
**Implicación de los campos
magnéticos débiles en
la etiología de la lipoatrofia
semicircular que se da en entornos
laborales informatizados:
estudio controlado *in vitro***

**Alejandro Úbeda Maeso
y cols.**

Ayudas a la investigación 2009

Investigador Principal

Alejandro Úbeda Maeso
Doctor en Ciencias

Equipo Investigador

Carlos Luis Paíno Belarrinaga
Doctor en Ciencias

María Antonia Cid Torres
Doctora en Ciencias

María Antonia Martínez Pascual
Doctora en Ciencias

María Ángeles Trillo Ruiz
Doctora en Ciencias

Índice

	Página
RESUMEN	4
1. INTRODUCCIÓN	4
2. OBJETIVO	6
3. METODOLOGÍA	6
3.1. Modelo biológico	6
3.2. Protocolo de exposición al campo magnético	8
3.3. Procedimientos analíticos	9
3.3.1. Análisis del contenido en ácidos grasos: tinción con Oil Red O	9
3.3.2. Análisis morfométrico	9
3.3.3. Ensayos de Inmunofluorescencia para PPAR γ y ERK1/2	9
3.3.4. Determinación de la expresión de PPAR γ y ERK1/2 mediante Western blot	9
3.4. Análisis estadístico	10
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	10
4.1. Influencia del campo magnético sobre la lipogénesis. Análisis del contenido en ácidos grasos	10
4.2. Estudio del efecto del campo magnético sobre la morfología de las células. Estudio morfométrico	11
4.3. Expresión del factor de diferenciación adipocítica PPAR γ en respuesta al medio diferenciador, en ausencia de CM. Estudio por Western blot	12
4.4. Influencia del CM sobre la expresión del factor de diferenciación adipocítica PPAR γ . Estudio por Western blot	12
4.5. Influencia del medio de diferenciación y efecto del CM sobre la activación de ERK1/2 (p-ERK1/2). Análisis por Western blot	13
4.6. Influencia del CM sobre la expresión de PPAR γ y ERK1/2 tras 42 horas de exposición al CM. Estudio Inmunoquímico	14
5. CONCLUSIONES	15
6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	16

RESUMEN

La lipoatrofia semicircular (LS) se describe como una lesión idiopática, caracterizada por una depresión semicircular que aparece preferentemente en la parte anterior o anterolateral de uno o ambos muslos. Tal depresión se debe a una atrofia localizada del tejido adiposo subcutáneo, que no afecta a la piel o al tejido muscular. Los factores causales de esta patología son todavía desconocidos, aunque se han propuesto distintas hipótesis. Los campos electromagnéticos generados por equipos informáticos y el equipamiento eléctrico situados en mesas de despachos y oficinas han sido propuestos como uno de los posibles factores implicados en el desarrollo de la LS.

Para comprobar dicha hipótesis hemos estudiado el efecto de campos magnéticos (CM) débiles, de frecuencia industrial, sobre el proceso de lipogénesis en células mesenquimales cultivadas. Estas células, aisladas de la fracción vásculo-estromal de tejido adiposo humano y comúnmente conocidas como "células madre derivadas de tejido adiposo" (*Adipose-tissue Derived Stem Cells*, ADSC), son capaces de diferenciarse en cultivo hasta alcanzar el estadio de adipocitos maduros. Las células ADSC fueron obtenidas, por procedimiento quirúrgico y bajo consentimiento informado, de un donante varón, sano, de 69 años, no obeso.

Nuestros estudios han proporcionado por primera vez indicios, basados en evidencia experimental en células humanas, de que la exposición a CM débiles, de frecuencia industrial, podría actuar como cofactor en el desarrollo de la LS, mediante un retraso o bloqueo parcial de procesos implicados en acumulación de grasa en las células adiposas. Así, el análisis de incorporación del colorante específico de ácidos grasos Oil Red O, cuantificado por dos técnicas complementarias (espectrofotometría y análisis de imagen fotomicrográfica), ha mostrado que la exposición intermitente a un campo magnético sinusoidal de 50 Hz y 100 μ T provoca un descenso significativo en la cantidad de ácidos grasos sintetizados por las ADSC tratadas en fases tempranas de su diferenciación adipocítica. Estos datos han sido complementados y reforzados mediante un estudio morfométrico. Los resultados de ese estudio indican que, además de afectar a la síntesis de ácidos grasos, el estímulo electromagnético puede influir significativamente en la diferenciación de las células adipocíticas. De aquí se deriva la necesidad de ampliar el estudio, investigando los procesos moleculares implicados en la regulación de la diferenciación adipocítica en presencia de un CM débil.

