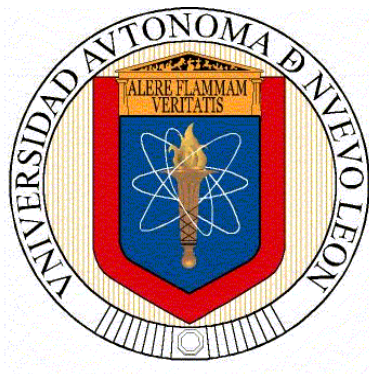


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



TESIS

**“EFECTO DE LA MODULACIÓN DE WT1 MEDIANTE
NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANO RNAI-WT1/CURCUMINA
SOBRE LA INDUCCIÓN DE UN FENOTIPO TERMOGÉNICO
EN ADIPOCITOS 3T3-L1 DIFERENCIADOS *IN VITRO*”**

POR

LBG. PAOLA ANTONIETA ZAPATA LARA

**COMO REQUISITO PARCIAL OBTENER EL GRADO DE
MAESTRIA EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN INMUNOBIOLOGÍA**

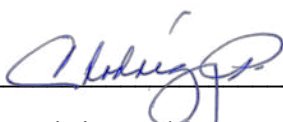
“Efecto de la modulación de WT1 mediante nanopartículas de quitosano RNAi-WT1/curcumina sobre la inducción de un fenotipo termogénico en adipocitos 3T3-L1 diferenciados *in vitro*”

Comité de tesis



Dra. Ana Carolina Martínez Torres

Presidente



Dra. Cristina Rodríguez Padilla

Secretario



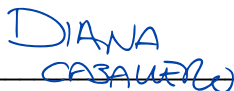
Dr. Kenny Misael Calvillo

Vocal 1



Dra. Diana Ginette Zarate Triviño

Vocal 2



Dra. Diana Elia Caballero

Vocal 3



Dra. Katiushka Arévalo Niño

Subdirectora de Posgrado



“Efecto de la modulación de WT1 mediante nanopartículas de quitosano RNAi-WT1/curcumina sobre la inducción de un fenotipo termogénico en adipocitos 3T3-L1 diferenciados in vitro”

Dirección de tesis

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Ana Carolina', is positioned above a horizontal line.

Directora interna

Dra. Ana Carolina Martínez Torres

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Edgar Manilla', is positioned above a horizontal line.

Director externo

Dr. Edgar Manilla Muñoz

DERECHOS RESERVADOS© PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta Tesis está protegido, el uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material contenido que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde se obtuvo mencionando al autor o autores.

Agradecimientos

Este proyecto de investigación no se podría haber realizado sin el apoyo del Laboratorio de Inmunología y Virología de la Facultad de Ciencias Biológicas de UANL. Agradezco el apoyo económico brindado por la Universidad de Monterrey. Por otra parte, quiero agradecer la confianza que pusieron en mí para comenzar una nueva línea de investigación: WT1-Obesidad. Agradezco a la Dra. Ana Carolina por guiarme y abrir mi perspectiva, por dejarme ser parte de su equipo, gracias por su comprensión y empatía en los obstáculos personales y profesionales que enfrente en la maestría. También quiero agradecer al Dr. Edgar Manilla, por su confianza y apoyo incondicional, gracias por ser parte tanto de mi infancia como en mi desarrollo profesional. Quiero agradecer a Isai, mi gran amigo, por escucharme y acompañarme incluso cuando ya no tenías que estar en el lab. Quiero agradecerle a Juan Ma por estar ahí, eres como un hermano mayor. Quiero agradecerle al L-5 por el compañerismo y amistad que me brindaron estos 2 años: Moni, Daphne, Fanny, Vianey, Isai, Tafur, Jesús, Rodrigo, Ruben, Ramses, Adriana, Armando, espero crecer a su lado. Además de dedicar esta tesis también le quiero agradecer a mi familia cada día que me aguantaron en este camino tan complejo al que me enfrente. Gracias papi, mami, manzana, mi abuelita y maya. Quiero agradecerle a Jorgin por nunca soltar mi mano a pesar de que cada vez yo apretaba más. Por último, quiero agradecerle a la vida, destino o lo que sea que exista en el más allá, espero crecer más a lado de ustedes.

Dedicatoria

Todo mi trabajo, esfuerzo y tiempo entregado en esta tesis es dedicado a mi familia, sin ellos nada hubiera sido posible. Papa, mi mayor mentor en la vida y en la investigación, gracias por apoyarme, aconsejarme, regañarme y guiarme en cada momento que lo necesite. Mami, gracias por cada desayuno, lonche y cena que me preparaste, gracias a ti no morí de hambre. Manzana, gracias por ser mi hermana, espero compartir mis frutos contigo todo lo que nos resta de vida. Mayita, mi perrihija, tú que siempre me recibes feliz, Lozoya, mi amor, gracias por tu apoyo en cada paso que di, por pasar por mí, acompañarme los sábados al laboratorio y a tomar fotos increíbles de las células. Los amo con todo mi corazón.

Índice

	Página
Resumen/Abstract.....	1
1.Introducción.....	3
2.Antecedentes.....	4
2.1 Obesidad.....	4
2.1.2 Epidemiología	4
2.1.3 Patología.....	5
2.2 Tejido adiposo.....	5
2.2.1 Pardeamiento de tejido adiposo.....	6
2.3 WT1 (Wilm's tumor 1)	7
2.3.1 Papel de WT1 en tejido adiposo blanco	8
2.3.2 WT1 modula la expresión de genes termogénicos.....	9
2.4 Silenciamiento de WT1.....	9
2.4.1 Terapia génica.....	10
2.5 Curcumina.....	11
2.6 Nanobiotecnología.....	12
2.6.1 Nanopartículas de quitosano.....	12
3.Justificación.....	14
4.Hipótesis.....	15
5.Objetivos.....	16
5.1 Objetivo general	16
5.2 Objetivos específicos.....	16
6.Material y métodos.....	17
6.1 Cultivo celular	17
6.1.1 Diferenciación celular de 3T3-L1 a adipocitos.....	17
6.1.2 Tinción ORO.....	17
6.2 Preparación de tratamiento de curcumina.....	18
6.3 Transformación bacteriana.....	18
6.3.1 Extracción de plásmido.....	19
6.3.2 Caracterización de DNA plasmídico.....	20
6.4 Síntesis y caracterización de nanopartículas de quitosano cargadas con curcumina y shRNA-WT1 (Np-Cur/shWT1).....	21
6.4.1 Preparación de tratamiento de las nanopartículas.....	21
6.5 Ensayo de citotoxicidad.....	22
6.6 Transfección de 3T3-L1 con lipofectamina.....	22
6.7 Extracción de RNA.....	23
6.7.1 Síntesis de cDNA.....	23
6.7.2 Reacción de Polimerasa (PCR).....	24
6.7.3 Gel de electroforesis.....	25
7.Resultados.....	26
7.1 Diferenciación de línea celular.....	26
7.2 Expresión WT1 en preadipocitos y adipocitos.....	26
diferenciados.....	
7.3 Extracción de plásmido y caracterización del plásmido.....	27
7.4 Caracterización de las nanopartículas de quitosano.....	28

7.5 Ensayos de citotoxicidad.....	30
7.6 Modulación de expresión de genes termogénicos y WT1.....	31
8.Discusión.....	34
9.Conclusiones.....	40
10.Perspectivas.....	41
11.Bibliografía.....	42
12.Resumen biográfico.....	46

Índice de tablas

	Paginas
1.Tratamientos evaluados en viabilidad celular.....	22
2.Concentraciones de reactivos utilizados en PCR.....	24
3.Secuencias de cebadores utilizados.....	24
4.Condiciones térmicas de los cebadores utilizados.....	25
5.Características de las nanopartículas cargadas con principios activos.....	29

Índice de figuras

	Pagina
1.Mapamundi de población con obesidad.....	4
2. Características del tejido adiposo.....	6
3.Estructura genómica y proteica de WT1.....	8
4.Mecanismo de acción de short hairpin RNA.....	10
5 Propiedades, métodos de síntesis, aplicaciones y áreas de investigación del quitosano.....	13
6.Plásmido pGSH-GFP.....	19
7.Línea celular 3T3-L1 en proceso de diferenciación.....	26
8.Expresión relativa de WT1 en 3T3-L1 y adipocitos diferenciados.....	27
9. Caracterización de pGSH1-GFP.....	28
10. Curva de calibración de curcumina.....	29
11.Encapsulación de plásmido pGSH1-GFP.....	30
12.Análisis de viabilidad en 3T3-L1 y adipocitos diferenciados....	31
13.Expresión relativa de WT1 y UCP1 en preadipocitos.....	32
14.Expresión relativa de WT1 y UCP1 en adipocitos diferenciados.....	33

Lista de símbolos y abreviaturas

- 3T3-L1: Línea celular murina de preadipocitos 3T3-L1
- ADN: Ácido desoxirribonucleico
- ARN : Ácido ribonucleico
- ATP: Adenosín trifosfato
- C57BL/6: Cepa murina C57BL/6
- CaCl₂: Cloruro de calcio
- cADN: ADN complementario
- CIDEA: Cell Death-Inducing DFFA-Like Effector A
- CO₂: Dióxido de carbono
- CRISPR- : Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats–
Cas CRISPR associated protein
- DH5 α : Cepa de *Escherichia coli* DH5 α
- DM1: Medio de diferenciación 1
- DM2: Medio de diferenciación 2
- DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium
- DMSO : Dimetil sulfóxido
- dNTPs: Desoxinucleótidos trifosfato
- E4 :Buffer de elución E4
- EBF2 :Early B-Cell Factor 2
- EcoRI : Enzima de restricción EcoRI

- FBS :Fetal Bovine Serum / suero fetal bovino
- FDA : Food and Drug Administration
- GAPDH : Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
- HDL: Lipoproteína de alta densidad
- HindIII: Enzima de restricción HindIII
- HMG-CoA : 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A
- IBMX: 3-isobutil-1-metilxantina
- IMC: Índice de masa corporal
- K562 : Línea celular K562
- LB : Luria-Bertani
- LDL : Lipoproteína de baja densidad
- L7 : Buffer de lisis L7
- MCP- Monocyte Chemoattractant Protein-1 / proteína quimioatrayente de 1: monocitos 1
- MgCl₂ : Cloruro de magnesio
- miARN: microARN
- miR-15 : microRNA-15
- miR-6 : microRNA-6
- MTT : Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
- N3 : Buffer de neutralización N3
- ND-1000: NanoDrop Spectrophotometer ND-1000
- NF-κB : Nuclear Factor kappa B

- NIDDK : National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases
- Np : Nanopartículas
- Np-Cur: Nanopartículas cargadas con curcumina
- Np-Cur/shWT1: Nanopartículas cargadas con curcumina y shRNA contra WT1
- OD: Optical Density / densidad óptica
- ON : Overnight / durante la noche
- ORO : Oil Red O
- OWO : World Obesity Observatory
- PBS: Phosphate-Buffered Saline / solución salina amortiguada con fosfatos
- PCR : Polymerase Chain Reaction / reacción en cadena de la polimerasa
- PGC-1 α : Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma Coactivator 1-alpha
- pGSH-GFP: Plásmido pGSH-GFP
- piRNA: PIWI-interacting RNA
- PIWI : P-element Induced Wimpy Testis protein family
- PKC: Proteína cinasa C
- PPAR- α : Peroxisome Proliferator-Activated Receptor alpha
- PPAR- γ :Peroxisome Proliferator-Activated Receptor gamma
- PRDM16 :PR Domain Containing 16
- Q1: Buffer de equilibrio Q1
- R3: Buffer de resuspensión R3
- RNasa A : Ribonucleasa A
- Rpm: Revoluciones por minuto

- RT : Reverse Transcriptase / transcriptasa reversa
- shRNA: Short hairpin RNA / RNA pequeño en horquilla
- sh-RNA-WT1; shRNA dirigido contra WT1
- siRNA; Small interfering RNA / RNA pequeño de interferencia
- STAT: Signal Transducer and Activator of Transcription
- TAE : Tris-acetato-EDTA
- TE: Tris-EDTA
- TNF- α :Tumor Necrosis Factor alpha / factor de necrosis tumoral alfa
- TPP: Tripolifosfato de sodio
- UCP1: Uncoupling Protein 1 / proteína desacoplante 1
- UV :Ultravioleta
- W8: Buffer de lavado W8
- WHO : World Health Organization / Organización Mundial de la Salud
- WT1 : Wilms' Tumor 1 / Tumor de Wilms 1

Símbolos

- %: porcentaje
- x g: fuerza centrífuga relativa
- °C: grados Celsius
- h: horas
- kDa: kilodalton
- M: molar
- mg: miligramo
- mg/mL: miligramos por mililitro
- min: minutos
- mL: mililitro
- mM: milimolar
- mV: milivoltios

- ng: nanogramos
- nm: nanomolar
- pb: pares de bases
- U/ μ L: unidades por microlito
- μ g: microgramo
- μ g/mL: microgramo por mililitro
- μ L: microlitro
- μ M: micromolar

RESUMEN

La obesidad es una enfermedad crónica asociada con la expansión del tejido adiposo blanco, inflamación de bajo grado y alteraciones metabólicas. WT1 ha sido descrito como un regulador de la identidad del tejido adiposo blanco visceral y como un posible inhibidor del programa termogénico, por lo que su modulación podría favorecer el pardeamiento adipocitario.

En este trabajo se evaluó el efecto de nanopartículas de quitosano cargadas con curcumina y un plásmido codificante para shRNA-WT1 sobre la viabilidad celular y la expresión de WT1 y UCP1 en células 3T3-L1 y adipocitos diferenciados. Las nanopartículas fueron sintetizadas por gelación iónica y caracterizadas mediante tamaño, potencial zeta, polidispersidad y eficiencia de encapsulación. Posteriormente, se evaluó la viabilidad celular mediante MTT y la expresión génica por PCR punto final.

Las nanopartículas presentaron tamaños nanométricos, carga superficial positiva y polidispersidad menor de 0.3. La encapsulación de curcumina fue de 98%, mientras que el plásmido no fue detectable en el sobrenadante. La curcumina libre y las nanopartículas de quitosano no mostraron citotoxicidad relevante; sin embargo, las formulaciones cargadas disminuyeron la viabilidad principalmente a las 48 y 72 horas. En preadipocitos, la curcumina y el plásmido redujeron parcialmente la expresión de WT1; en adipocitos diferenciados, las nanopartículas combinadas disminuyeron WT1, aunque este efecto se acompañó de reducción en la viabilidad celular. Bajo las condiciones evaluadas, no se detectó expresión de UCP1.

