la punta de la cola por el piquete, y se hará un masaje ligero para extraer una gota de sangre. La glucosa sanguínea se cuantificará a través de tiras reactivas y un glucómetro.

Adicionalmente, los roedores se someterán a una prueba de calorimetría, la cual consiste en medir constantemente el consumo total de oxígeno ( $VO_2$ ) y la producción de dióxido de carbono ( $VCO_2$ ). Estas mediciones se utilizarán para calcular la oxidación de los carbohidratos y de las grasas utilizando el coeficiente de intercambio respiratorio ( $RER = VCO_2/VO_2$ ), así como la cantidad de calor producido en kcal/hr. Para este experimento, los animales se colocan de manera individual en jaulas durante 24 horas.

- 11) Si el protocolo incluye la restricción de movimiento de los animales consientes, indique el grado y tiempo de inmovilización y los dispositivos para lograrlo.

Los animales no se privarán de movimiento, ni se les inmovilizará.

- 12) Agentes analgésicos, anestésicos y/o tranquilizantes que se utilizarán.

Especie	Agente	Dosis	Vía de admón.	Frecuencia.
Ratón	Ketamina	90 mg/kg	intraperitoneal	1 vez
	Xilacina	10 mg/kg		

- 13) ¿Qué parámetros empleará para conocer el grado de Anestesia o analgesia del agente a utilizar?

Se considerará que el animal está anestesiado cuando no haya una reacción (reflejo) ante un pellizco de cola (gentilmente se genera presión en la porción proximal de la cola, puede ser con los dedos o con una pinza). Otra técnica consiste en pellizcar las garras, ya sea con los dedos o con pinza, un animal anestesiado no debe tener una respuesta de retiro de la pata.

Además, puede considerarse que permanezca en posición decúbito dorsal sin moverse y que las vibrisas no estén en movimiento.

También se monitorean los signos vitales, dado que la frecuencia cardiaca y respiratoria se incrementan si no está anestesiado.



**FORMATO DE APOYO PARA LA EVALUACIÓN DE PROTOCOLOS POR LA CINVA DEL INCMNSZ.**

- 14) Cuando el protocolo incluya procedimientos invasivos (cirugías) especificar los cuidados pre y post-operatorios (utilización de antibióticos, analgésicos, limpieza y desinfección).

La única intervención quirúrgica que se llevaría a cabo es la implantación de la mini bomba osmótica de infusión en la parte dorsal del ratón (vía subcutánea) únicamente en dos grupos experimentales.

Como medida pre-operatoria, se preparará un área limpia para llevar a cabo el procedimiento quirúrgico, los instrumentos se esterilizarán, el estudiante deberá portar guantes limpios, cubrebocas y tomará medidas antisépticas en todo momento.

Se preparará al roedor de la siguiente manera: se removerá el pelo en el lugar que se vaya a implantar la mini bomba osmótica. Luego se limpiará el área con un algodón y alcohol para retirar el pelo excedente y debris de la piel.

Posteriormente, se procederá a anestesiarse a los roedores utilizando una mezcla de ketamina y xilacina (90 mg/kg y 10 mg/kg, respectivamente). Se comprobará si el animal realmente está anestesiado mediante pellizco de la cola y de las patas, en ausencia de retiro y tomando en cuenta que el ritmo cardíaco y respiración no se encuentren acelerados, se considerará que el animal está bajo anestesia.

Como medida post-operatoria, los animales se colocarán en un área de recuperación limpia. Además, se colocará una lámpara (que emite calor) para mantener la temperatura corporal de los ratones, habrá que monitorear que no se quemen. Los animales en recuperación no estarán en el mismo lugar que los animales despiertos.

El estudiante supervisará que el animal vuelva en sí, una vez que los animales estén despiertos y ambulatorios, se pueden dejar solos en una caja limpia. Además, durante el periodo post-operatorio, deben monitorearse signos de dolor, tales como disminución de la actividad y/o movimiento, posturas anormales, marcha anormal, entre otros. También habrá que monitorear que el sitio de incisión no esté infectado (calor, supuración, enrojecimiento).

- 15) Evaluación de signos de dolor de su proyecto piloto.

Los parámetros generales a observar son:

- Cambios en peso corporal
- Apariencia física: pilo-erección, posturas indicativas de dolor, etc.
- Comportamiento: aparición de comportamientos estereotipados, agresividad, cambios en comportamiento social...
- Respuesta a estímulos externos
- Signos clínicos:
  - i. Respiración: normal, laboriosa...
  - ii. Temperatura
  - iii. Temblores
  - iv. Convulsiones
  - v. Descarga nasal, salivación

Escala: 0 si es normal, 1 si el parámetro en cuestión se ve ligeramente alterado, 2 si está afectado y 3 si está muy afectado.

Parámetro	0	1	2	3
a) Peso corporal		X		
b) Apariencia	X			
c) Signos clínicos (Temp., FC., FR., etc.)	X			
d) Conducta espontánea.	X			
e) Conducta provocada.	X			



## FORMATO DE APOYO PARA LA EVALUACIÓN DE PROTOCOLOS POR LA CINVA DEL INCMNSZ.

### 16) ¿Cuáles serán los criterios para establecer el "punto final humanitario"?

#### Criterios de punto final

Basándose en los parámetros seleccionados para evaluar la condición del animal hay que determinar en que momento se procederá a la eutanasia humanitaria del mismo. Los parámetros observados pueden "cuantificarse" asignando valores arbitrarios según la gravedad que presenten.

- a. Variación de peso corporal:
  1. Aceptable una disminución del 5-10%
  2. Moderada del 10-20%
  3. Substancial > al 20% (criterio de punto final).
- b. Los valores como la postura, piloerección, comportamiento social etc., pueden valorarse según la escala:
  1. 0 si es normal.
  2. 1 si el parámetro en cuestión se ve ligeramente alterado
  3. 2 si está afectado
  4. 3 si está muy afectado.

Hay que tener en cuenta que no existe un criterio de punto final adaptable a todos los procedimientos y es el **Investigador Responsable** del experimento el que, basándose en observaciones de ensayos piloto o por datos de experimentos similares ya publicados, debe confeccionar su propio protocolo de determinación de punto final de manera que cumpla la normativa vigente en cuanto a protección de los animales utilizados en experimentación y por otra se evite la pérdida de datos del estudio.

Se tomará en cuenta que los tratamientos a evaluar tienen un efecto modesto en la reducción del peso, por lo que es de esperar que éste, cambie. Además las dosis a utilizar son las que principalmente se emplean en otros modelos experimentales y no se ha reportado un efecto tóxico. Sin embargo, como criterios de punto final, se pueden considerar ciertas variables, por ejemplo: el peso corporal, cambios en la conducta motora, el consumo de alimento, el consumo de agua, la temperatura, que presente convulsiones o hemorragias, entre otras. La escala será la siguiente:

- 0 si es normal.
- 1 si el parámetro en cuestión se ve ligeramente alterado
- 2 si está afectado
- 3 si está muy afectado.

Cuando un score sea >5 o que sea 3 en alguna variable, se considerará que al animal habrá que aplicarle la eutanasia.

### 17) ¿Cuál será el método de eutanasia que utilizará?

El método de eutanasia a utilizar será el de asfixia con CO<sub>2</sub>.

Recomendaciones para el Sacrificio Humanitario de los Animales de Experimentación.			
Especie	Método	Dosis	Vía
Ratón	Pentobarbital Asfixia con CO <sub>2</sub> X	210 mg/kg	IV, IP
Rata	Pentobarbital Asfixia con CO <sub>2</sub>	120 mg/kg	IV, IP
Jerbo	Pentobarbital Asfixia con CO <sub>2</sub>	270 mg/kg	IV, IP
Conejo	Pentobarbital Pistola de perno cautivo Asfixia con CO <sub>2</sub>	120 mg/kg	IV, IP
Cerdo	Pentobarbital	90 mg/kg	IV
Rana	Pentobarbital	100 mg/kg	IP

\* Método aceptado únicamente bajo ciertas condiciones establecidas por el comité. Su aplicación requiere una justificación científica por parte del Investigador Responsable



## FORMATO DE APOYO PARA LA EVALUACIÓN DE PROTOCOLOS POR LA CINVA DEL INCMNSZ.

18) El protocolo representa riesgo biológico?

a) ~~No~~                      b) Si

Si la respuesta es afirmativa, defina el Nivel de Bioseguridad para Animales (ABSL) requerido. Se recomienda consultar la clasificación del Center for Disease Control and Prevention.  
[http://www.cdc.gov/biosafety/publications/bmbl5/BMBL5\\_sect\\_V.pdf](http://www.cdc.gov/biosafety/publications/bmbl5/BMBL5_sect_V.pdf)

19) ¿Cuál será el destino final de los animales utilizados en el proyecto experimental?