Así, la diferenciación adipocítica es el resultado de cambios transcripcionales que conducen a la activación de diversos genes. El proceso de formación del adipocito maduro está regulado por diferentes factores de transcripción. Así, la diferenciación es iniciada a través de los factores *CCAAT/Enhancer Binding Proteins- α* y β (*C/EBP α* y *C/EBP β* , respectivamente), que activan la expresión del *Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ* (*PPAR γ*).

Este receptor regula la expresión de genes específicos de adipogénesis y es crítico para la formación de células adiposas, capaces de acumular lípidos, a partir de células madre pluripotenciales (Vernochet y col., 2002). Una potencial alteración en la regulación de la expresión de *PPAR γ* , mediada por exposición a CM, conduciría a un posible retraso o inhibición de la diferenciación adipocítica. En el presente estudio hemos analizado la expresión del *PPAR γ* en ADSC sometidas a CM durante el proceso de diferenciación adipocítica. Los resultados han mostrado que, si bien exposiciones al CM durante 18 h no provocan cambios significativos en la expresión de *PPAR γ* , una exposición intermitente durante 42 horas es capaz de provocar un descenso en la expresión de dicho factor. Este resultado sería coherente con un efecto de bloqueo parcial de la adipogénesis. Estudios experimentales de otros autores han revelado que la regulación de la adipogénesis por *MAPK-ERK1/2* puede ser positiva o negativa, dependiendo del tiempo de activación (Tang y col., 2003). Además, se ha descrito que la inhibición de la diferenciación adipocítica inducida por la activación de *ERK1/2* estaría mediada por el factor *PPAR γ* (Tanabe y col., 2004). Estudios previos de nuestro grupo han mostrado que dicha quinasa, *ERK1/2*, es sensible a la acción de un CM de 50 Hz y 100 μ T en células de neuroblastoma humano (Martínez y col., 2006). Este bloque de evidencia constituye la base de nuestros estudios dedicados al análisis de la potencial implicación de *ERK1/2* en la respuesta de células ADSC al CM. Los resultados han mostrado que el campo provoca un incremento en la activación de la *MAPK ERK1/2*. Este efecto, potencialmente relacionado con el descenso significativo observado en la expresión de *PPAR γ* , conduciría a la inhibición de la diferenciación adipocítica inducida por el CM, también observada en el presente estudio.

En su conjunto, los resultados obtenidos respaldan la hipótesis de que la exposición a campos débiles de frecuencia industrial, presentes en determinados ambientes ocupacionales, podría actuar como cofactor en la etiología de la lipoatrofia semicircular, afectando a procesos moleculares responsables de la diferenciación temprana de los adipocitos.

1. INTRODUCCIÓN

Las lipodistrofias constituyen un grupo heterogéneo de enfermedades que afectan al tejido adiposo y se caracterizan por la pérdida de grasa corporal, que puede ser generalizada o parcial. Entre las lipodistrofias de tipo parcial se encuentra la alteración del tejido adiposo denominada lipoatrofia semicircular (LS), que se describe como una lesión idiopática caracterizada por una depresión semicircular que aparece preferentemente en la parte anterior o anterolateral de los muslos (Figura 1). Tal depresión se debe a una atrofia localizada del tejido adiposo subcutáneo, que no afecta a la piel o al tejido muscular (Maes y col., 2003). En la mayoría de los casos la depre-