Estos resultados sugieren que las nanopartículas de quitosano pueden funcionar como sistema de entrega de curcumina y material plasmídico; sin embargo, la modulación de WT1 no fue suficiente para inducir un fenotipo termogénico detectable. Por lo tanto, se requiere optimizar dosis, tiempos de tratamiento y controles de citotoxicidad para confirmar su potencial en el pardeamiento adipocitario.

ABSTRACT

Obesity is a chronic disease associated with white adipose tissue expansion, low-grade inflammation, and metabolic dysfunction. WT1 has been described as a regulator of visceral white adipose tissue identity and a potential inhibitor of the thermogenic program; therefore, its modulation may represent a strategy to promote adipocyte browning.

This study evaluated the effect of chitosan nanoparticles loaded with curcumin and a plasmid encoding shRNA-WT1 on cell viability and WT1 and UCP1 expression in 3T3-L1 cells and differentiated adipocytes. Nanoparticles were synthesized by ionic gelation and characterized by size, zeta potential, polydispersity index, and encapsulation efficiency. Cell viability was assessed by MTT assay, while gene expression was analyzed by endpoint PCR.

The nanoparticles showed nanometric size, positive surface charge, and a polydispersity index below 0.3. Curcumin encapsulation efficiency was 98%, while plasmid DNA was not detected in the supernatant. Free curcumin and unloaded chitosan nanoparticles did not show relevant cytotoxicity; however, loaded formulations reduced cell viability mainly at 48 and 72 hours. In preadipocytes, curcumin and plasmid transfection partially reduced WT1 expression. In differentiated adipocytes, combined nanoparticles decreased WT1 expression, although this effect was accompanied by reduced cell viability. Under the evaluated conditions, UCP1 expression was not detected.

These results suggest that chitosan nanoparticles may serve as a delivery system for curcumin and plasmid DNA. However, WT1 modulation was not sufficient to induce a detectable thermogenic phenotype. Further optimization of dose, treatment time, and cytotoxicity controls is required to confirm its potential role in adipocyte browning.

1. INTRODUCCIÓN

La obesidad es una condición generada debido al exceso de tejido adiposo donde sus síntomas y signos reflejan alteraciones orgánicas. La población mexicana con sobrepeso representa un 34% de la población total, la Federación Mundial de Obesidad predice que habrá un aumento de 15% en la población mexicana con obesidad llegando a un 45-55% con obesidad para el 2035. Esta enfermedad conlleva comorbilidades graves, como el síndrome metabólico, diabetes tipo 2, dislipidemia e hipertensión, además de afectar órganos como el corazón, hígado y riñones.

El tejido adiposo almacena energía en gotas lipídicas y se clasifica en blanco y marrón. El tejido adiposo blanco se subdivide en visceral, asociado a la patogénesis de la obesidad, y subcutáneo, que se encuentra bajo la piel y tiene funciones protectoras. En contraste, el tejido adiposo marrón es metabólicamente activo y participa en la termogénesis, un proceso en el que la oxidación de lípidos genera calor. Ante estímulos como el frío, el tejido adiposo blanco puede adquirir características fenotípicas del marrón en un fenómeno denominado pardeamiento, lo que resulta beneficioso en la reducción del tejido adiposo visceral.

Diversos factores regulan esta transición, entre ellos WT1, un factor de transcripción que inhibe la expresión de genes termogénicos en el tejido adiposo blanco visceral. Su disminución puede lograrse mediante diversos mecanismos, entre los que se encuentran los elementos antisentido (siRNA y shRNA) que reducen la vida del transcrito, o el uso de polifenoles como la curcumina, que modula su expresión a través de microRNAs y su actividad mediante fosforilación por la vía PKC.

Además, la curcumina posee propiedades antiinflamatorias y capacidad para mejorar el metabolismo del colesterol. En este contexto, proponemos el uso de nanopartículas de quitosano cargadas con curcumina y un plásmido codificante para shRNA dirigido contra WT1, permitiendo la inducción de un fenotipo termogénico en adipocitos 3T3-L1 diferenciados in vitro.

2. ANTECEDENTES

2.1 Obesidad

La obesidad, considerada la pandemia del siglo XXI, se caracteriza por el daño generado debido al exceso de tejido adiposo donde sus síntomas y signos reflejan alteraciones orgánicas (Rubino et al., 2025). Diversos factores están involucrados en el desarrollo de esta condición, el entorno obesogénico juega un papel clave en el desarrollo del sobrepeso y obesidad, así como factores psicosociales y genéticos (Kaufer, et al., 2022). La obesidad aumenta el riesgo de padecer complicaciones de salud como el síndrome metabólico: mayor riesgo de diabetes tipo 2, dislipidemia, hipertensión, así como problemas cardiacos, respiratorios e incluso cáncer (NIDDK, 2025).

2.1.2 Epidemiología

Según la Organización Mundial de la Salud, en 2022, entre el 30 % y el 34 % de la población en México presentaba obesidad. Sin embargo, se estima un incremento del 15% en la próxima década, alcanzando entre el 43% y el 55% de la población. Por su parte, el Instituto Nacional de Salud Pública señala que al menos 1 de cada 8 adultos en México padece obesidad.

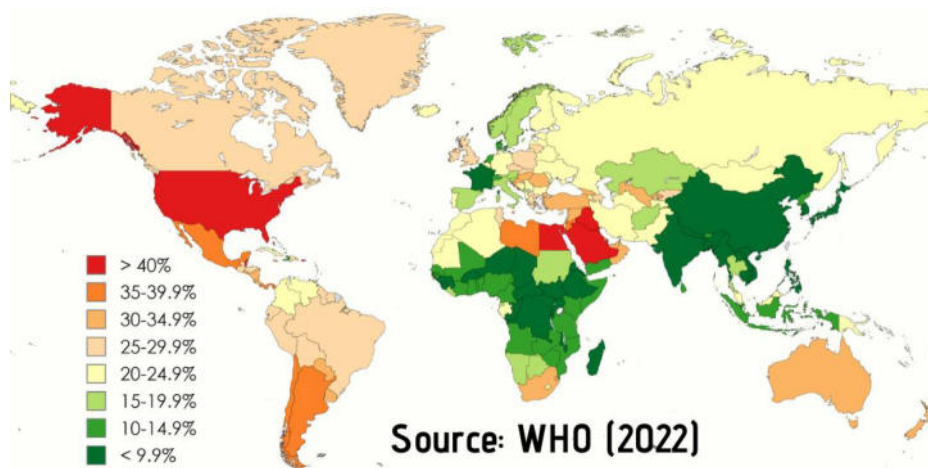


Figura 1. Mapamundi con el porcentaje de población que vive con obesidad según la WHO en 2022. World Health Organization (2025)

2.1.3 Patología

En pacientes con obesidad, el tejido adiposo se expande a través de un proceso conocido como hipertrofia, lo que conlleva una mayor liberación de ácidos grasos libres. Estos pueden afectar diversos órganos, como el músculo, reduciendo la captación de glucosa; el páncreas, dañando las células beta productoras de insulina; y el hígado, favoreciendo el desarrollo de esteatosis hepática no alcohólica (Gater et al., 2021).

La obesidad se considera un estado de inflamación crónica leve en el que el tejido adiposo blanco secreta adipocinas proinflamatorias que afectan estos órganos, contribuyendo al desarrollo del síndrome metabólico. Este síndrome se caracteriza por la presencia de diabetes tipo 2, hipertensión y dislipidemia.

Además, la obesidad puede impactar otros órganos, como el cerebro, aumentando el riesgo de apnea del sueño, y el corazón, favoreciendo insuficiencia cardíaca. También se ha asociado con un mayor riesgo de cáncer, ya que los pacientes con obesidad son más susceptibles a desarrollar hasta 13 tipos de cáncer (Nguyen et al., 2025).

2.2 Tejido adiposo

La obesidad se caracteriza por un aumento en la cantidad de tejido adiposo blanco, el cual se divide en dos tipos: tejido adiposo blanco visceral y tejido adiposo blanco subcutáneo. El tejido adiposo visceral se encuentra en proximidad a los órganos y está asociado con diversas complicaciones metabólicas debido a su entorno proinflamatorio. En contraste, el tejido adiposo subcutáneo se asocia con un perfil metabólico protector.

El tejido adiposo blanco se caracteriza por la presencia de adipocitos uniloculares, un número reducido de mitocondrias y un núcleo alargado. A diferencia del tejido adiposo marrón, el tejido adiposo blanco no expresa la proteína desacoplante 1 (UCP1). Una proteína localizada en la matriz mitocondrial que regula el gradiente de protones al evitar la síntesis de ATP y está involucrada en la termogénesis adaptativa sin escalofríos.

Por otro lado, el tejido adiposo marrón se caracteriza por su alta expresión de UCP1, un elevado número de mitocondrias y adipocitos multiloculares. Su función principal es la generación de calor a través de la termogénesis.

Existe una transición del tejido adiposo blanco hacia un fenotipo similar al tejido adiposo marrón, conocida como browning o pardeamiento. En este estado, los adipocitos presentan una expresión moderada de UCP1, una densidad intermedia de mitocondrias y múltiples gotas lipídicas, aunque de mayor tamaño que en el tejido adiposo marrón. A pesar de estas diferencias estructurales, el tejido beige también contribuye a la producción de calor mediante la termogénesis (Ziqubu et al., 2023).

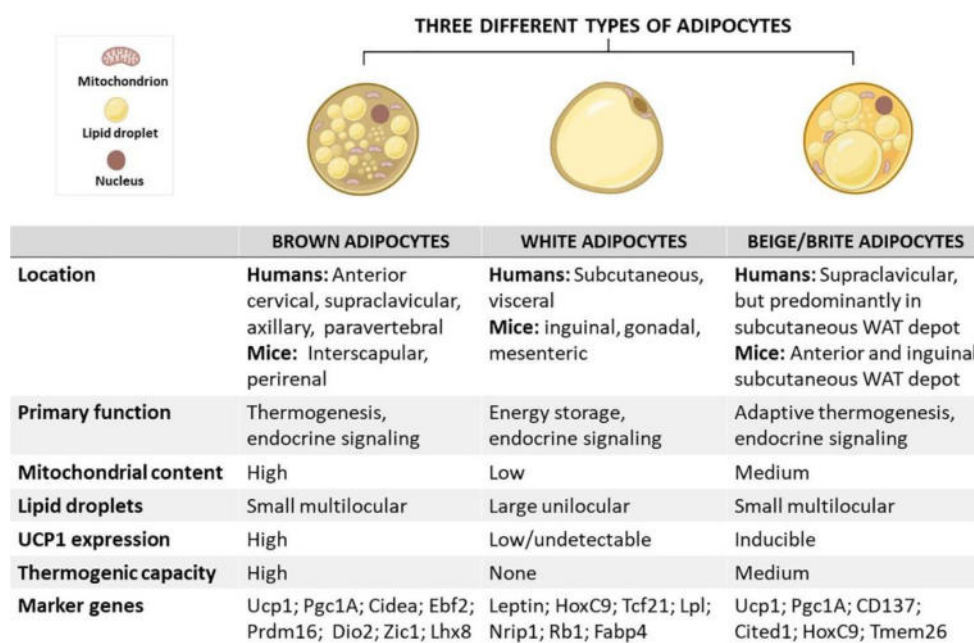


Figura 2. Características del tejido adiposo blanco, marrón y beige. (Ziqubu et al., 2023).

2.2.1 Pardeamiento del Tejido Adiposo

El pardeamiento es la capacidad de los adipocitos blancos para adquirir un perfil termogénico similar al del tejido adiposo marrón. Este proceso puede ocurrir de *novo* a partir de depósitos preexistentes de tejido adiposo blanco y puede ser inducido por diversos estímulos.

Uno de los principales estímulos es la exposición al frío, que activa el sistema nervioso simpático, promoviendo la liberación de catecolaminas como la norepinefrina. Estas actúan

sobre los receptores β -adrenérgicos, desencadenando la termogénesis. Además, el pardeamiento también puede ser inducido por hormonas y compuestos nutraceuticos, como el aceite de canela y la curcumina, que estimulan la producción de catecolaminas. Asimismo, se ha observado que el ejercicio físico favorece este proceso (Kuryłowicz y Puzianowska, 2020).

A nivel molecular, existen genes que regulan negativamente el pardeamiento. Uno de ellos es WT1 (Wilms' Tumor 1), cuya inhibición parcial ha demostrado activar genes termogénicos. Esto se debe a que WT1 facilita el reclutamiento de complejos represores que inhiben la expresión de EBF2, un factor clave en la inducción de la termogénesis.

Además, cuando WT1 es silenciado parcialmente, se reduce la oxidación del ácido retinoico, lo que favorece la expresión de genes asociados a la termogénesis y la activación del metabolismo energético en el tejido adiposo.

2.3 WT1 (Tumor de Wilms)

WT1 (Tumor de Wilms) es un factor de transcripción de 52 kDa que es caracterizado por la presencia de un dominio de unión al ADN a través de 4 dedos de zinc ubicados en la región carboxilo terminal de la proteína. Este gen experimenta dos eventos de splicing alternativos, uno en el exón 5 y otro en el exón 9, lo que da lugar a la inserción o delección de 17 y 3 aminoácidos respectivamente. Estas variaciones estructurales le confieren a WT1 la capacidad de modular la expresión de genes involucrados en diversos procesos biológicos, como la diferenciación sexual, el desarrollo del sistema urogenital, la proliferación celular y la inhibición de la apoptosis. En el cáncer con elevada expresión de WT1 se ha observado que este gen puede ser un excelente blanco terapéutico ya que en muchos tipos de cáncer es esencial para la proliferación celular y su inhibición con elementos antisentidos conducen a la muerte celular *in vitro*, y a la reducción de masa tumoral en modelos murinos (Zapata et al., 2012, Zamora et al., 2009).

Recientemente, se ha descubierto que WT1 también desempeña un papel clave en la obesidad, regulando la identidad del tejido adiposo blanco visceral.