El destino final de los cadáveres de los animales utilizados en los experimentos serán incinerados.

Me comprometo a conducir mi proyecto de Investigación de acuerdo con los lineamientos éticos y humanitarios que rigen la experimentación con animales, así como cumplir los aspectos relativos al cuidado, manejo y uso de los animales de laboratorio que se describen en la NOM-062-ZOO-1999.

Nombre y firma del Investigador Responsable

Dr. Armando Roberto Tovar Palacio

Integrantes de la CINVA	Cargo	Firma
Dra. Norma Bobadilla Sandoval	Coordinadora	
Dr. Jorge Alberto Barrios Payán	Secretario	
M. en C. Octavio Villanueva Sánchez	Vocal	
Dra. Elena Zambrano González	Vocal	
Dr. Alejandro Zentella Dehesa	Vocal	
Dra. Nimbe Torres y Torres	Vocal	
Dr. Gonzalo Torres Villalobos	Vocal	
Dra. María Elena Flores Carrasco	Vocal Externo	



COMITÉ INSTITUCIONAL DE  
INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA EN  
HUMANOS

FORMATO DE EVALUACIÓN  
DE PROYECTO DE  
INVESTIGACIÓN

No. de registro CIIBH

FNU-1379-14/18-1

**1. Título del proyecto**

Estudio in vitro e in vivo de la participación del eje Ang-(1-7)/Receptor Mas sobre la diferenciación de adipocitos beige en la obesidad

**2. Investigadores**

**2a. Identificación**

INVESTIGADOR	Posición institucional	Posición en el proyecto	Teléfono (ext.)	Correo-E
TORRES Y TORRES NIMBE	INVESTIGADOR EN CIENCIAS MED F	Investigador asociado		
TOVAR PALACIO ARMANDO ROBERTO	JEFE DE DEPARTAMENTO	Investigador responsable		Ô

**2b. Pertinencia del grupo de investigadores con respecto del proyecto**

**3. Instituciones participantes**

**4. Patrocinio**

**4a. Organismos patrocinadores**

**4b. Especificar si los investigadores reciben pago (monetario o en especie) por su participación específica en la investigación.**

**5. Marco teórico**

**ANTECEDENTES:**

**Tejido adiposo.**

El tejido adiposo está compuesto de varios depósitos localizados en dos compartimentos del cuerpo: algunos se encuentran debajo de la piel, como el depósito subcutáneo y otros están en el tronco como los depósitos viscerales. Por lo

tanto, el tejido adiposo se considera como un órgano multi-depósito. El órgano adiposo contribuye a las necesidades cruciales de un organismo, tales como la termogénesis, la lactancia, la respuesta inmune y como combustible para el metabolismo (Cinti, 2012). Los adipocitos son las células más prevalentes que constituyen el tejido adiposo, sin embargo también se encuentran otras células, tales como los linfocitos, macrófagos, mastocitos, ductos epiteliales (glándulas mamarias), fibroblastos y células satélite relacionadas con vasos sanguíneos y nervios (Smorlesi et al., 2012). Generalmente, los adipocitos se han clasificado de dos tipos: los adipocitos pardos o marrones y los adipocitos blancos. Sin embargo, de manera reciente se ha introducido otro tipo de adipocito, el beige o brite "brown in white" (Harms & Seale, 2013; Wu et al., 2012).

### **Tejido adiposo blanco (TAB).**

Los adipocitos blancos son células de forma esférica cuyo tamaño dependerá de la cantidad de lípidos almacenados. Su característica principal es que contiene una sola gota de lípidos (adipocitos uniloculares) formada por triglicéridos que constituye más del 90% del volumen celular. Las mitocondrias son delgadas y elongadas, con crestas orientadas al azar, en general, son menos numerosas en células más grandes. La función principal de los adipocitos blancos es almacenar moléculas altamente energéticas como los ácidos grasos y liberarlos cuando se requiera según la demanda energética (Cinti, 2009).

### **Tejido adiposo pardo o marrón (TAP).**

Los adipocitos pardos almacenan los triglicéridos en múltiples vacuolas pequeñas (adipocitos multiloculares). La mayoría de los adipocitos son poligonales con un diámetro variable de 15 a 50  $\mu\text{m}$ . La característica más importante de estas células son las mitocondrias, las cuales son grandes, esféricas, llenas de crestas y numerosas en el citoplasma (Cinti, 2009). A diferencia de los adipocitos blancos, que almacenan energía, los adipocitos pardos producen calor a través de la proteína UCP1 (Proteína desacoplante 1) que se expresa en la membrana interna de las mitocondrias, donde desacopla el transporte electrónico que ocurre durante la respiración, disipando la fuerza motriz de los protones en forma de calor (Carobbio et al., 2013). Los roedores y otros mamíferos pequeños poseen varios depósitos de tejido pardo, pero en mamíferos superiores, los depósitos disminuyen después de la infancia. Recientemente, a través de estudios de tomografía de emisión de positrones (PET) se han detectado depósitos de tejido adiposo pardo positivos a UCP1 en humanos adultos, específicamente en la región supraclavicular y el cuello (Cypess et al., 2009; van Marken Lichtenbelt et al., 2009).

### **Tejido adiposo beige (TA-Beige).**

En el tejido adiposo blanco se pueden encontrar

agrupaciones de adipocitos que expresan la proteína UCP1 y tienen capacidad termogénica en respuesta a varios estímulos; estos adipocitos se han nombrado beige o brite y principalmente se diferencian a partir de los adipocitos subcutáneos. Los adipocitos beige de ratón se identifican morfológicamente por sus gotas de lípidos multiloculares, por su alto contenido de mitocondrias y por la expresión de genes específicos de adipocitos pardos, tales como *UCP1*, *Cidea* y *Pgc-1 $\alpha$*  (Vitali et al., 2012). En humanos también existe una susceptibilidad al browning de los adipocitos blancos, dado que en biopsias pertenecientes a pacientes con feocromocitoma (un tumor secretor de catecolaminas) se observan numerosas células beige/brite (Frontini et al., 2013).

En un estudio reciente se determinó que los adipocitos pardos y beige estimulados contienen cantidades similares de UCP1, lo cual sugiere que tienen una capacidad termogénica similar (Wu et al., 2012). Sin embargo, a pesar que los adipocitos pardos y beige tienen en común la capacidad termogénica, se consideran tipos celulares distintos debido a varias razones: i) Las células beige, al menos las que se encuentran en el tejido subcutáneo de ratón, no se derivan del mismo precursor embriogénico que expresa Myf5<sup>+</sup> (encoding myogenic factor 5 - expressing) y que da lugar a los adipocitos pardos. ii) Los adipocitos pardos y beige expresan genes distintos y distintivos. iii) Otra diferencia entre ambos tipos celulares es que la expresión de UCP1 y otros genes termogénicos se encuentran altamente

expresados en los adipocitos pardos en condiciones basales; en cambio, en los adipocitos beige, expresan esos genes solo en respuesta a activadores, como los agonistas de los receptores  $\beta$ -adrenérgicos o de PPAR $\gamma$  (receptor activado por proliferadores de peroxisomas- gamma) (Harms & Seale, 2013). Es decir, que los adipocitos beige son capaces de cambiar el fenotipo de almacenador de energía a disipador de energía de una manera única entre las células adiposas (Wu et al., 2012).

### **Teoría de la transdiferenciación y su relación con la obesidad.**

El tejido adiposo es un órgano que posee alta plasticidad, recientemente se ha propuesto la teoría de la transdiferenciación, la cual puede ocurrir como consecuencia de condiciones distintas, por ejemplo, en presencia de frío, de estimulación  $\beta$ -adrenérgica o bien, a consecuencia del ejercicio, los adipocitos blancos se transforman en células "brown-like", ahora conocidas como células beige o "brite". De manera opuesta, las células beige se transforman en adipocitos blancos cuando existe un balance energético positivo, es decir, durante la obesidad, cuando el tejido adiposo requiere un aumento en su capacidad de almacenamiento (Smorlesi et al., 2012).