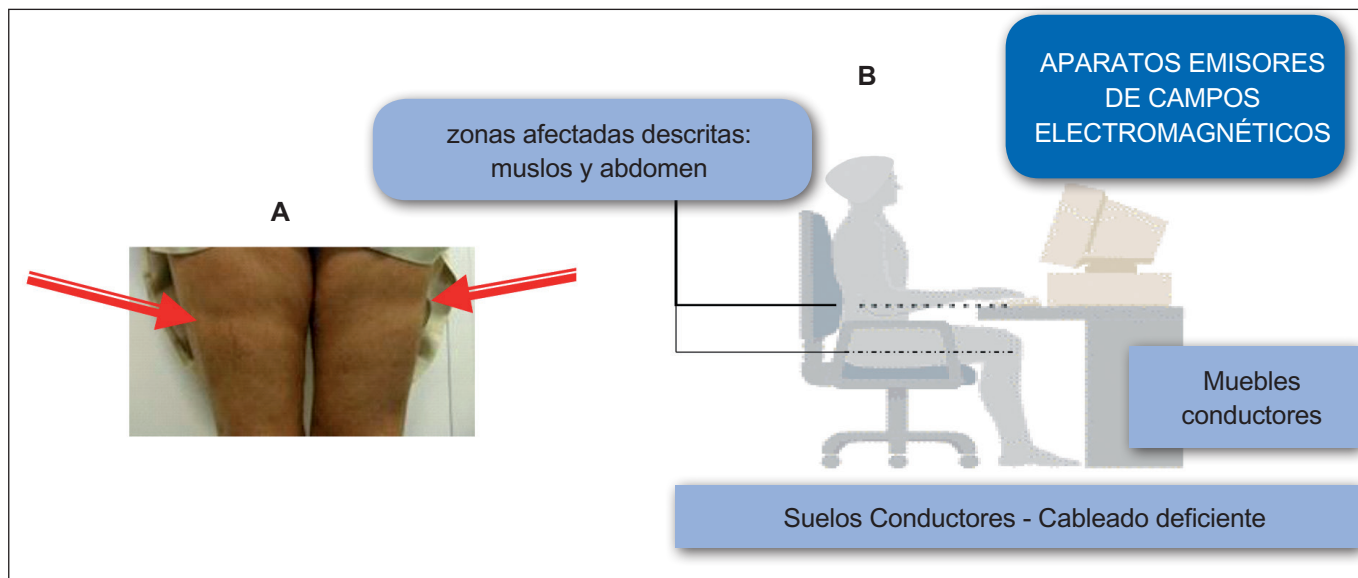


Figura 1. A) Lipoatrofia semicircular. Patología caracterizada por la pérdida localizada de grasa corporal. B) Ejemplo de entorno de riesgo.

sión es bilateral, simétrica y asintomática. No obstante, también se han descrito casos de lesiones unilaterales (Mallet y col., 1981; Betti y col., 1992; Bordel Gómez, 2006) múltiples y/o con síntomas asociados, como calambres, sensación de pesadez, calor y dolor (De Groot, 1994).

Los primeros casos de lipoatrofia semicircular fueron descritos por Gschwandtner y col. en 1974. Desde entonces la LS ha sido más frecuentemente diagnosticada en mujeres que en hombres. Este desequilibrio en la distribución por sexos se ha atribuido, aunque sin el respaldo de la evidencia, a posibles diferencias sexuales en el volumen del tejido graso subcutáneo, en la preocupación estética (Gruber y Fuller, 2001) o en la estructura del tejido graso (Maes y col., 2003). En los últimos 10 años se ha diagnosticado de LS a centenares de personas, principalmente mujeres del personal administrativo de diversas compañías, en Japón, Bélgica, Holanda, Francia, Reino Unido, Alemania, Italia y España.

Los factores causales de la lipoatrofia semicircular no están bien determinados, si bien se han propuesto distintas hipótesis. Los microtraumatismos provocados por presión repetida representan el factor más evidente y más frecuentemente implicado. Estos microtraumatismos provendrían de la fricción repetida contra los bordes de las mesas de trabajo (De Groot, 1994; Gruber y Fuller, 2001; Gómez-Espejo y col., 2005), de la presión ejercida por la superficie de asiento de las sillas de trabajo (Hermans y col., 1999) o del uso de ropa ajustada (Mascaro y Ferrando, 1983; Herane y col., 2007; Zafra-Cobo y col., 2008). Sin embargo, parece obvio que la fricción es un factor necesario, pero no suficiente. Así, entre otras hipótesis basadas en la evidencia observacional, se ha planteado que los campos magnéticos (CM) de baja frecuencia generados por los equipos informáticos y por otro

aparataje eléctrico podrían actuar como cofactores involucrados en el desarrollo de esta patología (Sanz y col., 2009).

Alteraciones en los procesos de diferenciación adipogénica podrían ser desencadenantes de este tipo de patologías lipodistróficas. En efecto, la adipogénesis es el proceso diferenciador que conduce desde un estadio celular precursor (pre-adipocito) hasta el adipocito maduro, en el que la mayor parte del volumen celular es ocupado por una gota lipídica. Estudios con modelos *in vitro* han revelado un patrón preciso de expresión genética (inducción e inhibición) que conduce a la expresión de un determinado conjunto de genes en el adipocito maduro, siguiendo una secuencia cronológica específica (Rosen y col., 2000). De forma que se van expresando aquellos genes característicos de los adipocitos, al mismo tiempo que se van reprimiendo genes que son inhibidores o innecesarios para completar la adipogénesis. Alteraciones en este patrón provocarían alteraciones en la adipogénesis que podrían conducir a un fenotipo lipodistrófico.