Estructura de WT1

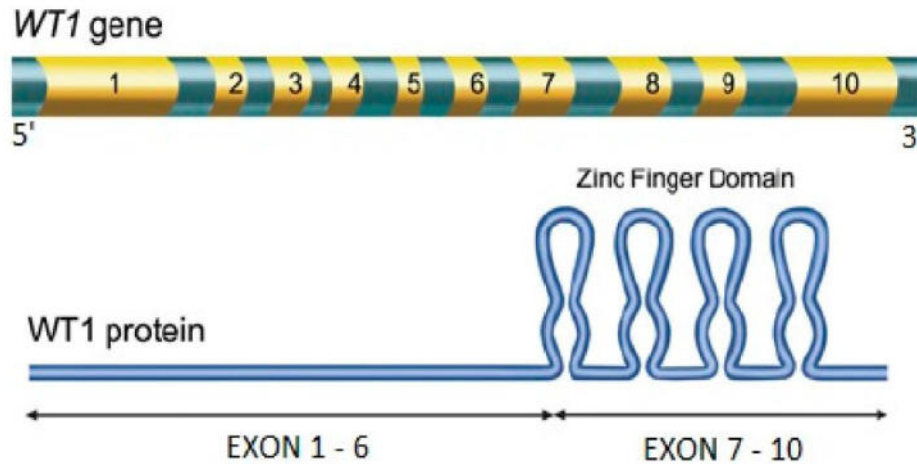


Figura 3. Estructura genómica y proteica de Tumor de Wilms 1 (WT1) (Al Hussain et al., 2014) .

2.3.1 Papel de WT1 en el Tejido Adiposo Blanco

Se ha observado que la pérdida parcial de WT1 provoca falla orgánica y pérdida de grasa corporal, lo que indica su papel clave en la homeostasis del tejido adiposo. WT1 es fundamental para mantener la identidad del adipocito blanco visceral, ya que su expresión se encuentra exclusivamente en este tejido y no en el tejido adiposo subcutáneo. Sin embargo, dentro del tejido adiposo visceral, existen subpoblaciones de adipocitos que no expresan WT1.

En un estudio realizado por Scholz et al. (2022), se identificó una relación inversa entre la expresión de WT1 y UCP1. Se observó que el silenciamiento parcial de WT1 promovía el proceso de pardeamiento en el tejido adiposo blanco. Además, en un modelo murino C57BL/6 alimentado con una dieta alta en grasas, la inhibición parcial de WT1 redujo el tamaño de las gotas lipídicas en comparación con los ratones wild-type sometidos a la misma dieta (Kirschner y Scholz, 2022).

2.3.2 WT1 Modula la Expresión de Genes Termogénicos

Kirschner y su grupo de investigación, analizó la expresión de WT1 en diferentes tipos de tejido adiposo y observaron que, en el tejido adiposo marrón, la expresión de WT1 es nula, mientras que los genes termogénicos, UCP1, PGC-1 α , PRDM16 y CIDEA están altamente expresados.

Para evaluar el impacto de WT1 en la termogénesis, se utilizó un vector retroviral para inducir su expresión en tejido adiposo marrón, induciendo una disminución en la expresión de genes termogénicos, sin afectar la identidad del tejido.

Por otro lado, el silenciamiento de WT1 con RNAi en el tejido adiposo blanco visceral, donde WT1 se expresa de manera basal pero los genes termogénicos están ausentes, aumentó la expresión de genes termogénicos, sin alterar los genes responsables de la identidad del tejido adiposo blanco (Kirschner y Scholz, 2022).

Estos hallazgos sugieren que WT1 actúa como un regulador negativo de la termogénesis, reprimiendo la expresión de genes clave en la activación del fenotipo termogénico del tejido adiposo.

2.4 Silenciamiento de WT1

La sobreexpresión del gen WT1 en diversos tipos de cáncer, como el cáncer de mama, cáncer de pulmón y leucemias, se asocia con un mayor grado de malignidad, así como con la obesidad. En el contexto del cáncer, la inhibición de WT1 mediante diferentes elementos antisentido, como oligonucleótidos antisentido y ARN de interferencia, reduce la vida media de su ARN mensajero, lo que disminuye la traducción de proteínas y favorece la muerte celular.

Por otro lado, en un contexto de cáncer, específicamente en leucemias se ha identificado el papel de la curcumina como modulador de WT1 a la baja, mediante la regulación de miR-15^a y miR-16-1, sugiriendo un mecanismo de microARNs (Gao et al., 2012).

Estos mecanismos permiten mejores estrategias terapéuticas para modular la función de WT1 en el tejido adiposo blanco y su impacto en enfermedades metabólicas.

2.4.1 Terapia génica

La terapia génica es una técnica enfocada en curar una enfermedad o un trastorno médico, ya sea mediante corrección génica editando un gen defectuoso con estrategias como CRISPR-Cas, adición génica es decir añadiendo un inserto faltante de un gen para una correcta expresión proteica y silenciamiento génico mediante elementos antisentido para disminuir la vida media de un transcrito blanco. Existen fármacos basados en edición génica para enfermedades genéticas, cáncer e inmunoterapia aprobados por la FDA (Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos). El silenciamiento génico mediante ARN de interferencia se basa en pequeñas secuencias de 20-30 pb de RNA bicatenario, existen al menos 4 tipos: small interfering RNA (siRNA) exógenos, microRNA (miRNA) exógenos y tienen una función de regulación génica, PIWI-interacting RNA (piRNA) asociado principalmente a regulación de elementos transponibles y short hairpin RNA (shRNA) producido sintéticamente. Estos elementos son procesados por un conjunto de proteínas que realizan cortes en la secuencia, permitiendo su maduración e inhibición de transcritos (Wang y Farhana, 2023).

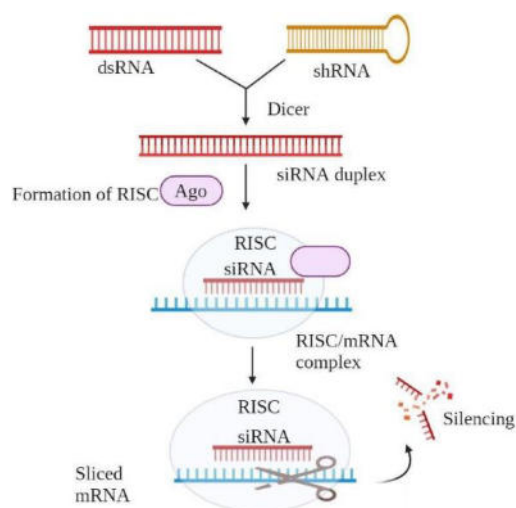


Figura 4. Mecanismo de silenciamiento de short hairpin RNA (Ritika et al., 2025).

La terapia génica enfocada en la obesidad tiene 2 enfoques: disminuir la expresión génica de moléculas involucradas en el proceso fisiopatológico de la obesidad como citocinas

proinflamatorias y transferencia de genes terapéuticos en pacientes con limitada expresión de moléculas como la leptina (Sheikh et al., 2025). La edición génica puede ser una estrategia prometedora para regular el metabolismo, mejorar la sensibilidad a la insulina y reducir la grasa corporal.

2.5 Curcumina

La curcumina (1,7-bis(4-hidroxi-3-metoxifenil)-1,6-heptadieno-3,5-diona) es un polifenol de color amarillo extraído de la *Curcuma longa*, ampliamente utilizado en la medicina ayurvédica durante aproximadamente 6000 años (Kasprzak et al., 2021).

Sus propiedades biológicas incluyen efectos antioxidantes, antiinflamatorios y moduladores del metabolismo lipídico. Se ha demostrado que la curcumina regula la expresión del gen WT1 a través de la sobreexpresión de miR-15a y miR-16-1, que lo reprimen negativamente (Gao et al., 2012), además de inhibir su expresión mediante la modulación de factores de transcripción que actúan sobre su promotor (Anuchapreeda et al., 2011). En células leucémicas, la inhibición de WT1 por curcumina induce apoptosis. Asimismo, la curcumina aumenta los niveles de lipoproteínas de alta densidad (HDL) mediante la activación de PPAR- α , un factor clave en el metabolismo del colesterol, mientras que disminuye las lipoproteínas de baja densidad (LDL) al inhibir la HMG-CoA reductasa, una enzima fundamental en su síntesis (Jarhahzadeh et al., 2021, Shao et al., 2012). Su capacidad antiinflamatoria se debe a la inhibición de múltiples vías proinflamatorias, como NF- κ B, el inflammasoma y la translocación de STAT (Peng et al., 2021). En el contexto de la obesidad, la curcumina contribuye a la pérdida de peso y reduce el riesgo de enfermedades metabólicas al atenuar la expresión de adipocinas proinflamatorias como TNF- α y MCP-1 (Bradford, 2023). También inhibe la adipogénesis al bloquear la diferenciación de preadipocitos y promover la apoptosis de adipocitos maduros, además de mejorar la resistencia a la insulina y prevenir su inducción por dietas ricas en grasas (Shao W et al., 2012). Se ha observado que regula los niveles de leptina y atenúa la lipogénesis hepática y la inflamación en los adipocitos (Chen et al., 2021). Otros estudios han reportado que la curcumina mejora la composición corporal, estimula la lipólisis y modula la actividad de factores de transcripción, enzimas, citocinas y factores de crecimiento. En pacientes con síndrome metabólico, su

consumo ha reducido significativamente el IMC, el peso y la circunferencia de la cintura, además de mejorar los niveles de homocisteína y HDL en hombres jóvenes y obesos.

2.6 Nanobiotecnología

La nanobiotecnología es un campo que ha permitido la explotación de materiales a nanoescala, es la combinación de parámetros nanométricos (100 nm) utilizados en la rama biotecnológica generando partículas como nanofibras, nanotubos, nanomembranas, nanopartículas con objetivo de superar baja solubilidad de compuestos, baja estabilidad molecular y toxicidad sistémica aprovechando las ventajas de los materiales. Ese tamaño nanométrico permite atravesar capilares sanguíneos evitando la eliminación por fagocitosis (Jhaveri et al., 2021). Las aplicaciones abarcan muchas ramas industriales, desde la farmacológica/médica, agrícola, energía, textil, alimentaria entre otras. Desde un enfoque médico la nanobiotecnología permite la administración controlada de fármacos, moduladores de expresión génica, terapias contra el cáncer, enfermedades neurodegenerativas entre otras. Todo esto utilizando materiales bióticos (bacterias, algas, cápsides virales) y abióticos (metales, proteínas, carbohidratos) (Shahcheraghi et al., 2022).

2.6.1 Nanopartículas de quitosano

El quitosano es un polisacárido altamente utilizado en la síntesis de nanopartículas, por su nobleza en tanto en síntesis como en propiedades. Es de origen natural derivado de la desacetilación de la quitina, un carbohidrato perteneciente a los exoesqueletos de crustáceos. El interés farmacobiológico por el quitosano se debe a sus propiedades de biodegradabilidad, biocompatibilidad, facilidad de uso, estabilidad y baja toxicidad (Jhaveri et al., 2021). Actualmente las nanopartículas de quitosano son utilizadas como potenciales portadores a base de biopolímeros que puede aplicarse en sistemas de administración de fármacos, incluyendo moléculas pequeñas, proteínas y polinucleótidos (Jaferník et al., 2023).

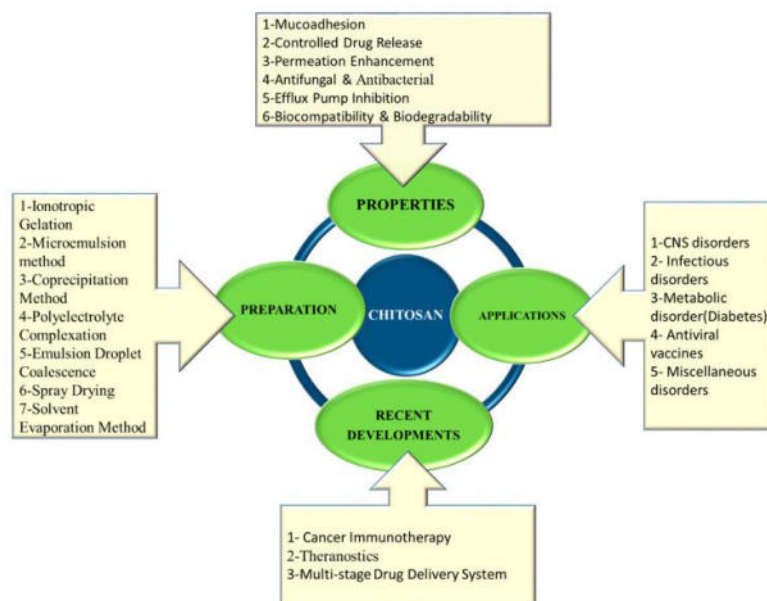


Figura 5. Propiedades, métodos de síntesis, aplicaciones y áreas de investigación donde se ha utilizado el quitosano (Jhaveri, et al. 2021).

3. JUSTIFICACIÓN

La obesidad es un problema de salud mundial, y el incremento del porcentaje de población con sobrepeso y obesidad en los últimos 30 años y la predicción de hasta un 10% de aumento de población con obesidad de forma global, es alarmante. Esto debido al conjunto de comorbilidades implicadas en esta condición, entre los que se encuentran el síndrome metabólico, dislipidemia, diabetes tipo 2, hipertensión, así como enfermedades cardiovasculares y mayor predisposición a desarrollar cáncer. Por ello, en esta tesis se propone la evaluación de la capacidad de un nanocomplejo cargado con curcumina y un elemento antisentido para disminuir la expresión de WT1 en 3T3-L1 con el fin de inducir un fenotipo termogénico.

4. HIPÓTESIS

La inhibición de WT1 mediante sh-RNA y curcumina favorece la conversión de tejido adiposo blanco a beige/marrón, promoviendo la activación de genes termogénicos en adipocitos diferenciados.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general: Evaluar el impacto de la inhibición de WT1 mediante un sh-RNA y curcumina en la conversión de grasa blanca en grasa beige/marrón al promover la activación de genes termogénicos en adipocitos diferenciados.

5.2 Objetivos específicos:

1. Estandarizar el protocolo de diferenciación adipogénica de la línea celular 3T3-L1
2. Determinar citotoxicidad de nanopartículas de quitosano cargadas con curcumina y sh-RNA contra WT1 (Np-Cur/shWT1) *in vitro* en la línea celular 3T3-L1.
3. Evaluar el efecto de la inhibición de la expresión del gen WT1 con nanopartículas de quitosano cargadas con curcumina y sh-RNA contra WT1 (Np-Cur/shWT1) sobre la expresión de UCP1 en preadipocitos y adipocitos blancos.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Cultivo celular

La línea celular 3T3-L1 se cultivó en medio Dulbecco's Modification of Eagle's Medium (DMEM) suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS), 1% de penicilina-estreptomicina (Gibco™) a 37 °C en una incubadora de CO2 humidificada.