En este sentido, existen evidencias que indican una relación entre los adipocitos beige y pardos con la obesidad, por

ejemplo, la ablación genética en ratones de TAP o todos los receptores  $\beta$ -adrenérgicos induce a obesidad (Bachman et al., 2002; Lowell et al., 1993). Además, el incremento de la actividad de los adipocitos pardos y beige se ha relacionado a una resistencia a la obesidad en varios modelos de ratón (Kopecky et al., 1995; Seale et al., 2011). En humanos, por muchos años se asumió que tenían muy poca cantidad de tejido pardo, sin embargo, estudios más recientes han demostrado que en adultos existe una cantidad considerable de adipocitos que expresan UCP1 y que la masa, la actividad o ambos son menores en individuos obesos o ancianos (Cypess et al., 2009; van Marken Lichtenbelt et al., 2009). Dada la relación entre los adipocitos pardos y beige con la obesidad, el incremento de su actividad a través de fármacos o algún otro método ha llamado la atención y se ha propuesto como un blanco farmacológico para tratar la enfermedad metabólica inducida por la obesidad y la diabetes tipo 2 (Harms & Seale, 2013).

Hasta la fecha se han descrito varios estímulos capaces de transdiferenciar el tejido adiposo blanco a beige, algunos de esos estímulos son los siguientes:

- i) El frío activa fibras noradrenérgicas, en consecuencia, la noradrenalina al unirse a su receptor en los adipocitos incrementa la expresión de genes termogénicos. Se ha descrito que en ratones crecidos en un ambiente frío, presentan una remodelación de su tejido adiposo blanco

caracterizado por una acumulación de adipocitos beige (Collins, 2011).

- ii) Los agonistas  $\beta_3$ -adrenérgicos, como *CL316,243*, pueden mimetizar el efecto que tiene el frío sobre la transdiferenciación en los roedores (Himms-Hagen et al., 2000), aunque los estudios en humanos no fueron los esperados dadas las diferencias del receptor entre especies (Buemann et al., 2000).
- iii) Los agonistas de PPAR $\gamma$ , como las tiazolidinedionas (TZD's: pioglitazona y rosiglitazona) incrementan la expresión de genes termogénicos en adipocitos blancos y pardos, además inducen la expresión de UCP1 e incrementan la biogénesis mitocondrial en adipocitos de ratones y humanos (Petrovic et al., 2010).
- iv) Irisina, es una hormona liberada por el músculo esquelético en respuesta al ejercicio que incrementa el desarrollo de adipocitos beige, lo que conlleva a un mejoramiento en la tolerancia a la glucosa y a la supresión del incremento de peso (Boström et al., 2012; Wu et al., 2012).
- v) El factor de crecimiento de fibroblastos 21 (FGF21), es una hormona circulante liberada por el hígado y el TAP que incrementa la cantidad de Pgc-1 $\alpha$  dirigiendo el reclutamiento de adipocitos beige en respuesta al frío. Tiene efectos favorables sobre el metabolismo, por ejemplo, aumenta la captación de glucosa en los tejidos periféricos, incrementa la sensibilidad a la insulina y reduce el peso corporal

(Coskun et al., 2008; Xu et al., 2009).

- vi) Péptidos natriuréticos liberados por el corazón en respuesta a la falla cardíaca o a una sobrecarga de presión. Recientemente se ha descubierto que el incremento de estos péptidos en ratones promueven el desarrollo de adipocitos beige en el TAB e incrementan la expresión de genes termogénicos en el TAP. Incrementan la lipólisis y promueven el browning a través de la activación de la PKG (Bordicchia et al., 2012).
- vii) Óxido nítrico (ON), es un mensajero gaseoso, se ha localizado en el núcleo de la células pardas después de una exposición al frío, la sintasa de óxido nítrico inducible (iNOS) y epitelial (eNOS) se encuentran expresadas tanto en el citoplasma como en el núcleo de los adipocitos pardos (Giordano et al., 2002). Aunque el ON no se ha relacionado directamente al browning, promueve una intensa mitocondriogénesis y la activación del TAP *in vivo*, a través de GMPc y PKG (Nisoli et al., 2003; Petrović et al., 2010).

### **El sistema renina-angiotensina y el tejido adiposo.**

El sistema renina-angiotensina (SRA) desempeña un papel central en la regulación de la presión arterial y también participa en la homeostasis de los adipocitos, específicamente en la regulación del crecimiento, diferenciación y metabolismo. El angiotensinógeno es el sustrato circulante sobre el cual actúa la renina, para generar



angiotensina I (Ang I) (decapéptido). A su vez, la Ang I es el sustrato de la enzima convertidora de angiotensina (ECA), que da lugar a la Ang II (octapéptido), principal efector del sistema que actúa a través de los receptores AT<sub>1</sub> para generar respuestas presoras, tróficas y proinflamatorias. También puede activar al receptor AT<sub>2</sub>, el cual generalmente contrapone las respuestas del receptor AT<sub>1</sub>. La Ang II es sustrato de la enzima convertidora de angiotensina 2 (ECA2), que genera la Ang-(1-7) (heptapéptido). La Ang-(1-7) también puede ser sintetizada a partir de Ang I, que por la acción de la ECA2 forma Ang-(1-9) y mediante la ECA forma Ang-(1-7). Adicionalmente, las endopeptidasas también forman Ang-(1-7) a partir de la Ang I. El angiotensinógeno es el sustrato circulante sobre el cual actúa la renina, para generar angiotensina I (Ang I) (decapéptido). A su vez, la Ang I es el sustrato de la enzima convertidora de angiotensina (ECA), que da lugar a la Ang II (octapéptido), principal efector del sistema que actúa a través de los receptores AT<sub>1</sub> para generar respuestas presoras, tróficas y proinflamatorias. También puede activar al receptor AT<sub>2</sub>, el cual generalmente contrapone las respuestas del receptor AT<sub>1</sub>. La Ang II es sustrato de la enzima convertidora de angiotensina 2 (ECA2), que genera la Ang-(1-7) (heptapéptido). La Ang-(1-7) también puede ser sintetizada a partir de Ang I, que por la acción de la ECA2 forma Ang-(1-9) y mediante la ECA forma Ang-(1-7). Adicionalmente, las endopeptidasas también forman Ang-(1-7) a partir de la Ang I (Santos et al., 2013).

**Evidencias del bloqueo de SRA como factor protector**

### **contra la obesidad.**

Existe evidencia experimental y clínica que apoyan la idea de la interrupción del SRA en varios niveles, proporciona protección contra la obesidad y/o sus secuelas. Por ejemplo, ratones carentes de renina tienen una menor producción de los péptidos del SRA, tales como la Ang II y además, están protegidos contra la obesidad. El bloqueo del SRA mediante inhibidores de la ECA, con antagonistas del receptor  $AT_1$  y con el inhibidor de renina previenen el incremento de la masa grasa (De Kloet et al., 2009; Mathai et al., 2008; Stucchi et al., 2009).

Se ha propuesto que la disminución en la ganancia de peso se debe a la Ang-(1-7), tal como se demostró en ratas Sprague Dawley con un tratamiento subcrónico de captopril (Oh et al., 2012). Además, ratones carentes del receptor Mas desarrollan un incremento en la masa grasa abdominal (~50%), una mayor expresión de angiotensinógeno a partir del tejido adiposo y una disminución en la sensibilidad a la insulina, lo cual sugiere que el eje Ang-(1-7)/Mas participa en el metabolismo de lípidos y de la glucosa (Santos et al., 2012).

El efecto del SRA sobre la obesidad probablemente esté relacionado con la existencia de un SRA local en el tejido adiposo, ya que hay evidencia de la expresión de ARNm de todos sus componentes en el tejido adiposo, aunque la expresión de renina sigue en controversia (Gálvez-Prieto et al., 2008). Además, se ha encontrado que los receptores de Ang II y el receptor Mas están co-expresados en los adipocitos, lo cual implica que el SRA local está involucrado

en las funciones que los regulan (Engeli et al., 1999; Gupte et al., 2008). Algunos datos apoyan esta hipótesis, por ejemplo, se ha demostrado que el eje Ang II/Receptor AT<sub>1</sub> inhibe la lipólisis y la captación de glucosa en los adipocitos (Fujimoto et al., 2004; Goossens et al., 2007), mientras que el eje Ang-(1-7)/Receptor Mas ejerce acciones contrarias, parece tener acciones que mejoran el estado metabólico (Liu et al., 2012; Oh et al., 2012). Además, el eje Ang II/Receptor AT<sub>1</sub> induce estrés oxidativo en los adipocitos (Kurata et al., 2006), mientras el eje Ang-(1-7)/Receptor Mas lo suprime (Liu et al., 2012). En cuanto a la adipogénesis, recientemente se demostró que el eje Ang-(1-7)/Receptor Mas incrementa la adipogénesis como resultado de dos mecanismos distintos de señalización celular: i) vía PI3K/Akt para incrementar la expresión de PPAR $\gamma$  y ii) mediante cross-talk con la vía del eje Ang II/Receptor AT<sub>1</sub>, al inhibir la activación de la vía MAPK cinasa-ERK1/2 para finalmente activar PPAR $\gamma$  (Than et al., 2013).

#### **Diferenciación de adipocitos beige y los bloqueadores del SRA: Relación con el eje Ang-(1-7)/Receptor Mas.**

En cuanto a la diferenciación de adipocitos beige, aún no se ha estudiado el impacto que tiene el SRA sobre el browning de la célula adiposa blanca. Sin embargo, existen 2 evidencias que sugieren que algún componente del SRA está influyendo en este fenómeno y en parte, explique el mejoramiento de la tolerancia a la glucosa y la reducción de peso que se observa en el tratamiento con los inhibidores de la ECA y con los antagonistas del receptor AT<sub>1</sub>. En primer lugar, hay que señalar que el tratamiento con ambos grupos

de fármacos incrementan las concentraciones plasmáticas de Ang-(1-7). Los inhibidores de la ECA como el captopril, inhiben la degradación de la Ang-(1-7), por lo tanto, sus concentraciones plasmáticas aumentan y los antagonistas del receptor AT<sub>1</sub> como el losartan y telmisartan incrementan *in vivo* las concentraciones plasmáticas de Ang-(1-7) debido a que se inhibe el mecanismo de retroalimentación negativa que los receptores AT<sub>1</sub> ejercen sobre la liberación de renina, por lo tanto, el sistema permanece activo junto con la síntesis continua de sus péptidos (Ferrario et al., 2005).

En segundo lugar, se conoce que la Ang-(1-7) es capaz de activar a PPAR $\gamma$ , el cual es uno de los principales factores que modulan la diferenciación a células beige. Incluso en un estudio en ratones carentes del receptor Mas se encontró que tenían una expresión reducida de PPAR $\gamma$  en un 60% (Mario et al., 2012). Por otra parte, también se conoce que la Ang-(1-7) vía el receptor Mas es capaz de provocar la liberación de ON, se ha sugerido que esto ocurre mediante la activación de la vía PI3K/Akt/eNOS (Sampaio et al., 2007). Anteriormente se había señalado que el ON, que puede actuar de manera autócrina y parácrina, es un promotor de la génesis mitocondrial y activa al tejido adiposo pardo. Debido a estas evidencias, este trabajo sugiere que el eje Ang-(1-7)/Receptor Mas está promoviendo la diferenciación a adipocitos beige y consecuentemente genera una mejora en el estado metabólico durante la obesidad.

#### **DEFINICION DE PROBLEMAS :**

La obesidad se define como la acumulación anormal o excesiva de grasa que puede alterar la salud. El índice de

masa corporal (IMC) se utiliza para clasificar la obesidad y el sobrepeso. Se define como el peso de la persona en kg dividido entre el cuadrado de su altura en metros ( $\text{kg}/\text{m}^2$ ). La Organización Mundial de la Salud (OMS) clasifica a las personas con obesidad cuando el IMC es mayor o igual al 30 y con sobrepeso cuando es mayor o igual a 25. Dado que el IMC depende del equilibrio energético global, otra definición de obesidad sería que es un trastorno multifactorial del equilibrio de la energía en el que el aporte de calorías a largo plazo ha superado el gasto energético, lo que da lugar a un IMC excesivo. A nivel mundial se estiman 1.4 billones de personas mayores a 20 años con sobrepeso y de esos adultos, aproximadamente 500 millones tiene obesidad, según cifras del año 2008 (WHO, 2014). En México, la población experimenta un aumento en las cifras de obesidad que incrementan año con año y que afecta tanto a zonas rurales como urbanas, a todas las edades y a las diferentes regiones. La ENSANUT del 2012 describe que la prevalencia de obesidad y sobrepeso en mujeres es del 73.0% y en hombres es del 69.4%. Cabe señalar que la obesidad está relacionada a la resistencia a la insulina y a la hipertensión, los cuales, son considerados parámetros del síndrome metabólico. La diabetes y la hipertensión son enfermedades de alta prevalencia en México, siendo del 9.2% y alrededor del 32%, respectivamente (Gutiérrez et al., 2012).

Actualmente existen alternativas farmacológicas muy limitadas para tratar la obesidad, por lo tanto, descubrir nuevos blancos terapéuticos constituye una temática de alta importancia dado en creciente aumento de obesidad a nivel mundial y nacional.

#### **JUSTIFICACION :**

Existe evidencia experimental de la relación entre los adipocitos pardos y beige respecto a la obesidad. Se conoce que los animales con mayor cantidad de adipocitos pardos y beige son más resistentes al desarrollo de obesidad y diabetes tipo 2. De manera opuesta, los animales con menos adipocitos pardos y carentes de receptores  $\beta$ -adrenérgicos son más susceptibles a desarrollar ambas enfermedades. Por lo tanto, investigar los mecanismos que incrementen la actividad de adipocitos pardos y beige, o bien aumenten la diferenciación de adipocitos beige constituye un nuevo campo de estudio para las nuevas alternativas de tratamiento de la obesidad.

Existen varios estímulos capaces de activar la diferenciación de adipocitos beige, tales como el frío y la estimulación  $\beta_3$ -adrenérgica, sin embargo esta última no fue exitosa en los ensayos clínicos. Por otra parte, hay información en la literatura que sugiere que el SRA tiene influencia la diferenciación de adipocitos beige, aunque no ha sido demostrado experimentalmente. Primeramente, hay que tomar en cuenta que existe un SRA local en el tejido adiposo. Segundo, el eje Ang-(1-7)/Receptor Mas es capaz de activar PPAR $\gamma$ , el cual es necesario para la diferenciación y activación de los adipocitos beige. Tercero, la Ang-(1-7) puede liberar ON vía el receptor Mas, el ON promueve la génesis mitocondrial y activa a los adipocitos pardos. Por lo tanto, en este trabajo se propone que el eje Ang-(1-7)/Receptor Mas está participando en la diferenciación de adipocitos beige y en parte podría explicar el efecto de los

inhibidores de la ECA y los antagonistas del receptor AT<sub>1</sub> sobre la disminución del peso y el mejoramiento de la sensibilidad a la insulina.

El fenómeno de diferenciación a adipocitos beige implica un mecanismo de reprogramación genómica. Este mecanismo podría ser utilizado como estrategia terapéutica que prevenga el desarrollo excesivo de adipocitos blancos y aumente la cantidad de adipocitos beige. Por lo tanto, entender los mecanismos moleculares de diferenciación a estas células constituye un tema de importancia en la salud humana dada la creciente prevalencia de la obesidad y diabetes tipo 2 a nivel nacional y mundial. Aprovechando la plasticidad de los adipocitos blancos y beige, y su capacidad única para cambiar de fenotipo y función, se estudiará si el eje Ang-(1-7)/Receptor Mas induce la diferenciación de adipocitos beige y por lo tanto incrementa la cantidad de adipocitos beige.

### **6a. Hipótesis**

La Ang-(1-7), vía el receptor Mas, incrementará la cantidad de adipocitos beige en el tejido subcutáneo. Este efecto dependerá de la activación de PPAR $\gamma$  y/o la activación de la NOS.

### **6b. Objetivos**

General:

Determinar la participación y el mecanismo potencial mediante el cual el eje Ang-(1-7)/Receptor Mas pueda estar influyendo en el fenómeno de diferenciación de adipocitos beige en un modelo *in vitro* y en un modelo *in vivo* de obesidad.

Específicos:

. Evaluar, a través de ensayos *in vitro*, el efecto del captopril, losartan y Ang-(1-7) sobre la transdiferenciación de adipocitos blancos a beige mediante la

cuantificación de la expresión del ARNm de PPAR $\gamma$ , UCP-1 y Tbx1 con la técnica de PCR en tiempo real.

Evaluar, a través de ensayos *in vitro*, si el captopril, losartan y Ang-(1-7), promueven la transdiferenciación de los adipocitos blancos a beige vía el receptor Mas y activación de la NOS, mediante la incubación con el antagonista del receptor Mas (A779) y el inhibidor de la NOS (L-NAME).

Evaluar el efecto del captopril y losartan sobre el peso corporal, la ingesta calórica, la tolerancia a la glucosa y el gasto energético en un modelo de obesidad inducido por dieta (OID) alta en grasa.