6.1.1 Diferenciación celular 3T3-L1 a Adipocitos

Para la inducción de adipogénesis se sembraron 200 células por pozo en una placa de 6 pozos utilizando medio DMEM tradicional, se dejó un día a que las células se adhirieran. Se realizó cambio de medio a DM1 (Insulina: 10 µg/ml, Dexametasona: 1 µM, IBMX: 0.05 mM, DMEM 10% SFB) por 3 días, posteriormente se realizó cambio a DM2 (Insulina: 10 µg/ml y DMEM 10% SFB) por 3 días, finalmente se cambió el medio a DMEM tradicional. Para confirmación de la diferenciación las células fueron teñidas con tinción ORO (Oil Red O)

6.1.2 Tinción ORO

Se preparó una solución de trabajo de Oil Red O en proporción 3:2, mezclando 9 mL de la solución stock con 6 mL de agua bidestilada. Tanto la solución stock como la solución de trabajo fueron filtradas previamente para eliminar precipitados y garantizar la homogeneidad de la tinción. Posteriormente, se retiró el medio de cultivo de las células y se realizaron uno o dos lavados con 1 mL de PBS 1X por pozo, con el fin de eliminar residuos del medio.

Las células fueron fijadas mediante la adición de 1 mL de formaldehído al 4% por pozo, seguido de una incubación durante 24 horas a 4°C. Finalizado este tiempo, el formaldehído fue retirado y las células se lavaron nuevamente con PBS 1X para eliminar el exceso de fijador. Se añadió 1 mL de la solución de Oil Red O a cada pozo y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente, permitiendo la tinción de los lípidos intracelulares. Finalmente, se retiró la solución de tinción y las células se lavaron cuidadosamente con agua bidestilada hasta eliminar completamente el exceso de colorante.

6.2 Preparación de tratamiento de curcumina

Se realizó la solución stock de 50 mM de curcumina (Sigma Aldrich) disuelta en metanol como solvente. A partir de la solución madre se realizaron las soluciones de trabajo en medio DMEM. Las concentraciones de trabajo se diluyeron para obtener las siguientes concentraciones 1, 3, 5, 10, 20, 30, 50 μ M.

6.3 Transformación bacteriana

La preparación de las bacterias calcio-competentes se realizó a partir de un cultivo nocturno obtenido mediante la inoculación de 50 μ L de bacterias en 5 mL de medio de cultivo LB, en incubación ON a 37 °C. Posteriormente, se tomaron 50 μ L del cultivo y se recultivó en un volumen de 5 mL durante 4 h a 37 °C con el fin de alcanzar la fase de crecimiento exponencial. El cultivo resultante se distribuyó en tubos de 1.5 mL (dos veces el volumen total) y se centrifugó para descartar el sobrenadante. El pellet celular se resuspendió en 400 μ L de CaCl_2 (50 mM) y se incubó durante 20 min. Tras una nueva centrifugación y eliminación del sobrenadante, el pellet se resuspendió en 20 μ L de CaCl_2 y se adicionó 1 μ L del plásmido pGSH1-GFP (Figura 6) incubándose posteriormente en hielo durante 1 h. después de este tiempo de incubación, se realizó un choque térmico a 42 °C durante 1 min, seguido de centrifugación, resuspensión en 200 μ L de medio de cultivo antibiótico e incubación a 37 °C durante 40 min para su recuperación, después de este periodo las bacterias se sembraron en placa en agar LB suplementado con kanamicina 50 μ g/mL y se dejaron crecer toda la noche para posteriormente realizar la extracción de plásmidos.

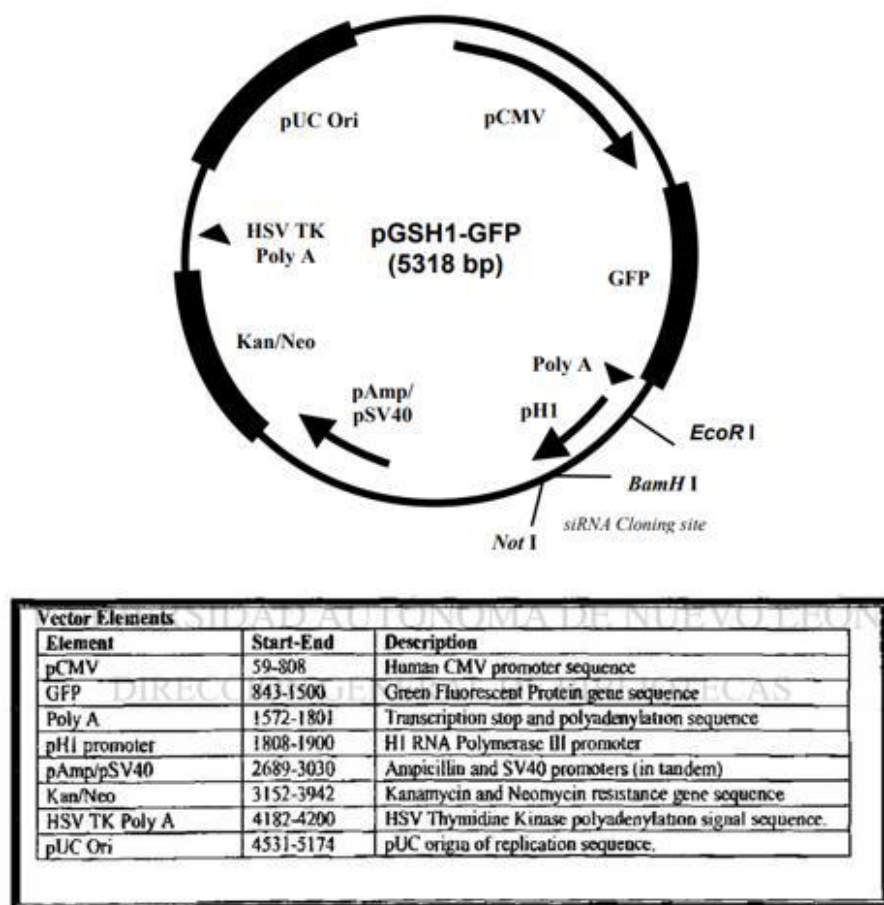


Figura 6. Plásmido pGSH1-GFP. Elementos del vector

6.3.1 Extracción de plásmido

La extracción de DNA plasmídico se realizó utilizando un PureLink® HiPure Plasmid Filter Purification Kit Midiprep de acuerdo con las indicaciones del fabricante. Para la activación bacteriana, se inocularon 50 μ L de bacterias *E. coli* DH5 α en 5 mL de medio de cultivo suplementado con kanamicina (50 μ g/mL), incubándose posteriormente durante la noche. Con la finalidad de propagar el cultivo bacteriano, éste se transfirió a 25 mL de medio fresco con antibiótico y se incubó nuevamente durante toda la noche.

Previo a la purificación, la columna se equilibró mediante la adición de 15 mL de buffer Q1 (buffer de equilibrio), permitiendo el paso del líquido por gravedad; durante este tiempo, se procedió a la cosecha del cultivo bacteriano. El cultivo se centrifugó a 4000 $\times$ g durante 10

min y el sobrenadante se descartó. El pellet bacteriano se resuspendió en 10 mL de buffer R3 (buffer de resuspensión), asegurando la adición de RNasa A, y se agitó suavemente hasta su completa homogeneización. Posteriormente, se adicionaron 10 mL de buffer L7 (buffer de lisis), mezclando cuidadosamente sin agitar en vortex y sin exceder un tiempo de incubación de 5 min. A continuación, se agregaron 10 mL de buffer N3 (buffer de neutralización) y la mezcla se homogeneizó por inversión.

El precipitado resultante se transfirió a la columna previamente equilibrada, permitiendo el flujo por gravedad, seguido de un lavado con 20 mL de buffer W8 (buffer de lavado). Para la elución del DNA plasmídico, se añadieron 5 mL de buffer E4 (buffer de elución), permitiendo nuevamente el paso por gravedad. El DNA eluido se precipitó mediante la adición de 3.5 mL de isopropanol (0.7 volúmenes) y se centrifugó a $12\,000 \times g$ durante 30 min a 4 °C. El sobrenadante se decantó y el pellet se lavó con 5 mL de etanol al 70 %, seguido de una centrifugación a $12\,000 \times g$ durante 5 min a 4 °C. Posteriormente, el pellet se dejó secar a temperatura ambiente y se resuspendió en 200 µL de buffer TE.

Finalmente, la concentración del DNA plasmídico se determinó mediante espectrofotometría a 260 nm utilizando un NanoDrop Spectrophotometer ND-1000, y su integridad se evaluó mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.8 %.

6.3.2 Caracterización de DNA plasmídico

La caracterización del plásmido se realizó por digestión enzimática. Se emplearon las enzimas de restricción HindIII y EcoRI, seleccionadas por reconocer sitios específicos dentro de la secuencia de interés. La reacción se preparó en un volumen final de 10 µL, conteniendo 8 µL de ADN plasmídico, 1 µL del buffer de reacción correspondiente (10X) y 1 µL de la enzima de restricción. Las muestras se incubaron a 37 °C por 1 hora y media para garantizar una digestión completa. Posteriormente, los productos de la digestión se analizaron mediante electroforesis a 100 V en gel de agarosa al 0.8 % y teñido con bromuro de etidio lo que permitió verificar el patrón de fragmentación esperado en un transiluminador de UV.

6.4 Síntesis y Caracterización de Nanopartículas de quitosano cargadas con curcumina y shRNA-WT1 (Np-Cur/shWT1)

Las nanopartículas de quitosano cargadas con curcumina y un plásmido codificante para shRNA dirigido contra WT1 (Np-Cur/shWT1) se prepararon mediante el método de gelación iónica. Se hidrató quitosano de peso molecular alto (Sigma-Aldrich) en ácido acético glacial 0.1 M, empleando una proporción de 25 mg en 25 mL, para obtener una concentración final de 1 mg/mL, bajo agitación constante durante toda la noche. Posteriormente, se ajustó el pH de la solución de quitosano a 5. A continuación, se adicionó 10 µl de curcumina disuelta en metanol grado molecular (2.5 mg/mL) Posteriormente, se incorporaron 100 µL del agente reticulante tripolifosfato de sodio (TPP) (Sigma Aldrich) a una concentración de 2 mg/mL previamente mezclado con el material plasmídico pGSH1-GFP. 10 µg/mL) Esta mezcla se añadió a la solución de quitosano de manera gradual por goteo (1 gota cada 2 s), bajo agitación a 850 rpm por 30 minutos.

Para determinar el tamaño se realizó una dilución 1:10 y para el potencial zeta se tomó 1 mL de las nanopartículas, la lectura se realizó en un zetasizer (Nano ZS90)

6.4.1 Preparación de tratamiento de las nanopartículas

El porcentaje de encapsulación se determinó centrifugando las nanopartículas a 10,000 rpm, se midió el sobrenadante por espectrometría para determinar concentración de curcumina y DNA plasmídico. El porcentaje de encapsulación se calculó restando la cantidad libre

$$EE(\%) = \left(\frac{\text{Fármaco Total Añadido} - \text{Fármaco Libre (en el sobrenadante)}}{\text{Fármaco Total Añadido}} \right) \times 100$$

Ec. 1 Porcentaje de encapsulación de un fármaco.

Se realizó una curva de calibración para la curcumina utilizando un estándar de 2500 µg/mL, se realizó la curva con las concentraciones: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 15, 20 µg/mL. Se midió la absorbancia a 425 nm en un lector de placa (Variskan Lux 320-435 Thermo Scientific).

6.5 Ensayo de Citotoxicidad. Para el ensayo de viabilidad se utilizó el ensayo colorimétrico MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) (Thermofisher, Massachussets, USA) en una placa de 96 pozos se sembraron 5×10^3 célula por pozo. A las 24 horas de siembra se administraron las respectivas dosis del tratamiento correspondiente al ensayo por triplicado. Control negativo: células sin tratamiento, blanco de lectura: medio + MTT + metanol, sin células y control de interferencia óptica: nanopartículas/tratamiento + MTT sin células. Los ensayos se llevaron hasta las 72 horas.

Tabla 1. Tratamientos y concentraciones evaluadas en el ensayo de viabilidad celular.

Tratamiento	Dosis
Curcumina	1, 3, 5, 10, 20, 30 y 50 μM
Np	25, 50, 75, 100 $\mu\text{g/mL}$
Np-Cur	5, 10, 15, 20 μM
NP-shRNA	30 ng, 60 ng, 90 ng y 120 ng
Np-Cur/shWT1	5 μM + 30 ng, 10 μM + 60 ng, 15 μM + 90 ng y 20 μM + 120 ng

Se agregaron 20 μL de MTT (5 mg/mL) por pozo y se incubó por 3 horas en condiciones de 37 °C y oscuridad total, pasada la incubación se agregó a cada pozo 100 μL de DMSO (dimetil-sulfóxido) se incubó por 2 minutos. Se leyó en lector de placa a una absorbancia de 570 nm. (Variskan Lux 320-435 Thermo Scientific).

6.6 Transfección de 3T3-L1 con Lipofectamina

Se sembraron 2×10^5 células 3T3-L1 por pozo en placas de 6 pozos, se sometieron al protocolo de diferenciación por 10 días. Al día 11 se realizó la transfección con Lipofectamina 2000 (Thermo Fisher Scientific) utilizando una relación 3:1 de DNA:Lipofectamina. Se utilizó .250 μg , 0.500 μg , 1 μg y 2 μg del plásmido para la transfección. Se hizo cambio de medio a las 6 horas y se dejó el tratamiento por 48 horas.

6.7 Extracción de RNA

Cada muestra se resuspendió en 1 mL de TRI Reagent, se resuspendió hasta volverse homogénea y se incubó por 5 minutos a temperatura ambiente, se agregaron 200 μ L de cloroformo, se agitó la muestra hasta volverse homogénea (no agitación en vortex) y se centrifugó a 15 minutos 12000 rpm a 4° C, se pasó la fase acuosa (sin tomar la interfase y fase orgánica) a un nuevo tubo de 1.5 mL a la cual se le agregó 500 μ L de isopropanol y se incubó por 7 minutos a temperatura ambiente, la muestra se centrifugó por 8 minutos a 12000 rpm a 4° C, se retiró el sobrenadante, el pellet se lavó con 1 mL de etanol a 75 %, se centrifugó por 5 minutos a 8000 rpm a temperatura ambiente, el etanol fue decantado y se dejó secar al aire libre. Se realizó la cuantificación del RNA extraído en un espectrofotómetro NanoDrop (NanoDrop Spectrophotometer ND-1000) a 260 nm y se observó integridad en un gel de agarosa de 1.5 %.