Determinar el efecto del captopril y losartan sobre la concentración sistémica y local (plasma y tejido adiposo subcutáneo, respectivamente) de la Ang-(1-7) y Ang II mediante la técnica de electroforesis capilar.

Determinar el efecto del captopril y/o losartan, vía el receptor Mas, sobre la transdiferenciación de adipocitos blancos a beige mediante el estudio de la morfología y tamaño de adipocitos subcutáneos a través de análisis histológicos y de microscopía electrónica.

Determinar el efecto del captopril y/o losartan, vía el receptor Mas, sobre la transdiferenciación del adipocito blanco a beige mediante la cuantificación de la expresión del ARNm de PPAR $\gamma$ , genes "brown like" y genes específicos de los adipocitos beige a través de la técnica de PCR en tiempo real.

Determinar el efecto del captopril y/o losartan, vía el receptor Mas, sobre la transdiferenciación del adipocito blanco a beige mediante la cuantificación de la expresión proteica de PPAR $\gamma$ , UCP-1 y Tbx1 a través de la técnica de Western blot.

Determinar el efecto del captopril y/o losartan, vía el receptor Mas y activación de la NOS, sobre la transdiferenciación del adipocito blanco a beige mediante la cuantificación de la actividad de la NOS y la cantidad de nitritos a partir del tejido adiposo subcutáneo.

## **7. Metodología: Diseño general.**

A) El diseño de este estudio es aleatorio, las unidades experimentales serán bloqueadas por tratamiento de manera aleatoria. Se realizarán 6 tratamientos.

Tratamiento A (Control): Dieta con caseína al 20% de acuerdo a las recomendaciones del AIN (American Institute of Nutrition).

Tratamiento B (Obeso): Dieta modificada a partir de las recomendaciones del AIN



aumentando la composición de grasa.

Tratamiento C (Obeso + losartan): Dieta modificada a partir de las recomendaciones del AIN aumentando la composición de grasa + losartan (10 mg/kg)

Tratamiento D (Obeso + captopril): Dieta modificada a partir de las recomendaciones del AIN aumentando la composición de grasa + captopril (40 mg/kg)

Tratamiento E (Obeso + Ang-(1-7)): Dieta modificada a partir de las recomendaciones del AIN aumentando la composición de grasa + Angiotensina-(1-7).

Tratamiento F (Obeso + Tx + A779): Dieta modificada a partir de las recomendaciones del AIN aumentando la composición de grasa + el tratamiento que mejor haya tenido efecto de diferenciar adipocitos a beige + el antagonista del receptor Mas (A779 24 ug/kg/día)

B) Para estudiar la participación del eje Ang-(1-7)/Receptor Mas sobre la diferenciación de adipocitos beige, se pretende utilizar ratones macho C57BL/6 que se mantendrán a temperatura controlada ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ), bajo ciclos de luz/oscuridad de 12h/12h y 50-55% de humedad. Los ratones se dividirán en 6 grupos (anteriormente descritos). Durante el periodo de inducción de obesidad (3 meses) se tendrá un registro del peso corporal semanal, de la ingesta calórica y al término se realizará una prueba de tolerancia oral a la glucosa (PTOG) y una prueba en el calorímetro.

Transcurridos los 3 meses, los ratones serán sacrificados mediante la inhalación de CO<sub>2</sub>. Posteriormente, se obtendrá tejido adiposo subcutáneo localizado en la zona inguinal e intercostal de todos los grupos y las muestras se congelarán en nitrógeno líquido y se almacenarán a  $-70^\circ\text{C}$  hasta el día de las determinaciones. Se extraerá ARN para estudiar la expresión de los genes marcadores de adipocitos beige. Adicionalmente, se cuantificará la expresión proteica de marcadores de adipocitos pardos y beige. Parte del tejido adiposo subcutáneo, se destinará a estudios histológicos para observar la morfología característica de los adipocitos beige.

Se tomarán muestras de sangre por punción cardíaca para posteriormente separar el plasma y cuantificar parámetros bioquímicos como la glucosa, triglicéridos, colesterol HDL y LDL, mediante pruebas enzimáticas.

C) El tamaño de la muestra será de 8 ratones de la cepa C57BL/6 por grupo.

D) Los ratones son machos de 4 semanas de edad, de la cepa C57BL/6.

E) La asignación del tratamiento será de forma aleatorizada.

F) Se tendrán 6 grupos experimentales de tratamiento:

i) Grupo control: Ratones que recibirán dieta estándar basada en las recomendaciones de la AIN (American Institute of Nutrition).

ii) Grupo obeso: Ratones que recibirán una dieta modificada alta en grasa durante 3 meses.

iii) Grupo obeso + losartan: Ratones que recibirán una dieta modificada alta en grasa durante 3 meses y el último mes recibirá losartan (10 mg/kg) vía oral.

iv) Grupo obeso + captopril: Ratones que recibirán una dieta modificada alta en grasa durante 3 meses y el último mes recibirá captopril (40 mg/kg) vía oral.

v) Grupo obeso + Ang-(1-7): Ratones que recibirán una dieta modificada alta en grasa durante 3 meses y el último mes recibirán Ang-(1-7) vía subcutánea, mediante minibombas osmóticas de infusión.

vi) Grupo obeso + Tx + A779: Ratones que recibirán una dieta modificada alta en grasa durante 3 meses y el último mes recibirán el tratamiento que mejor haya diferenciado a los adipocitos blancos a beige + A779 que es el antagonista del receptor Mas por vía subcutánea mediante minibombas osmóticas de infusión.

G) La duración del estudio será de 3 meses.

### 8. Metodología: Criterios de selección

A) Ser ratones machos de la cepa C7BL/6 de cuatro semanas de edad, de peso entre 15-17 g.

B) Ser ratones hembra de la cepa C57BL/6.

C) Se eliminarán del estudio los ratones C57BL/6 que no aumenten de peso o que presenten un bajo peso, en comparación con los ratones que reciban dieta esta

### 9. Metodología: Desenlaces y variables

Variable	Definición	Tipo de variable	Escala de medición
Glucosa	Concentración plasmática de glucosa por ensayo enzimático	Cuantitativa continua	mg/dl
Triglicéridos	Concentración plasmática de triglicéridos por ensayo enzimático	Cuantitativa continua	mg/dl
Colesterol HDL	Concentración plasmática de	Cuantitativa continua	mg/dl

	colesterol HDL por ensayo enzimático		
Colesterol LDL	Concentración plasmática de colesterol LDL por ensayo enzimático	Cuantitativa continua	mg/dl
PPAR $\gamma$	Medición de la expresión génica por medio de RT-PCR	Cuantitativa continua	Unidades arbitrarias
UCP-1	Medición de la expresión génica por medio de RT-PCR	Cuantitativa continua	Unidades arbitrarias
Prdm16	Medición de la expresión génica por medio de RT-PCR	Cuantitativa continua	Unidades arbitrarias
Pgc-1 $\alpha$	Medición de la expresión génica por medio de RT-PCR	Cuantitativa continua	Unidades arbitrarias
Tbx1	Medición de la expresión génica por medio de RT-PCR	Cuantitativa continua	Unidades arbitrarias
CD137	Medición de la expresión génica por medio de RT-PCR	Cuantitativa continua	Unidades arbitrarias
PPAR $\gamma$	Medición de la expresión proteica por medio de Western blot	Cuantitativa continua	Unidades arbitrarias
UCP-1	Medición de la expresión proteica por medio de Western blot	Cuantitativa continua	Unidades arbitrarias
Tbx1	Medición de la expresión proteica por medio de Western blot	Cuantitativa continua	Unidades arbitrarias
NOS	Cuantificación de la actividad de la enzima NOS por RIA	Cuantitativa continua	Unidades arbitrarias

Nitritos	Cuantificación indirecta de óxido nítrico usando el reactivo de Griess	Cuantitativa continua	ppm
----------	--	-----------------------	-----

### **Análisis estadístico.**

Las variables continuas serán expresadas en promedios con error estándar y se evaluarán mediante Z de Kolmogorov-Smirnov para analizar su tipo de distribución. En caso de que los datos no tuvieran una distribución normal, se realizará la transformación logarítmica antes del análisis. Los parámetros bioquímicos como la glucosa, triglicéridos, colesterol HDL y colesterol LDL se analizarán mediante la prueba de ANOVA de una vía, comparando los grupos tratados con el grupo control. Posteriormente se aplicará una prueba *post hoc* de Dunnett. De igual manera, se analizará la expresión génica (PPAR $\gamma$ , UCP-1, Prdm16, Pgc-1 $\alpha$ , Tbx1, CD137) y de proteínas (PPAR $\gamma$ , UCP-1, Tbx1) obtenidas a partir de las muestras de tejido adiposo subcutáneo de los ratones en estudio. Asimismo, siguiendo el mismo método de análisis, se analizará la actividad enzimática de la sintasa de óxido nítrico y se cuantificarán los nitritos como medida indirecta de la cantidad de óxido nítrico. Se tomará como valor significativo de p cuando sea menor a 0.05.

### **10. Riesgos y beneficios del estudio**

#### **BENEFICIO DIRECTO:**

1. Diferenciar a adipocitos beige a través de la activación del eje Ang-(1-7)/Receptor Mas.
2. Aumentar la expresión de genes y proteínas características de los adipocitos beige tras el tratamiento con fármacos actualmente utilizados en la terapéutica y que incrementan las concentraciones de Ang-(1-7).
3. Conocer el mecanismo por medio del cual se puede incrementar la diferenciación de adipocitos beige, con la finalidad de generar blancos terapéuticos específicos que incrementen esta población celular, que contribuiría a mejorar el estado metabólico presentado durante la obesidad.

#### **BENEFICIOS**

#### **INDIRECTOS:**

1. Dado que los fármacos a evaluar ya se utilizan en la terapéutica de la hipertensión arterial y se ha descrito que aunado a este efecto se observa una mejora en la sensibilidad a la insulina y pérdida de peso, la diferenciación de adipocitos blancos subcutáneos a beige podría ser parte del mecanismo de estos fármacos mediante la

activación del eje Ang-(1-7)/Receptor Mas.

### RIESGOS:

MOLESTIAS GENERADAS : Ninguna

COMPLICACIONES DE PROCEDIMIENTO : Ninguno

EFFECTOS ADVERSOS : Ninguno

EFFECTOS PSICOLOGICOS : Ninguno

METODOS DE SEGURIDAD : Observación diaria de los modelos animales para determinar si existe alguna alteración de la salud, además del control del peso y consumo de alimento.

PROCEDIMIENTOS : Consulta con el médico veterinario.

OTRO TIPO DE RIESGO : Ninguno

## 11. Costos

COSTOS TOTALES DE LA INVESTIGACIÓN	
Admon. Gastos pacientes	\$ 0.00
Animales	\$ 0.00
Equipos	\$ 0.00
Estudios	\$ 0.00
Materiales	\$ 0.00
Personal	\$ 0.00
Publicaciones	\$ 0.00
Suscripciones	\$ 0.00
Varios	\$ 0.00
Viaticos	\$ 0.00

## 12. Citas bibliográficas

Bachman, E. S., Dhillon, H., Zhang, C.-Y., Cinti, S., Bianco, A. C., Kobilka, B. K., & Lowell, B. B. (2002). betaAR signaling required for diet-induced thermogenesis and obesity resistance. *Science (New York, N.Y.)*, 297(5582), 843–5.

Bordicchia, M., Liu, D., Amri, E., Ailhaud, G., Dessì-fulgheri, P., Zhang, C., ... Collins, S. (2012). Cardiac natriuretic peptides act via p38 MAPK to induce the brown fat thermogenic program in mouse and human adipocytes. *The Journal of Clinical Investigation*, 122(3).

Boström, P., Wu, J., Jedrychowski, M. P., Korde, A., Ye, L., Lo, J. C., ... Spiegelman, B. M. (2012). A PGC1- $\alpha$ -dependent myokine that drives brown-fat-like development of white fat and thermogenesis. *Nature*, 481(7382), 463–8.

Buemann, B., Toubro, S., & Astrup, A. (2000). Effects of the two beta3-agonists, ZD7114 and ZD2079 on 24 hour energy expenditure and respiratory quotient in obese subjects. *International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders : Journal of the International Association for the Study of Obesity*, 24(12), 1553–60.

Carobbio, S., Rosen, B., & Vidal-Puig, A. (2013). Adipogenesis: new insights into brown adipose tissue differentiation. *Journal of Molecular Endocrinology*, 51(3), T75–85.

Cinti, S. (2009). Transdifferentiation properties of adipocytes in the adipose organ. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 297(5), E977–E986.

Cinti, S. (2012). The adipose organ at a glance. *Disease Models & Mechanisms*, 5(5), 588–94.

- Collins, S. (2011).  $\beta$ -Adrenoceptor Signaling Networks in Adipocytes for Recruiting Stored Fat and Energy Expenditure. *Frontiers in Endocrinology*, 2, 102.
- Coskun, T., Bina, H. a, Schneider, M. a, Dunbar, J. D., Hu, C. C., Chen, Y., ... Kharitonov, A. (2008). Fibroblast growth factor 21 corrects obesity in mice. *Endocrinology*, 149(12), 6018–27.
- Cypess, A. M., Lehman, S., Williams, G., Tal, I., Rodman, D., Goldfine, A. B., ... Kahn, C. R. (2009). Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans. *The New England Journal of Medicine*, 360(15), 1509–17.
- De Kloet, A. D., Krause, E. G., Kim, D.-H., Sakai, R. R., Seeley, R. J., & Woods, S. C. (2009). The effect of angiotensin-converting enzyme inhibition using captopril on energy balance and glucose homeostasis. *Endocrinology*, 150(9), 4114–4123.
- Engeli, S., Gorzelnik, K., Kreutz, R., Runkel, N., Distler, A., & Sharma, A. M. (1999). Co-expression of renin-angiotensin system genes in human adipose tissue. *Journal of Hypertension*, 17(4).
- Ferrario, C. M., Trask, A. J., & Jessup, J. a. (2005). Advances in biochemical and functional roles of angiotensin-converting enzyme 2 and angiotensin-(1-7) in regulation of cardiovascular function. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 289(6), H2281–90.
- Frontini, A., Vitali, A., Perugini, J., Murano, I., Romiti, C., Ricquier, D., ... Cinti, S. (2013). White-to-brown transdifferentiation of omental adipocytes in patients affected by pheochromocytoma. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1831(5), 950–9.
- Fujimoto, M., Masuzaki, H., Tanaka, T., Yasue, S., Tomita, T., Okazawa, K., ... Nakao, K. (2004). An angiotensin II AT1 receptor antagonist, telmisartan augments glucose uptake and GLUT4 protein expression in 3T3-L1 adipocytes. *FEBS Letters*, 576(3), 492–7.
- Galarraga, M., Campión, J., Muñoz-Barrutia, A., Boqué, N., Moreno, H., Martínez, J. A., ... Ortiz-de-Solórzano, C. (2012). Adiposoft: automated software for the analysis of white adipose tissue cellularity in histological sections. *Journal of Lipid Research*, 53(12), 2791–6.
- Gálvez-Prieto, B., Bolbrinker, J., Stucchi, P., de Las Heras, a I., Merino, B., Arribas, S., ... Fernandez-Alfonso, M. S. (2008). Comparative expression analysis of the renin-angiotensin system components between white and brown perivascular adipose tissue. *The Journal of Endocrinology*, 197(1), 55–64.
- Giordano, A., Tonello, C., Bulbarelli, A., Còzzi, V., Cinti, S., Carruba, M. O., & Nisoli, E. (2002). Evidence for a functional nitric oxide synthase system in brown adipocyte nucleus. *FEBS Letters*, 514(2-3), 135–40.
- Goossens, G. H., Blaak, E. E., Arnet, P., Saris, W. H. M., & van Baak, M. a. (2007). Angiotensin II: a hormone that affects lipid metabolism in adipose tissue. *International Journal of Obesity (2005)*, 31(2), 382–4.
- Gupte, M., Boustany-kari, C. M., Bharadwaj, K., Police, S., Thatcher, S., Gong, M. C., ... Cassis, L. A. (2008). ACE2 is expressed in mouse adipocytes and regulated by a high-fat diet. *AJP-Regul Integr Comp Physiol*, 0200, 781–788.
- Gutiérrez JP, Rivera-Dommarco J, Shamah-Levy T, et al. (2012). Encuesta Nacional de Salud Y Nutrición 2012. Resultados Nacionales.pdf. Cuernavaca, México: Instituto Nacional de Salud Pública.
- Harms, M., & Seale, P. (2013). Brown and beige fat: development, function and therapeutic potential. *Nature Medicine*, 19(10), 1252–63.
- Himms-Hagen, J., Melnyk, A., Zingaretti, M. C., Ceresi, E., Barbatelli, G., & Cinti, S. (2000). Multilocular fat cells in WAT of CL-316243-treated rats derive directly from white adipocytes. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, 279(3), C670–81.
- Kopecky, J., Clarke, G., Enerbäck, S., Spiegelman, B., & Kozak, L. P. (1995). Expression of the mitochondrial uncoupling protein gene from the  $\alpha$ 2 gene promoter prevents genetic obesity. *The Journal of Clinical Investigation*, 96(6), 2914–23.
- Kouyama, R., Suganami, T., Nishida, J., Tanaka, M., Toyoda, T., Kiso, M., ... Ogawa, Y. (2005). Attenuation of diet-induced weight gain and adiposity through increased energy expenditure in mice lacking angiotensin II type 1a receptor. *Endocrinology*, 146(8), 3481–3489.
- Kurata, a, Nishizawa, H., Kihara, S., Maeda, N., Sonoda, M., Okada, T., ... Funahashi, T. (2006). Blockade of Angiotensin II type-1 receptor reduces oxidative stress in adipose tissue and ameliorates adipocytokine dysregulation. *Kidney International*, 70(10), 1717–24.
- Liu, C., Lv, X.-H., Li, H.-X., Cao, X., Zhang, F., Wang, L., ... Yang, J.-K. (2012). Angiotensin-(1-7) suppresses oxidative stress and improves glucose uptake via Mas receptor in adipocytes. *Acta Diabetologica*, 49(4), 291–9.