6.7.1 Síntesis de cDNA

La síntesis de cDNA se realizó utilizando el RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit. Para la reacción, se mezclaron 1 μ L de oligo(dT), 1 μ L de RNA previamente cuantificado y 10 μ L de agua libre de nucleasas. La mezcla se incubó durante 5 min a 65 °C y se enfrió inmediatamente en hielo. Posteriormente, se adicionaron 4 μ L de Reaction Buffer, 1 μ L de RiboLock RNase Inhibitor, 2 μ L de dNTPs y 1 μ L de RevertAid Reverse Transcriptase, alcanzando un volumen final de 20 μ L. La reacción de retrotranscripción se llevó a cabo en un termociclador Applied Biosystems 2720 Thermal Cycler, bajo las siguientes condiciones: 60 minutos a 42 °C, 5 minutos a 70 °C.

6.7.2 Reacción de Polimerasa (PCR)

Tabla 2. Volúmenes y concentraciones de reactivos utilizados para la preparación de master mix de PCR

Reactivo	μL por reacción	μL para 25 reacciones
Buffer 5X	5.0	125
MgCl ₂ 25 mM	1.5	37.5
Mezcla de dNTPs 10 mM c/u	0.5	12.5
DNA polimerasa (BioLine) (5U/ μL)	0.2	5

Se tomaron 7.2 μL del master mix por reacción, se adicionó 0.5 μL de cebador forward, 0.5 μL de cebador reverse, 300 ng de cDNA y 15.8 μL de agua grado molecular.

Tabla 3. Cebadores utilizados para la amplificación de genes relacionados con adipogénesis y termogénesis mediante PCR.

Gen	Cebadores	Tamaño de amplicón
GAPDH	F: AAA TGG TGA AGG TCG GTG TG R: TGAATTTGCCGTGAGTGGAG	165 pb
WT1	F: CACATGAGAGAAACGCCCCTTCATGTG R: TTTGAGCTGGTCTGAACGAGAAA	160 pb
UCP1	F: GGGCCCTTGTAACAACAAA R: GTCGGTCCTTCCTTGCACTT	200 pb

Tabla 4. Condiciones térmicas empleadas para la amplificación génica mediante PCR.

Gen	Desnaturalización	Hibridación	Elongación	Número de ciclos
GAPDH	94 °C	62.6 °C	72 °C	35
WT1	94 °C	62 °C	72 °C	35
UCP1	94 °C	60 °C	72 °C	35

La reacción de cadena de la polimerasa se llevó a cabo en un termociclador Applied Biosystems 2720 Thermal Cycler.

6.7.3 Gel de electroforesis

Los amplicones correspondientes a los genes analizados se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.2 % (UltraPure™ Agarose) preparado con buffer TAE y teñido con 0.5 µL de bromuro de etidio. El gel se colocó en una cámara de electroforesis (BioRad) conectada a una fuente de poder (BioRad Power Pak200), y la corrida electroforética se realizó aplicando un voltaje constante de 100 V durante 20 min. Posteriormente, los productos de amplificación se visualizaron y se documentaron utilizando un sistema de Transiluminador (UV/White Light Transiluminat).

7. RESULTADOS

7.1 Diferenciación de línea celular

La línea celular 3T3-L1 fue sometida a un protocolo de diferenciación utilizando insulina, dexametasona e IBMX por 10 días. Al día 0 se observa la morfología típica fibroblástica, al día 7 ya se identifica cambio morfológico caracterizado por la acumulación de gotas lipídicas y disminución en la proliferación celular, al día 10 se ve un fenotipo con acumulación de gotas lipídicas más evidentes (Figura 7). Se utilizó la tinción ORO para confirmar acumulación de gotas lipídicas al día 10 (Figura 7).

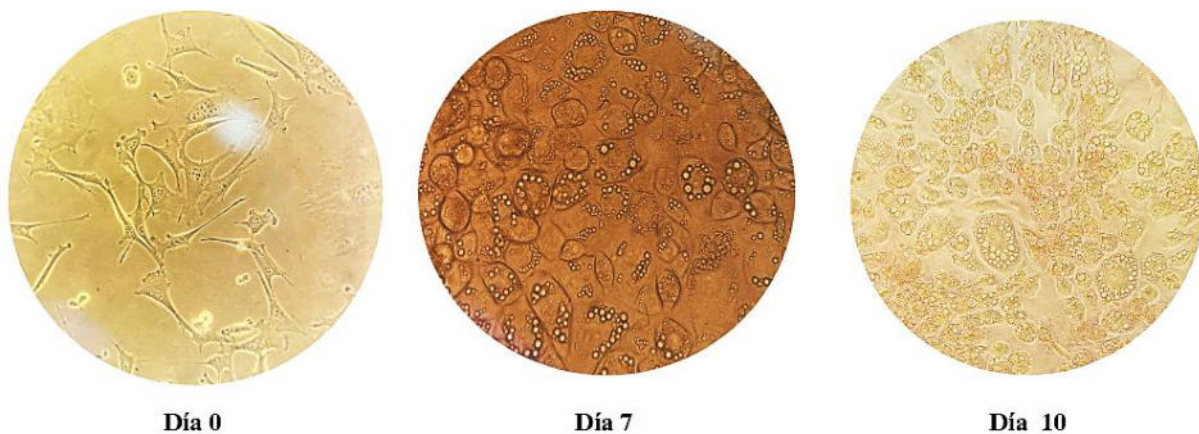


Figura 7. Línea celular 3T3-L1 en proceso de diferenciación a adipocitos blancos al día 0, 7 y 10. Al día 10 se utilizó la tinción ORO para visualizar gotas lipídicas.

7.2 Expresión WT1 en preadipocitos y adipocitos diferenciados

El papel de WT1 en la obesidad se ha identificado como un indicador de identidad de tejido adiposo blanco; sin embargo se desconocía su expresión tanto en la línea celular 3T3-L1 como en adipocitos diferenciados a un fenotipo blanco/obesogénico. Se identificó la expresión relativa de WT1 en la línea preadipocítica así como utilizando adipocitos diferenciados durante 10 días, utilizando como control negativo (agua grado molecular) y control positivo la línea celular K562 correspondiendo una línea leucemica mieloide crónica, cuya expresión ya ha sido caracterizada (Figura 8a). Se observa un aumento de casi el doble

en la expresión de WT1 en adipocitos diferenciados con respecto a la línea celular de preadipocitos (Figura 8b).

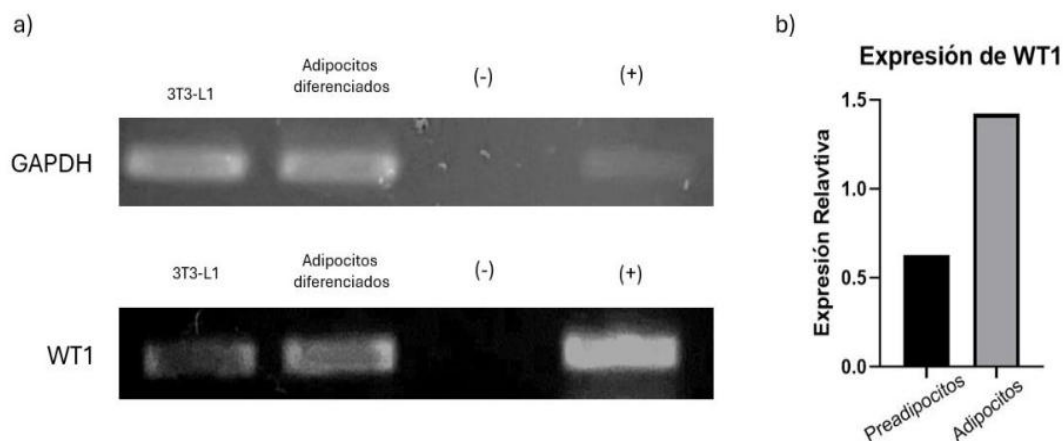


Figura 8. Expresión de relativa WT1. a) Gel de agarosa 1.5%. Expresión de GAPDH como control de normalización en 3T3-L1, adipocitos diferenciados, control negativo (agua) y control positivo (línea celular K562, Leucemia miológica inmortalizada). Expresión de WT1 en 3T3-L1, adipocitos diferenciados, control negativo (agua), control positivo (línea celular K562, Leucemia mielógena inmortalizada). b) Expresión relativa de WT1 analizada en ImageJ normalizada con GAPDH.

7.3 Extracción de plásmido y caracterización del plásmido

Se extrajo el plásmido de silenciamiento de WT1 mediante lisis alcalina (Figura 9a). Se observaron las isoformas relajado y enrollado. Para confirmar el uso del plásmido de silenciamiento de WT1 se realizó una digestión enzimática con HindIII y EcoRI. Se utilizó el plásmido sin digerir como control positivo, los productos del plásmido digerido por HindIII se visualizó linearizado y con EcoRI un patrón de doble banda. (Figura 9b).

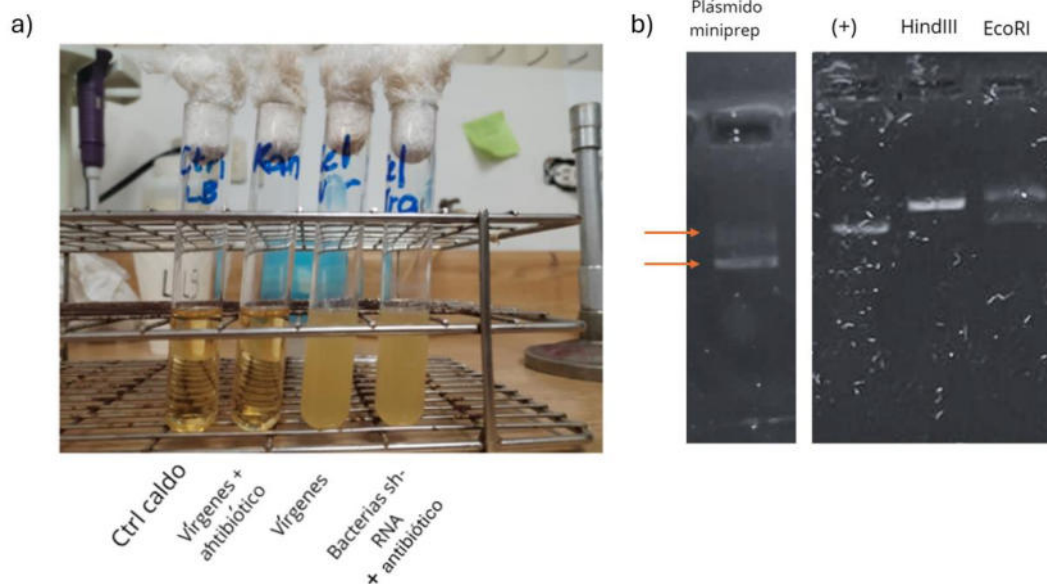


Figura 9. Caracterización de pGSH1-GFP. a) Controles de crecimiento bacteriano. Control de inocuidad del caldo. Bacterias *E. coli* vírgenes DH5 α con kanamicina. Bacterias *E. coli* vírgenes DH5 α – Bacterias DH5 α transformadas con pGSH1-GFP y kanamicina b) Plásmido pGSH1-GFP, flechas muestran isoformas enrollado y superenrollado. Caracterización de pGSH1-GFP con Hind III: linealizado y EcoRI: 2 cortes.

7.4 Caracterización de las nanopartículas de quitosano

La síntesis de las nanopartículas se realizó mediante gelación iónica, se analizaron sus tamaños y potencial Z para identificar el punto de mayor estabilidad (Tabla 5). Las nanopartículas de quitosano presentaron un tamaño de 136.3 nm y una carga positiva de 21.7 mV. Las nanopartículas de quitosano cargadas con curcumina presentaron un tamaño de 124.1 nm con una carga positiva de 26.2 mV., El pGSH1-GFP encapsulado en quitosano presentó un tamaño de 126.7 nm y una carga de 28.1 mV. El nanocomplejo cargado con curcumina y pGSH1-GFP (Np-Cur-shRNA) presentó un tamaño de 174 nm con una carga positiva de 27.1 mV. Los tamaños obtenidos se encuentran dentro del rango nanométrico compatible con procesos de internalización celular reportados para sistemas nanoparticulados. Las síntesis mostraron una polidispersidad menor de 0.3 demostrando una homogeneidad en la población de tamaño.

Tabla 5. Características de las nanopartículas de quitosano y cargadas con los principios activos. Tamaño, potencial Z y polidispersidad.

Nanopartícula	Tamaño	Potencial Z	Polidispersidad
Np	136.3 ± 11.1nm	21.7 ± 0.5 mV	0.170
Np-Cur	124.1 ± 15.4 nm	26.2 ± 3.9 mV	0.268
NP-shRNA	126.7 ± 3.2 nm	28.1 ± 0.9 mV	0.270
Np-Cur-shRNA	174 ± 16 nm	27.1 mV	0.277

El porcentaje de encapsulación de la curcumina fue de 98 % en ambos nanocomplejos, se calculó con base a la curva de calibración de curcumina libre. (Figura 10).

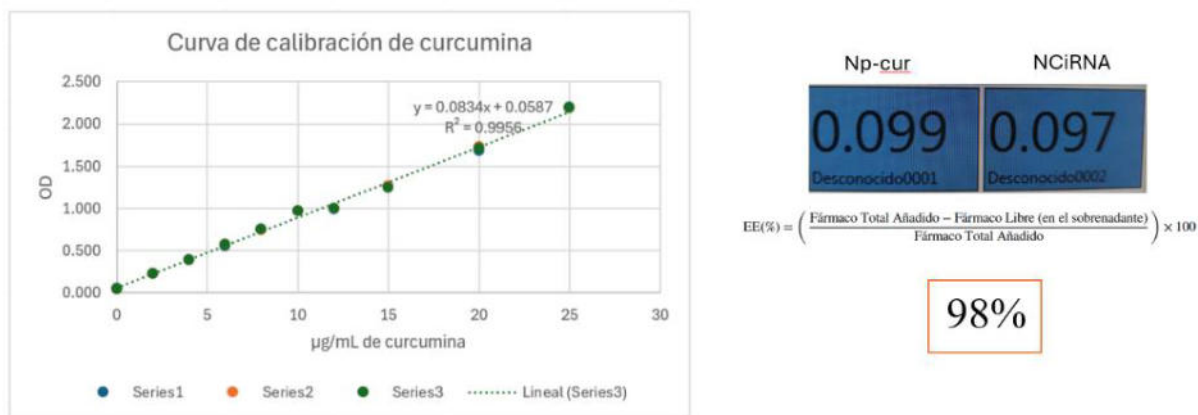


Figura 10. Curva de calibración de curcumina usada para calcular el porcentaje de encapsulación. OD correspondiente a un 98% de encapsulación.