- Lowell, B. B., S-Susulic, V., Hamann, A., Lawitts, J. A., Himms-Hagen, J., Boyer, B. B., ... Flier, J. S. (1993). Development of obesity in transgenic mice after genetic ablation of brown adipose tissue. *Nature*, 366(6457), 740–742.
- Mario, E. G., Santos, S. H. S., Ferreira, A. V. M., Bader, M., Santos, R. A. S., & Botion, L. M. (2012). Angiotensin-(1-7) Mas-receptor deficiency decreases peroxisome proliferator-activated receptor gamma expression in adipocytes. *Peptides*, 33(1), 174–7.
- Massiera, F., Seydoux, J., Geloën, A., Quignard-Boulange, A., Turban, S., Saint-Marc, P., ... Teboul, M. (2001). Angiotensinogen-deficient mice exhibit impairment of diet-induced weight gain with alteration in adipose tissue development and increased locomotor activity. *Endocrinology*, 142(12), 5220–5225.
- Mathai, M. L., Naik, S., Sinclair, A. J., Weisinger, H. S., & Weisinger, R. S. (2008). Selective reduction in body fat mass and plasma leptin induced by angiotensin-converting enzyme inhibition in rats. *International Journal of Obesity*, 32(10), 1576–1584.
- Nisoli, E., Clementi, E., Paolucci, C., Cozzi, V., Tonello, C., Sciorati, C., ... Carruba, M. O. (2003). Mitochondrial biogenesis in mammals: the role of endogenous nitric oxide. *Science (New York, N.Y.)*, 299(5608), 896–9.
- Oh, Y.-B., Kim, J. H., Park, B. M., Park, B. H., & Kim, S. H. (2012). Captopril intake decreases body weight gain via angiotensin-(1-7). *Peptides*, 37(1), 79–85.
- Petrovic, N., Walden, T. B., Shabalina, I. G., Timmons, J. a, Cannon, B., & Nedergaard, J. (2010). Chronic peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) activation of epididymally derived white adipocyte cultures reveals a population of thermogenically competent, UCP1-containing adipocytes molecularly distinct from classic brown adipocyte. *The Journal of Biological Chemistry*, 285(10), 7153–64.
- Petrović, V., Buzadzić, B., Korać, A., Vasiljević, A., Janković, A., & Korać, B. (2010). NO modulates the molecular basis of rat interscapular brown adipose tissue thermogenesis. *Comparative Biochemistry and Physiology. Toxicology & Pharmacology : CBP*, 152(2), 147–59.
- Sampaio, W. O., Souza dos Santos, R. A., Faria-Silva, R., da Mata Machado, L. T., Schiffrin, E. L., & Touyz, R. M. (2007). Angiotensin-(1-7) through receptor Mas mediates endothelial nitric oxide synthase activation via Akt-dependent pathways. *Hypertension*, 49(1), 185–92.
- Santos, R. a S., Ferreira, A. J., Verano-Braga, T., & Bader, M. (2013). Angiotensin-converting enzyme 2, angiotensin-(1-7) and Mas: new players of the renin-angiotensin system. *The Journal of Endocrinology*, 216(2), R1–R17.
- Santos, S. H. S., Fernandes, L. R., Mario, E. G., Ferreira, A. V. M., Pôrto, L. C. J., Alvarez-Leite, J. I., ... Santos, R. A. S. (2008). Mas deficiency in FVB/N mice produces marked changes in lipid and glycemic metabolism. *Diabetes*, 57(2), 340–347.
- Santos, S. H. S., Fernandes, L. R., Pereira, C. S., Guimarães, A. L. S., de Paula, A. M. B., Campagnole-Santos, M. J., ... Santos, R. A. S. (2012). Increased circulating angiotensin-(1-7) protects white adipose tissue against development of a proinflammatory state stimulated by a high-fat diet. *Regulatory Peptides*, 178(1-3), 64–70.
- Seale, P., Conroe, H. M., Estall, J., Kajimura, S., Frontini, A., Ishibashi, J., ... Spiegelman, B. M. (2011). Prdm16 determines the thermogenic program of subcutaneous white adipose tissue in mice. *The Journal of Clinical Investigation*, 121(1), 53–56.
- Smorlesi, a, Frontini, A., Giordano, A., & Cinti, S. (2012). The adipose organ: white-brown adipocyte plasticity and metabolic inflammation. *Obesity Reviews : An Official Journal of the International Association for the Study of Obesity*, 13 Suppl 2, 83–96.
- Stucchi, P., Cano, V., Ruiz-Gayo, M., & Fernández-Alfonso, M. S. (2009). Aliskiren reduces body-weight gain, adiposity and plasma leptin during diet-induced obesity. *British Journal of Pharmacology*, 158(3), 771–8.
- Takahashi, N., Li, F., Hua, K., Deng, J., Wang, C.-H., Bowers, R. R., ... Harp, J. B. (2007). Increased Energy Expenditure, Dietary Fat Wasting, and Resistance to Diet-Induced Obesity in Mice Lacking Renin. *Cell Metabolism*, 6(6), 506–512.
- Tenorio-López, F. A., Zarco-Olvera, G., Sánchez-Mendoza, A., Rosas-Peralta, M., Pastelín-Hernández, G., & del Valle-Mondragón, L. (2010). Simultaneous determination of angiotensins II and 1-7 by capillary zone electrophoresis in plasma and urine from hypertensive rats. *Talanta*, 80(5), 1702–1712.
- Than, A., Leow, M. K.-S., & Chen, P. (2013). Control of adipogenesis by the autocrine interplays between angiotensin 1-7/Mas receptor and angiotensin II/AT1 receptor signaling pathways. *The Journal of Biological*

Chemistry, 288(22), 15520–31.

Van Marken Lichtenbelt, W. D., Vanhommerig, J. W., Smulders, N. M., Drossaerts, J. M. a F. L., Kemerink, G. J., Bouvy, N. D., ... Teule, G. J. J. (2009). Cold-activated brown adipose tissue in healthy men. *The New England Journal of Medicine*, 360(15), 1500–8.

Vitali, a, Murano, I., Zingaretti, M. C., Frontini, A., Ricquier, D., & Cinti, S. (2012). The adipose organ of obesity-prone C57BL/6J mice is composed of mixed white and brown adipocytes. *Journal of Lipid Research*, 53(4), 619–29.

WHO. (2014). WHO \_ Obesity and overweight. Fact sheet N°311. Retrieved from <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>

Wu, J., Boström, P., Sparks, L. M., Ye, L., Choi, J. H., Giang, A.-H., ... Spiegelman, B. M. (2012). Beige adipocytes are a distinct type of thermogenic fat cell in mouse and human. *Cell*, 150(2), 366–76.

Xu, J., Lloyd, D. J., Hale, C., Stanislaus, S., Chen, M., Sivits, G., ... Ve, M. M. (2009). Fibroblast Growth Factor 21 Reverses Hepatic Steatosis , Increases Energy Expenditure , and Improves Insulin Sensitivity in Diet-Induced Obese Mice, 58.

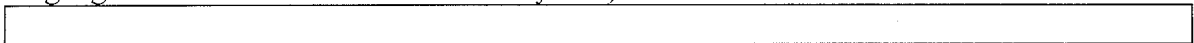
Yvan-Charvet, L., Even, P., Bloch-Faure, M., Guèrre-Millo, M., Moustaid-Moussa, N., Ferre, P., & Quignard-Boulangé, A. (2005). Deletion of the angiotensin type 2 receptor (AT2R) reduces adipose cell size and protects from diet-induced obesity and insulin resistance. *Diabetes*, 54(4), 991–999.

ntos et al., 2008). También se ha demostrado que un tratamiento oral con Ang-(1-7) previene la obesidad en ratas que recibieron una dieta alta en grasa, adicionalmente las concentraciones de citocinas proinflamatorias hepáticas disminuyeron ADDIN CSL\_CITATION {"citationItems" : [ { "id" : "ITEM-1", "itemData" : { "ISSN" : "1873-1686", "abstract" : "INTRODUCTION: The aim of the present study was to evaluate the effect of a transgenic-induced chronic increase of Ang-(1-7) on the expression of inflammatory markers in adipose tissue and the metabolic profile in rats treated with high-fat diet. RESEARCH DESIGN AND METHODS: Transgenic rats expressing an Ang-(1-7)-producing fusion protein (TGR L-3292) and Sprague Dawley (SD) control rats 4 weeks old were treated for 8 weeks with a high-fat diet. Food intake and body weight were measured once a week. Glucose-tolerance and insulin sensitivity tests were performed one week before the sacrifice. At the end of the experiment plasma lipid concentrations were measured in TGR and SD rats. Adipose tissue were weighted and corrected by the body weight. Proinflammatory markers in adipose tissue were analyzed using Western-blotting, real time-PCR and immunohistochemistry. RESULTS: High-fat diet TGR rats presented increased HDL cholesterol levels and decreased abdominal fat mass, without changes in food intake. In addition, rats with increased Ang-(1-7) levels had lower body weight. Molecular analysis revealed decreased IL-1 $\beta$  and COX-2 in adipose tissue. CONCLUSIONS: Taken together, these results show that chronic high circulating angiotensin-(1-7) levels protect against metabolic stress induced by a high-fat diet decreasing the proinflammatory profile of adipose tissue.", "author" : [ {"dropping-particle" : "", "family" : "Santos", "given" : "Sérgio Henrique S", "non-dropping-particle" : "", "parse-names" : false, "suffix" : "" }, { "dropping-particle" : "", "family" : "Fernandes", "given" : "Luciana Rodrigues", "non-dropping-particle" : "", "parse-names" : false, "suffix" : "" }, { "dropping-particle" : "", "family" : "Pereira", "given" : "Camila Santos", "non-dropping-particle" : "", "parse-names" : false, "suffix" : "" }, { "dropping-particle" : "", "family" : "Guimarães", "given" : "André L Senna", "non-dropping-particle" : "", "parse-names" : false, "suffix" : "" }, { "dropping-particle" : "", "family" : "Paula", "given" : "Alfredo M B", "non-dropping-particle" : "de", "parse-names" : false, "suffix" : "" }, { "dropping-particle" : "", "family" : "Campagnole-Santos", "given" : "Maria José", "non-dropping-particle" : "" ,



"parse-names" : false, "suffix" : "" }, { "dropping-particle" : "", "family" : "Alvarez-Leite", "given" : "Jacqueline Isaura", "non-dropping-particle" : "", "parse-names" : false, "suffix" : "" }, { "dropping-particle" : "", "family" : "Bader", "given" : "Michael", "non-dropping-particle" : "", "parse-names" : false, "suffix" : "" }, { "dropping-particle" : "", "family" : "Santos", "given" : "Robson Augusto S", "non-dropping-particle" : "", "parse-names" : false, "suffix" : "" } ], "container-title" : "Regulatory peptides", "id" : "ITEM-1", "issue" : "1-3", "issued" : { "date-parts" : [ [ "2012", "10", "10" ] ] }, "page" : "64-70", "publisher" : "Elsevier B.V.", "title" : "Increased circulating angiotensin-(1-7) protects white adipose tissue against development of a proinflammatory state stimulated by a high-fat diet.", "type" : "article-journal", "volume" : "178" }, "uris" :

[ "http://www.mendeley.com/documents/?uuid=a1c2885f-2d6c-4044-a96d-efc0de26c739" ] ], "mendeley" : { "manualFormatting" : "(Santos et al., 2012)", "previouslyFormattedCitation" : "(Sérgio Henrique S Santos et al., 2012)" }, "properties" : { "noteIndex" : 0 }, "schema" : "https://github.com/citation-style-language/schema/raw/master/csl-citation.json" } (Stucchi et al., 2009). ADDIN CSL\_CITATION { "citationItems" : [ { "id" : "ITEM-1", "itemData" : { "ISSN" : "1479-6805", "abstract" : "Angiotensin (Ang)-(1-7) is now recognized as a biologically active component of the renin-angiotensin system (RAS). Ang-(1-7) appears to play a central role in the RAS because it exerts a vast array of actions, many of them opposite to those attributed to the main effector peptide of the RAS, Ang II. The discovery of the Ang-converting enzyme (ACE) homolog ACE2 brought to light an important metabolic pathway responsible for Ang-(1-7) synthesis. This enzyme can form Ang-(1-7) from Ang II or less efficiently through hydrolysis of Ang I to Ang-(1-9) with subsequent Ang-(1-7) formation by ACE. In addition, it is now well established that the G protein-coupled receptor Mas is a functional binding site for Ang-(1-7). Thus, the axis formed by ACE2/Ang-(1-7)/Mas appears to represent an endogenous counterregulatory pathway within the RAS, the actions of which are in opposition to the vasoconstrictor/proliferative arm of the RAS consisting of ACE, Ang II, and AT(1) receptor. In this brief review, we will discuss recent findings related to the biological role of the ACE2/Ang-(1-7)/Mas arm in the cardiovascular and renal systems, as well as in metabolism. In addition, we will highlight the potential interactions of Ang-(1-7) and Mas with AT(1) and AT(2) receptors.", "author" : [ { "dropping-particle" : "", "family" : "Santos", "given" : "Robson a S", "non-dropping-particle" : "", "parse-names" : false, "suffix" : "" }, { "dropping-particle" : "", "family" : "Ferreira", "given" : "Anderson J", "non-dropping-particle" : "", "parse-names" : false, "suffix" : "" }, { "dropping-particle" : "", "family" : "Verano-Braga", "given" : "Thiago", "non-dropping-particle" : "", "parse-names" : false, "suffix" : "" }, { "dropping-particle" : "", "family" : "Bader", "given" : "Michael", "non-dropping-particle" : "", "parse-names" : false, "suffix" : "" } ], "container-title" : "The Journal of endocrinology", "id" : "ITEM-1", "issue" : "2", "issued" : { "date-parts" : [ [ "2013", "2" ] ] }, "page" : "R1-R17", "title" : "Angiotensin-converting enzyme 2, angiotensin-(1-7) and Mas: new players of the renin-angiotensin system.", "type" : "article-journal", "volume" : "216" }, "uris" : [ "http://www.mendeley.com/documents/?uuid=6057b6c6-79a5-4b8f-8eb3-2706e1154747" ] ], "mendeley" : { "manualFormatting" : "(Santos et al., 2013)", "previouslyFormattedCitation" : "(R. a. S. Santos, Ferreira, Verano-Braga, & Bader, 2013)" }, "properties" : { "noteIndex" : 0 }, "schema" : "https://github.com/citation-style-language/schema/raw/master/csl-citation.json" }





- A) SE TESTA NOMBRE DE PERSONAS FISICAS QUE NO SE TIENE LA CERTEZA DE SER SERVIDORES PÚBLICOS TODA VEZ QUE SE TRATA DE DATOS PERSONALES DE ACUERDO AL ARTÍCULO 113 FRACCIÓN I DE LA L.F.T.I.P.**
- B) SE TESTA FIRMA DE PERSONAS FISICAS QUE NO SE TIENE LA CERTEZA DE SER SERVIDORES PÚBLICOS TODA VEZ QUE SE TRATA DE DATOS PERSONALES DE ACUERDO AL ARTÍCULO 113 FRACCIÓN I DE LA L.F.T.I.P.**
- C) SE TESTA CORREO ELECTRÓNICO DE PERSONAS FISICAS QUE NO SE TIENE LA CERTEZA DE SER SERVIDORES PÚBLICOS TODA VEZ QUE SE TRATA DE DATOS PERSONALES DE ACUERDO AL ARTÍCULO 113 FRACCIÓN I DE LA L.F.T.I.P.**