El porcentaje de encapsulación de pGSH1-GFP fue del 100%. El sobrenadante de las NP-shRNA presento una concentración de material genético residual de -10.5 ng/uL y el de las Np-Cur-shRNA una concentración de -5.2 ng/µL. Además, se corrió el sobrenadante de ambas nanopartículas junto con una curva de calibración de 12.5, 20, 30 y 40 ng de plásmido en un gel de agarosa al 0.8% (Figura 11) Ambos sobrenadantes no mostraron presencia de material genético.

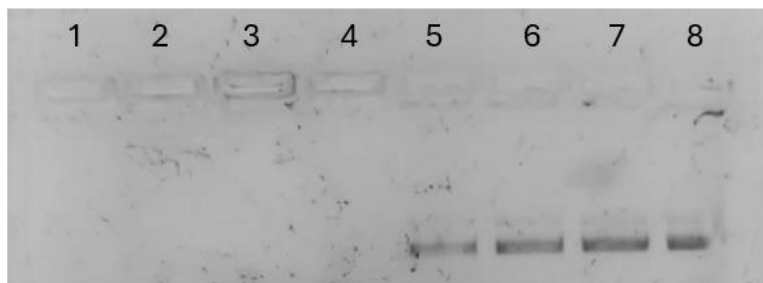


Figura 11. Encapsulación del plásmido pGSH1-GFP. 1) Np-iRNA sin centrifugar. 2) Sobrenadante de Np-iRNA. 3) Np-Cur-shRNA sin centrifugar. 4) Sobrenadante de Np-Cur-shRNA 5) 12.5 ng de pGSH1-GFP. 6) 20 ng de pGSH1-GFP. 7) ng de pGSH1-GFP. 8) 40 ng de pGSH1-GFP.

7.5 Ensayos de citotoxicidad

La viabilidad celular se evaluó mediante MTT a las 24, 48 y 72 horas para determinar el posible efecto citotóxico de los tratamientos encapsulados y no encapsulados en preadipocitos 3T3-L1 y adipocitos diferenciados. La curcumina libre no mostró efecto citotóxico evidente en preadipocitos, ya que la viabilidad se mantuvo cercana o superior al 100 % en las concentraciones evaluadas (Figura 13a). De forma similar, las nanopartículas de quitosano sin carga mantuvieron la viabilidad celular alrededor del 100 %, sin cambios relevantes entre concentraciones (Figura 12b).

Las nanopartículas cargadas con curcumina mostraron una respuesta variable: a las 24 horas no se observó disminución de la viabilidad, mientras que a las 48 y 72 horas se detectó un aumento aparente a 5 μ M y una disminución en concentraciones mayores, principalmente a 15 y 20 μ M (Figura 12c). En contraste, las nanopartículas cargadas con shRNA redujeron la viabilidad de forma dependiente del tiempo, con una disminución cercana al 50 % a las 72 horas desde 30 ng de plásmido (Figura 12d).

La combinación de nanopartículas de curcumina + shRNA incrementó aparentemente la viabilidad a las 24 horas, principalmente en la concentración de 15 μ M + 90 ng de plásmido, tanto en preadipocitos como en adipocitos diferenciados (Figura 12e, f). No obstante, a las 48 y 72 horas se observó una reducción de la viabilidad, especialmente en las concentraciones más altas (Figura 12e, f).

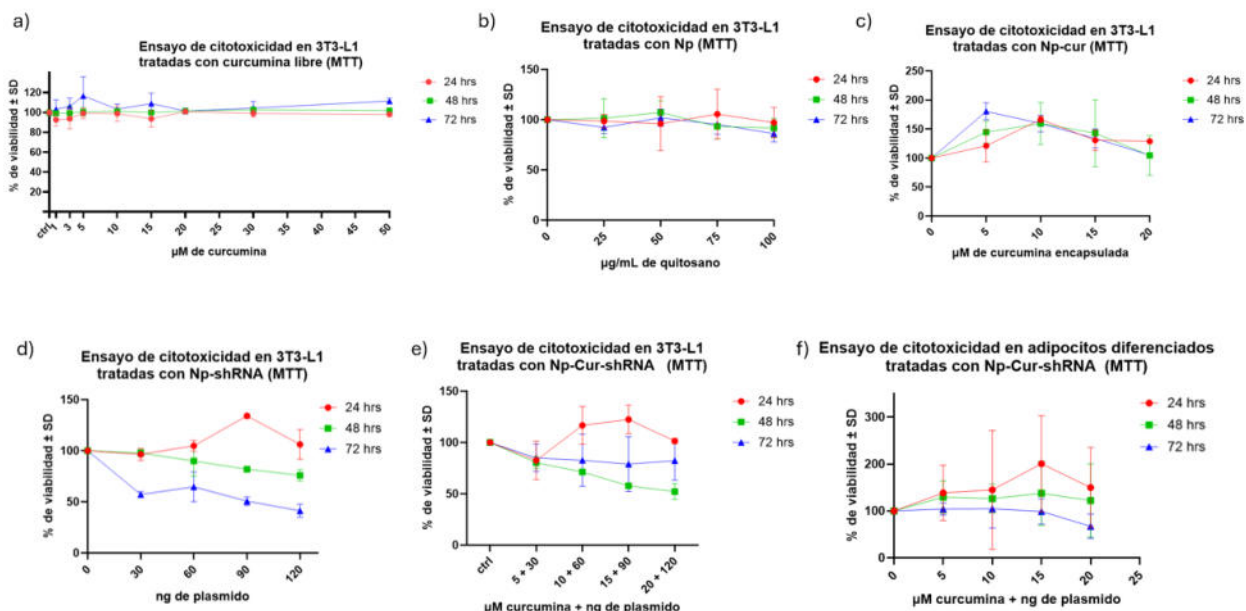


Figura 12. Efecto de los tratamientos: (a) Curcumina libre. (b) nanopartículas de quitosano, (c) nanopartículas cargadas con curcumina. (d) nanopartículas con sh-RNA-WT1, (e) nanopartículas cargadas c curcumina y sh-RNA-WT1 en la viabilidad de 3T3-L1. (f) nanopartículas cargadas de curcumina y sh-RNA-WT1 en la viabilidad de adipocitos blancos diferenciados. La viabilidad fue medida mediante el ensayo MTT. Los datos se expresan como porcentaje del valor de control (0.5 % de Metanol) de experimentos por triplicado.

7.6 Modulación de expresión de genes termogénicos y WT1

Para analizar si los tratamientos modulaban la expresión de WT1 y genes termogénicos, se realizó PCR punto final en células 3T3-L1. El tratamiento con 10 μM de curcumina libre mostró una disminución aparente del 72 % en la expresión de WT1 en comparación con el control, mientras que 20 μM no mostró una disminución evidente (Figura 13a). En estos tratamientos no se detectó expresión de UCP1 (Figura 13a).

Posteriormente, las células fueron transfectadas con diferentes concentraciones de pGSH1-GFP, y la transfección se confirmó mediante la visualización de la señal fluorescente de GFP (Figura 13b). Las concentraciones de 1 y 2 μg de plásmido mostraron una disminución aproximada del 50 % en la expresión de WT1 respecto al control, mientras que 3 μg no mostró una reducción aparente (Figura 13c). A partir de estos resultados, se seleccionaron las combinaciones de 10 μM de curcumina + 0.5 μg de pGSH1-GFP y 20 μM de curcumina + 1 μg de pGSH1-GFP para los tratamientos con Np-Cur-shRNA. Sin embargo, estas

combinaciones no indujeron una disminución de WT1, sino un aumento aparente en su expresión relativa (Figura 13d). Bajo las condiciones evaluadas, no se detectó expresión de UCP1 en ninguno de los tratamientos (Figura 13a, c, d).

A partir de estos resultados se continuó con los tratamientos en los adipocitos diferenciados.

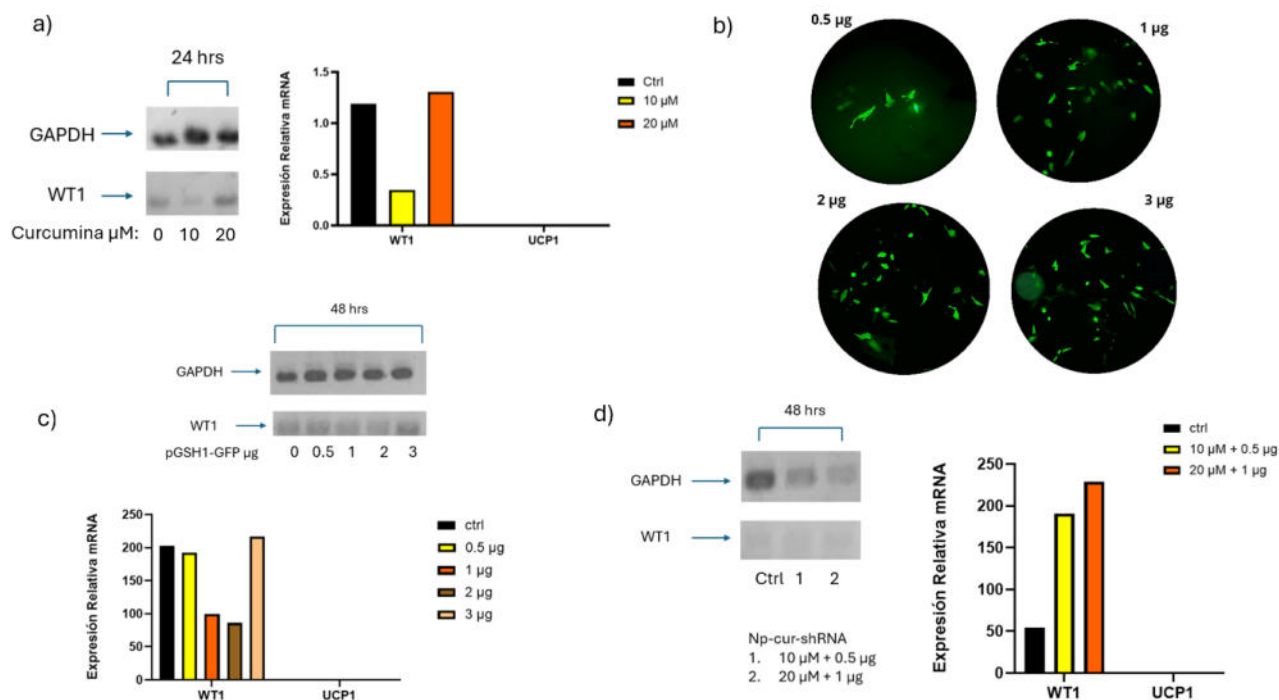


Figura 13. Expresión relativa de WT1 y UCP1 en preadipocitos. A) Expresión relativa de WT1 y UCP1 en los tratamientos de 10 y 20 μM de curcumina a las 24 horas en la línea 3T3-L1. b) Proteína GFP como control de transfección en 3T3-L1. c) Expresión relativa de WT1 y UCP1 en 3T3-L1 al ser transfectadas con 0.5, 1, 2 y 3 μg de pGSH1-GFP. d) Expresión relativa de WT1 y UCP1 en los tratamientos de 10 μM de curcumina + 0.5 μg pGSH1-GFP y 20 μM de curcumina + 1 μg de pGSH1-GFP. WT1 y UCP1 se normalizaron con GAPDH.

Los adipocitos diferenciados fueron tratados con curcumina libre a concentraciones de 10 y 20 μM posterior al proceso de diferenciación. Posteriormente, se evaluó la expresión de WT1 y UCP1 a las 12, 24 y 48 horas mediante PCR punto final. A las 12 horas, el tratamiento con 10 μM de curcumina no mostró una disminución evidente en la expresión de WT1; en contraste, el tratamiento con 20 μM mostró una reducción aproximada del 66 % en comparación con el control (Figura 14a). A las 24 horas, los tratamientos con 10 y 20 μM de curcumina mostraron un aumento aparente en la expresión de WT1 del 70 % y 45 %, respectivamente (Figura 14a). Sin embargo, a las 48 horas, la expresión de WT1 disminuyó

nuevamente, con reducciones aproximadas del 43 % y 55 % para los tratamientos con 10 y 20 μ M, respectivamente (Figura 14a).

En los adipocitos diferenciados transfectados con pGSH1-GFP, las concentraciones de 1 y 2 μ g mostraron un aumento aparente en la expresión de WT1, mientras que la concentración de 0.5 μ g no mostró cambios evidentes en comparación con el control (Figura 14b). Por otro lado, los tratamientos con nanopartículas cargadas con curcumina y shRNA-WT1 mostraron una disminución aparente en la expresión de WT1 del 51 % con la combinación de 10 μ M de curcumina + 0.5 μ g de pGSH1-GFP, y del 78 % con la combinación de 20 μ M de curcumina + 1 μ g de pGSH1-GFP-shRNA-WT1 (Figura 14c). Bajo las condiciones evaluadas, ninguno de los tratamientos indujo expresión detectable de UCP1 en adipocitos diferenciados (Figura 14a–c).

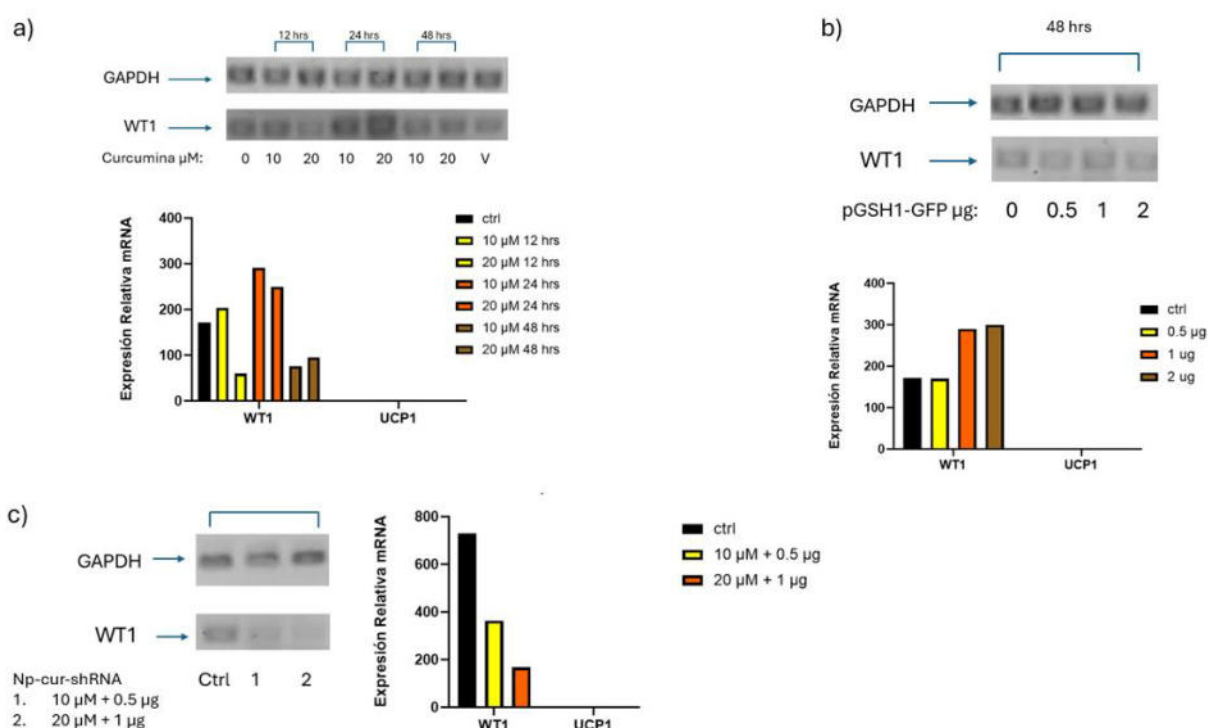


Figura 14. Expresión relativa de WT1 y UCP1 en adipocitos diferenciados. a) Adipocitos diferenciados tratados con 10 y 20 μ M de curcumina, se evaluó la expresión de WT1 y UCP1 a las 12, 24 y 48 hrs. b) Adipocitos diferenciados transfectados con pGSH1-GFP, se analizó WT1 a las 48 hrs. c) Adipocitos diferenciados tratados con las concentraciones de 10 μ M curcumina + 0.5 μ g de pGSH1-GFP y 20 μ M curcumina + 1 μ g de pGSH1-GFP. Se usó agua grado molecular como control negativo y K562 como control positivo para GAPDH y WT1. Se realizó análisis densitométrico con ImageJ.

8. DISCUSIÓN

En este proyecto de investigación se evaluó el efecto de nanopartículas de quitosano cargadas con curcumina y shRNA-WT1 sobre la viabilidad celular y la modulación de UCP1, marcador de termogénesis. Para ello, se estableció un modelo in vitro de diferenciación de células 3T3-L1, confirmado por cambios morfológicos, acumulación de gotas lipídicas y tinción positiva con Oil Red O al día 10. Esto permitió validar el modelo para comparar la respuesta de preadipocitos y adipocitos diferenciados frente a los tratamientos.

Posteriormente, se detectó la expresión de WT1 en ambos estadios, lo que sugiere que este gen puede estar presente durante el proceso adipocitario. Estudios recientes han descrito a WT1 como un marcador de tejido adiposo blanco visceral y como un posible inhibidor del programa termogénico (He et al., 2026). Lo que lo convierte en un blanco terapéutico de interés para explorar estrategias dirigidas a inducir un fenotipo adipocitario beige o marrón. Por ello, en este proyecto se buscó disminuir su expresión para favorecer la activación de genes relacionados con el pardeamiento adipocitario.

La caracterización fisicoquímica de las nanopartículas mostró tamaños entre 124 y 174 nm, potencial zeta positivo y valores de polidispersidad menores de 0.3. Estos resultados indican que las formulaciones presentaron una distribución relativamente homogénea y características compatibles con sistemas nanoparticulados de entrega celular. El aumento de tamaño observado en las nanopartículas cargadas simultáneamente con curcumina y pGSH1-GFP puede atribuirse a la incorporación de ambos componentes dentro del nanocomplejo. Asimismo, la carga positiva es consistente con la naturaleza catiónica del quitosano, lo que podría favorecer su interacción con la membrana celular, aunque también puede contribuir a efectos citotóxicos dependientes de dosis y tiempo (Danaei et al., 2018).

En los ensayos de viabilidad, la curcumina libre no disminuyó la viabilidad celular en las concentraciones evaluadas. Este resultado coincide parcialmente con lo reportado por Wu y colaboradores, quienes observaron que concentraciones bajas de curcumina no inducen muerte celular; sin embargo, a 30 y 50 μM , principalmente a las 48 y 72 horas, reportaron una disminución aproximada del 60% en la viabilidad celular (Wu et al., 2019). La ausencia

de citotoxicidad en nuestro estudio podría estar relacionada con la baja solubilidad de la curcumina libre, su limitada disponibilidad en el medio o una menor internalización celular.

En contraste, las nanopartículas cargadas con curcumina disminuyeron la viabilidad celular a concentraciones de 15 y 20 μM , principalmente a las 48 y 72 horas. Esto podría deberse a que la nanoencapsulación favorece la internalización de la curcumina y potencia su efecto biológico. No obstante, este mecanismo no fue evaluado directamente y deberá confirmarse mediante ensayos de internalización y liberación. Además, la disminución de viabilidad podría estar relacionada con procesos apoptóticos, como lo reportado por Wu et al. y Ferguson et al., quienes describieron efectos proapoptóticos de la curcumina en células 3T3-L1.

Las nanopartículas de quitosano no redujeron la viabilidad celular, lo que concuerda con lo descrito por Zoe et al., donde se reporta que el quitosano presenta buena biocompatibilidad y baja citotoxicidad en líneas celulares sanas (Zoe et al., 2023). Por ello, se infiere que el quitosano por sí solo no fue la principal causa de la muerte celular observada. Sin embargo, al combinarse con curcumina, plásmido o ambos, la respuesta celular cambió, lo que sugiere que la citotoxicidad depende de la carga molecular, la concentración, la interacción con la membrana y la acumulación intracelular del nanocomplejo.

Aunque se ha reportado que la curcumina inhibe la proliferación de preadipocitos mediante acumulación de p27 y arresto del ciclo celular en fase G1, dichos estudios utilizaron curcumina libre durante la expansión clonal mitótica de células 3T3-L1 (Ferguson, et al. 2015). En este proyecto se empleó curcumina nanoencapsulada en una formulación con quitosano y shRNA, lo que puede modificar su biodisponibilidad, liberación e interacción celular. Esto podría explicar el aumento aparente de viabilidad observado con Np-Cur. Sin embargo, este resultado debe interpretarse con prudencia, ya que el ensayo MTT mide actividad metabólica mitocondrial y no exclusivamente proliferación celular.

La disminución de viabilidad inducida por Np-shRNA y Np-Cur-shRNA a las 48 y 72 horas también podría estar relacionada con la presencia de ácido acético residual proveniente del proceso de síntesis. Debido a que no se realizó liofilización o purificación posterior a la síntesis, es posible que remanentes de ácido acético permanecieran en la suspensión final. Okabe y colaboradores demostraron que el ácido acético puede inducir muerte celular de

manera dependiente de la concentración y del tiempo. Por lo tanto, no es posible atribuir la citotoxicidad observada exclusivamente al pGSH1-GFP, a la curcumina o a su combinación sin descartar previamente este posible efecto (Okabe et al., 2014).

Respecto a la modulación de WT1, los preadipocitos tratados con 10 μ M de curcumina mostraron una disminución de su expresión. Este resultado coincide con Anuchapreeda, 2006 y Gao 2012, quienes reportaron que la curcumina puede modular negativamente WT1 mediante la regulación de miR-15 y miR-16 en modelos de cáncer. Aunque estos estudios no fueron realizados en adipocitos, sugieren que WT1 puede ser sensible a la acción reguladora de la curcumina. Sin embargo, la concentración de 20 μ M no produjo el mismo efecto, lo que indica que la respuesta no fue lineal ni estrictamente dependiente de la dosis (Anuchapreeda et al., 2006 - Gao et al., 2012).

En adipocitos diferenciados, la modulación de WT1 por curcumina también fue variable. Se observó una disminución temprana con 20 μ M a las 12 h, seguida por un aumento aparente a las 24 h y una nueva reducción a las 48 h. Esto sugiere una respuesta dinámica y dependiente del tiempo. La disminución inicial podría reflejar una respuesta temprana al tratamiento, mientras que el aumento posterior podría corresponder a un mecanismo compensatorio. Estudios como el de Çetinalp et al. han mostrado que la respuesta génica inducida por curcumina puede ser compleja y no necesariamente dosis-dependiente, con efectos variables sobre genes relacionados con adipogénesis e inflamación, como PPAR γ , IL-6, TNF- α y VEGF (Çetinalp et al., 2025).

Los preadipocitos y adipocitos fueron transfectados con pGSH1-GFP. En células 3T3-L1, las concentraciones de 1 y 2 μ g produjeron una mayor disminución de WT1 que 3 μ g, lo que sugiere una respuesta no lineal. Este fenómeno puede explicarse por la competencia por recursos celulares limitados, ya que concentraciones elevadas de plásmido pueden sobrecargar la maquinaria transcripcional y traduccional, disminuyendo la eficiencia global del sistema (Pionoro et al., 2023).

En adipocitos diferenciados, el silenciamiento de WT1 fue menos evidente, lo cual podría explicarse por la dificultad para transfectar células adipocitarias maduras. Estos adipocitos presentan mayor tamaño, abundantes gotas lipídicas y menor actividad proliferativa, características que pueden limitar la entrada, distribución y procesamiento del material

genético. Kilroy et al. observaron que, aun cuando un siRNA fluorescente era internalizado por adipocitos, no necesariamente se producía disminución de la proteína blanco. Por ello, la expresión de GFP debe interpretarse como evidencia de entrada o expresión del vector, pero no como confirmación de silenciamiento funcional (Kilroy et al., 2009).

Los resultados con nanopartículas cargadas con curcumina y shRNA sugieren que la respuesta depende del estado de diferenciación celular. Los preadipocitos no mostraron una disminución evidente de WT1 con los tratamientos combinados, mientras que los adipocitos diferenciados sí mostraron una disminución aparente bajo ciertas condiciones. Esto podría deberse a una mayor expresión basal de WT1 en adipocitos diferenciados o a diferencias en los programas transcripcionales de cada estadio. Debido a que los programas transcripcionales de los preadipocitos y adipocitos maduros son diferentes, el efecto de un sh-RNA puede variar dependiendo del momento en que se administre la terapia. Estudios recientes incluso recomiendan protocolos independientes para evaluar el silenciamiento antes y después de la diferenciación, ya que ambos modelos responden de manera distinta a la modulación génica (Strnadová et al., 2024).

Aunque no se observaron cambios en la expresión de UCP1 tras la modulación de WT1, esto no descarta su participación en el pardeamiento adipocitario. La inducción de UCP1 en adipocitos blancos o beige requiere un programa transcripcional complejo y estímulos adicionales, como activación β -adrenérgica, señalización por cAMP, exposición a frío o inductores farmacológicos. Por lo tanto, la reducción parcial o transitoria de WT1 puede no ser suficiente para inducir un fenotipo termogénico detectable en células 3T3-L1 diferenciadas.

He et al., (2026) demostraron que la regulación de WT1 sobre PRDM16 y UCP1 es compleja y que los cambios en mRNA no siempre coinciden con los niveles proteicos. Los autores propusieron que WT1 regula UBC9, una enzima involucrada en la SUMOilación y estabilidad proteica, lo que podría modificar la abundancia de PRDM16 y UCP1 independientemente de sus niveles transcripcionales. Por ello, la ausencia de cambios en UCP1 podría reflejar mecanismos postraduccionales, diferencias temporales de regulación o limitaciones del modelo experimental.

Una limitación importante de este estudio es que la expresión génica fue evaluada mediante PCR punto final y análisis densitométrico, lo cual permite una aproximación inicial, pero no tiene la sensibilidad de una RT-qPCR. Además, no se evaluó la expresión proteica de WT1, UCP1 o PRDM16, por lo que no es posible concluir si los cambios observados a nivel de transcrito se traducen en efectos funcionales. También sería necesario incluir otros marcadores de pardeamiento, como PRDM16, PGC1 α , CIDEA, TMEM26 o CPT1B, así como controles positivos de termogénesis. (Alito et al., 2022).

En conjunto, los resultados sugieren que WT1 está presente en el modelo 3T3-L1 y puede modularse parcialmente por curcumina o sistemas de silenciamiento génico, dependiendo de la concentración, el tiempo de exposición y el estado de diferenciación celular. Sin embargo, esta modulación no fue suficiente para inducir la expresión detectable de UCP1. Las nanopartículas de quitosano mostraron características adecuadas como sistema de entrega, pero su efecto funcional pudo estar limitado por citotoxicidad, liberación intracelular insuficiente, dificultad de transfección en adipocitos diferenciados o ausencia de estímulos termogénicos complementarios. Estos hallazgos posicionan al sistema Np-Cur-shRNA como una aproximación inicial prometedora, aunque aún requiere optimización antes de considerarse una estrategia efectiva para inducir la transición de adipocitos blancos hacia un fenotipo termogénico.

9. CONCLUSIONES

1. Se logró diferenciar la línea celular 3T3-L1 hacia adipocitos con características compatibles con un fenotipo adipocitario blanco, evidenciado por cambios morfológicos y acumulación de gotas lipídicas.
2. Se identificó la expresión de WT1 en preadipocitos y adipocitos diferenciados, con una mayor expresión relativa aparente posterior a la diferenciación.
3. Las nanopartículas de quitosano cargadas con curcumina, shRNA-WT1 o ambos componentes presentaron tamaño nanométrico, carga positiva y baja polidispersidad, características compatibles con sistemas de entrega celular.
4. La encapsulación de curcumina fue elevada y el material plasmídico no fue detectable en el sobrenadante, lo que sugiere una alta eficiencia de encapsulación del sistema nanoparticulado.
5. La curcumina libre y las nanopartículas de quitosano sin carga no mostraron citotoxicidad relevante; sin embargo, las formulaciones cargadas disminuyeron la viabilidad celular principalmente a las 48 y 72 horas.
6. La curcumina y el plásmido pGSH1-GFP modularon parcialmente la expresión de WT1 en preadipocitos, mientras que las nanopartículas combinadas disminuyeron WT1 en adipocitos diferenciados.
7. Bajo las condiciones evaluadas, la disminución de WT1 no fue suficiente para inducir expresión detectable de UCP1, por lo que no se confirmó la conversión hacia un fenotipo beige/marrón.
8. La hipótesis se acepta parcialmente, ya que se observó modulación de WT1 en condiciones específicas; sin embargo, no se demostró activación del programa termogénico.
9. Este trabajo establece una base experimental para optimizar nanopartículas de quitosano como plataforma de entrega de curcumina y shRNA-WT1 en adipocitos diferenciados.

10.PERSPECTIVAS

1. Caracterizar isoformas de *WT1* en 3T3-L1 y adipocitos diferenciados.
2. Caracterización más robusta de Np-cur-shRNA.
3. Control de citotoxicidad de ácido acético.
4. Aumentar el tiempo de tratamiento para 3T3-L1 y adipocitos diferenciados.
5. Analizar expresión de *PRDM16*, *CIDEA*, *PPAR γ* y *PGC-1 α* a nivel transcrito y proteico.

11.BIBLIOGRAFÍA

Rubino, F., Cummings, D. E., Eckel, R. H., Cohen, R. V., Wilding, J. P. H., Brown, W. A., Stanford, F. C., Batterham, R. L., Farooqi, I. S., Farpour-Lambert, N. J., le Roux, C. W., Sattar, N., Baur, L. A., Morrison, K. M., Misra, A., Kadowaki, T., Tham, K. W., Sumithran, P., Garvey, W. T., Kirwan, J. P., ... Mingrone, G. (2025). Definition and diagnostic criteria of clinical obesity. *The lancet. Diabetes & endocrinology*, 13(3), 221–262. [https://doi.org/10.1016/S2213-8587\(24\)00316-4](https://doi.org/10.1016/S2213-8587(24)00316-4)

Kaufer-Horwitz, Martha, & Pérez Hernández, Juan Fernando. (2022). La obesidad: aspectos fisiopatológicos y clínicos. *Inter disciplina*, 10(26), 147-175. <https://doi.org/10.22201/ceiach.24485705e.2022.26.80973>

National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases. (2025). *Definition & facts for obesity*. U.S. Department of Health and Human Services. <https://www.niddk.nih.gov/>

World Health Organization. (2025, December 8). *Obesity and overweight*. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>

Gater, David & Farkas, Gary & Tiozzo, Eduard. (2021). Pathophysiology of Neurogenic Obesity After Spinal Cord Injury. *Topics in Spinal Cord Injury Rehabilitation*. 27. 1-10. 10.46292/sci20-00067. Patogologa de la obesidad

Nguyen, T., Duane, T. M., & Sharma, S. (2025). *Obesity and comorbid conditions*. In *StatPearls*. StatPearls Publishing. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK574535/>

Ziqubu, Khanyisani & Dlodla, Phiwayinkosi & Mabhida, Sihle & Jack, Babalwa & Keipert, Susanne & Jastroch, Martin & Mazibuko-Mbeje, Sithandiwe. (2023). Brown adipose tissue-derived metabolites and their role in regulating metabolism. *Metabolism*. 150. 155709. 10.1016/j.metabol.2023.155709. ,

Kuryłowicz, A., & Puzianowska-Kuźnicka, M. (2020). Induction of Adipose Tissue Browning as a Strategy to Combat Obesity. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(17), 6241. <https://doi.org/10.3390/ijms21176241>

Zapata-Benavides, P., Manilla-Muñoz, E., Zamora-Avila, D. E., Saavedra-Alonso, S., Franco-Molina, M. A., Trejo-Avila, L. M., Davalos-Aranda, G., & Rodríguez-Padilla, C. (2012). WT1 silencing by RNAi synergizes with chemotherapeutic agents and induces chemosensitization to

doxorubicin and cisplatin in B16F10 murine melanoma cells. *Oncology letters*, 3(4), 751–755.
<https://doi.org/10.3892/ol.2012.578>

Zamora-Avila, D., Zapata-Benavides, P., Franco-Molina, M. *et al.* WT1 gene silencing by aerosol delivery of PEI-RNAi complexes inhibits B16-F10 lung metastases growth. *Cancer Gene Ther* **16**, 892–899 (2009). <https://doi.org/10.1038/cgt.2009.35>

l Hussain, Turki & Ali, Afshan & Akhtar, Mohammed. (2014). Wilms Tumor: An Update. *Advances in anatomic pathology*. 21. 166-73. 10.1097/PAP.0000000000000017.

Kirschner, K. M., Foryst-Ludwig, A., Gohlke, S., Li, C., Flores, R. E., Kintscher, U., Schupp, M., Schulz, T. J., & Scholz, H. (2022). Wt1 haploinsufficiency induces browning of epididymal fat and alleviates metabolic dysfunction in mice on high-fat diet. *Diabetologia*, 65(3), 528–540.
<https://doi.org/10.1007/s00125-021-05621-1>

Kirschner, K. M., & Scholz, H. (2022). WT1 in Adipose Tissue: From Development to Adult Physiology. *Frontiers in cell and developmental biology*, 10, 854120.
<https://doi.org/10.3389/fcell.2022.854120>

Gao, Sm., Yang, Jj., Chen, Cq. *et al.* Pure curcumin decreases the expression of WT1 by upregulation of miR-15a and miR-16-1 in leukemic cells. *J Exp Clin Cancer Res* **31**, 27 (2012).
<https://doi.org/10.1186/1756-9966-31-27>

Wang, D., & Farhana, A. (2023). *Biochemistry, RNA structure*. En *StatPearls*. StatPearls Publishing. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK558999/>

Ritika, Rani, S., Malviya, R., Rajput, S., Belagodu Sridhar, S., & Kaushik, D. (2025). *Understanding the prospective of gene therapy for the treatment of breast cancer / Comprensión de las perspectivas de la terapia génica para el tratamiento del cáncer de mama*.
<https://doi.org/10.1016/j.senol.2025.100683>

Sheikh-Hosseini, M., Moarefzadeh, M., Alsaedi, AA *et al.* Estrategias innovadoras de terapia génica para abordar la obesidad. *Egypt J Med Hum Genet* **26**, 58 (2025).
<https://doi.org/10.1186/s43042-025-00686-8>

Kasprzak-Drozd, K., Oniszczyk, T., Gancarz, M., Kondracka, A., Rusinek, R., & Oniszczyk, A. (2022). Curcumin and Weight Loss: Does It Work?. *International journal of molecular sciences*, 23(2), 639. <https://doi.org/10.3390/ijms23020639>

Anuchapreeda, S., Thanarattanakorn, P., Sittipreechacharn, S., Chanarat, P., & Limtrakul, P. (2006). Curcumin inhibits WT1 gene expression in human leukemic K562 cells. *Acta pharmacologica Sinica*, 27(3), 360–366. <https://doi.org/10.1111/j.1745-7254.2006.00291.x>

Jarhahzadeh, M., Alavinejad, P., Farsi, F. et al. El efecto de la cúrcuma en el perfil lipídico, el malondialdehído, la ecogenicidad hepática y las enzimas entre pacientes con enfermedad del hígado graso no alcohólico: un ensayo clínico aleatorizado doble ciego. *Diabetol Metab Syndr* 13 , 112 (2021). <https://doi.org/10.1186/s13098-021-00731-7>

Shao W, Yu Z, Chiang Y, Yang Y, Chai T, Foltz W, Lu H, Fantus IG, Jin T. Curcumin prevents high fat diet induced insulin resistance and obesity via attenuating lipogenesis in liver and inflammatory pathway in adipocytes. *PLoS One*. 2012;7(1):e28784. doi: 10.1371/journal.pone.0028784. Epub 2012 Jan 9. PMID: 22253696; PMCID: PMC3253779.

Peng, Y., Ao, M., Dong, B., Jiang, Y., Yu, L., Chen, Z., Hu, C., & Xu, R. (2021). Anti-Inflammatory Effects of Curcumin in the Inflammatory Diseases: Status, Limitations and Countermeasures. *Drug design, development and therapy*, 15, 4503–4525.

Bradford PG. Curcumin and obesity. *Biofactors*. 2013 Jan-Feb;39(1):78-87. doi: 10.1002/biof.1074. Epub 2013 Jan 22. PMID: 23339049

Shao W, Yu Z, Chiang Y, Yang Y, Chai T, Foltz W, Lu H, Fantus IG, Jin T. Curcumin prevents high fat diet induced insulin resistance and obesity via attenuating lipogenesis in liver and inflammatory pathway in adipocytes. *PLoS One*. 2012;7(1):e28784. doi: 10.1371/journal.pone.0028784. Epub 2012 Jan 9. PMID: 22253696; PMCID: PMC3253779.

Chen, Y., Wu, R., Chen, W., Liu, Y., Liao, X., Zeng, B., Guo, G., Lou, F., Xiang, Y., Wang, Y., & Wang, X. (2021). Curcumin prevents obesity by targeting TRAF4-induced ubiquitylation in m⁶ A-dependent manner. *EMBO reports*, 22(5), e52146. <https://doi.org/10.15252/embr.202052146> of *Molecular Sciences*, 23(2), 639. <https://doi.org/10.3390/ijms23020639>

Jhaveri, J., Raichura, Z., Khan, T., Momin, M., & Omri, A. (2021). Chitosan Nanoparticles-Insight into Properties, Functionalization and Applications in Drug Delivery and Theranostics. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 26(2), 272. <https://doi.org/10.3390/molecules26020272>

Shahcheraghi, N., Golchin, H., Sadri, Z., Tabari, Y., Borhanifar, F., & Makani, S. (2022). Nano-biotechnology, an applicable approach for sustainable future. *3 Biotech*, 12(3), 65. <https://doi.org/10.1007/s13205-021-03108-9>

- Jaferník, K., Ładniak, A., Blicharska, E., Czarnek, K., Ekiert, H., Wiącek, A. E., & Szopa, A. (2023). Chitosan-Based Nanoparticles as Effective Drug Delivery Systems-A review. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 28(4), 1963. <https://doi.org/10.3390/molecules28041963>
- Danaei, M., Dehghankhold, M., Ataei, S., Hasanzadeh Davarani, F., Javanmard, R., Dokhani, A., Khorasani, S., & Mozafari, M. R. (2018). Impact of Particle Size and Polydispersity Index on the Clinical Applications of Lipidic Nanocarrier Systems. *Pharmaceutics*, 10(2), 57. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics10020057>
- Wu, L. Y., Chen, C. W., Chen, L. K., Chou, H. Y., Chang, C. L., & Juan, C. C. (2019). Curcumin Attenuates Adipogenesis by Inducing Preadipocyte Apoptosis and Inhibiting Adipocyte Differentiation. *Nutrients*, 11(10), 2307. <https://doi.org/10.3390/nu11102307>
- Zoe, L. H., David, S. R., & Rajabalaya, R. (2023). Chitosan nanoparticle toxicity: A comprehensive literature review of *in vivo* and *in vitro* assessments for medical applications. *Toxicology reports*, 11, 83–106. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2023.06.012>
- Okabe, S., Okamoto, T., Zhao, C. M., Chen, D., & Matsui, H. (2014). Acetic acid induces cell death: an *in vitro* study using normal rat gastric mucosal cell line and rat and human gastric cancer and mesothelioma cell lines. *Journal of gastroenterology and hepatology*, 29 Suppl 4, 65–69. <https://doi.org/10.1111/jgh.12775>
- He, LF, Liao, ZM, Chen, JL y Yang, ZC (2026). Wt1 facilita la formación de grasa beige visceral para combatir la obesidad abdominal. *Adipocyte*, 15 (1). <https://doi.org/10.1080/21623945.2026.2658408>
- Ejaz, A., Wu, D., Kwan, P., & Meydani, M. (2009). Curcumin inhibits adipogenesis in 3T3-L1 adipocytes and angiogenesis and obesity in C57/BL mice. *The Journal of nutrition*, 139(5), 919–925. <https://doi.org/10.3945/jn.108.100966>
- Çetinalp, P., Değirmencioglu, S., Tanrikulu Küçük, S., Seyithanoğlu, M., Öner İyidoğan, Y., & Koçak, H. (2025). Association of different doses of curcumin with preadipocyte to adipocyte differentiation. *Medical Journal of Bakirkoy*, 21, 112–120. <https://doi.org/10.4274/BMJ.galenos.2024.2024.5-13>
- Piorino, F., Patterson, A. T., Han, Y., & Styczynski, M. P. (2023). Plasmid Crosstalk in Cell-Free Expression Systems. *ACS synthetic biology*, 12(10), 2843–2856. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.3c00412>

Kilroy, G., Burk, D. H., & Floyd, Z. E. (2009). *High efficiency lipid-based siRNA transfection of adipocytes in suspension*. PLoS ONE, 4(9), e6940. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006940>

Strnadová, M., Thor, D., & Kaczmarek, I. (2024). Protocol for changing gene expression in 3T3-L1 (pre)adipocytes using siRNA-mediated knockdown. *STAR protocols*, 5(2), 103075. <https://doi.org/10.1016/j.xpro.2024.103075>

Alito, A., Quartarone, A., Leonardi, G., Tisano, A., Bruschetta, A., Cucinotta, F., Milardi, D., & Portaro, S. (2022). Brown adipose tissue human biomarkers: Which one fits best? A narrative review. *Medicine*, 101(48), e32181. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000032181>

12.RESUMEN BIBLIOGRÁFICO

Paola Antonieta Zapata Lara

Candidata para el grado de Maestra en Ciencias en Orientación en Inmunobiología

Tesis:	“Efecto de la modulación de WT1 mediante nanopartículas de quitosano RNAi-WT1/curcumina sobre la inducción de un fenotipo termogénico en adipocitos 3T3-L1 diferenciados <i>in vitro</i> ”.
Campo de estudio	Ciencias de la salud.
Datos personales	Nacida en Monterrey, Nuevo León el 27 de junio del 2001. Hija de Pablo Zapata Benavides y Ma. Antonieta Lara Rodríguez.
Educación:	Egresada de la Universidad Autónoma de Nuevo León. Grado obtenido de Licenciada en Biotecnología Genómica en 2024.
Experiencia profesional:	Formé parte del laboratorio Unidad de Biología Molecular del Cáncer. Impartí clases teórico/prácticas sobre cultivo celular y métodos moleculares de la materia Virología Molecular.