A nivel transcripcional, los profundos cambios morfológicos asociados a la maduración del preadipocito son estrechamente controlados por distintos factores de transcripción. Uno de estos factores implicados en la diferenciación adipocítica es el receptor de proliferación de los peroxisomas γ (PPAR γ), que pertenece a la subfamilia de receptores nucleares de hormonas. Y, de hecho, varios tipos de lipodistrofias han sido relacionadas con una merma o deficiencia en la actividad del factor PPAR γ (Guallar y col., 2008; Chehab, 2008). Bajo estas premisas, cabe proponer que una potencial alteración en la regulación de la expresión de PPAR γ , mediada por exposición a CM, podría conducir a un retraso o inhibición de la diferenciación adipocítica. Esta hipótesis se vería apoyada por datos recientes que indican que CM sinusoidales de

15 Hz y 1 mT pueden ejercer un efecto inhibitorio de la adipogénesis en células mesenquimales de médula ósea (mesenchymal stem cells, MSC), promoviendo su diferenciación osteogénica (Yang y col., 2010). Este efecto era mediado por la acción del CM sobre el factor PPAR γ . Sobre esta base se apoya nuestro propósito de analizar la potencial capacidad de un CM débil de frecuencia industrial (100 μ T, 50 Hz) para inducir alteraciones en la expresión del citado factor PPAR γ .

Por otra parte, se ha descrito que la proteína quinasa regulada extracelularmente ERK1/2 media en los procesos que conducen a la diferenciación del adipocito, y se ha propuesto que es su acción sobre el factor PPAR γ la que otorga a la MAPK-ERK1/2 su capacidad inhibitoria de la diferenciación adipocítica (Tanabe y col., 2004). No obstante, existen datos contradictorios sobre la función de MAPK-ERK1/2 en la diferenciación de adipocitos. De manera que, mientras algunos trabajos han descrito que la activación rápida y transitoria de ERK1/2 es un requisito necesario para la expansión proliferativa o la diferenciación de adipocitos, otros estudios han encontrado una inhibición de la diferenciación mediante la activación de ERK. Esta aparente contradicción puede deberse a la existencia de un estrecho control cronológico de la activación de ERK. Y así, bajo determinadas condiciones y en períodos específicos, la actividad de ERK puede resultar necesaria para la diferenciación adipocítica, mientras que en otros puede inhibir dicha diferenciación de los adipocitos. Estudios previos de nuestro grupo han mostrado que en células humanas NB69 la quinasa ERK1/2 responde a la acción de un CM de 50 Hz y 100 μ T (Martínez y col., 2006). A partir de ahí, el presente estudio investiga la posibilidad de que un campo magnético sinusoidal de 50 Hz pueda provocar una inhibición parcial de los procesos de diferenciación adipocítica en células ADSC. Dicho efecto podría ejercerse a través de una alteración del receptor de proliferación de los peroxisomas γ (PPAR γ) y/o de la activación de la quinasa ERK1/2, ya que ambos factores son reguladores de la diferenciación adipocítica. Este resultado respaldaría la potencial implicación de los campos magnéticos como factor implicado en el origen o desarrollo de la lipoatrofia semicircular.

2. OBJETIVO

En definitiva, el presente estudio se basa en la hipótesis de que la exposición a campos magnéticos (CM) de frecuencia industrial (50 - 60 Hz o sus armónicos) presentes en ambientes ocupacionales, pudiera estar implicada, directa o indirectamente, en la etiología de la lipoatrofia semicircular. Para ello se ha aplicado un campo con una densidad de flujo magnético $B=100 \mu$ T, valor equivalente al 20% del nivel de referencia de 500 μ T, establecido por las regulaciones internacionales como inocuo en el caso de exposiciones ocupacionales (ICNIRP, 1998; CE, 2004).

La citada hipótesis viene respaldada por estudios preliminares de nuestro grupo (Proyecto LipoSearch), que proporcionaron indicios de que la exposición a campos magnéticos débiles de 50 Hz podría provocar alteraciones en los procesos tempranos de diferenciación adipocítica en ADSC procedentes de muestras humanas de un donante. Sin embargo, el mismo estímulo magnético no parecía afectar de forma significativa al proceso de lipólisis en ADSC, que conduce a la movilización de ácidos grasos.

El objetivo del trabajo propuesto es ensayar la hipótesis descrita, determinando si uno o varios procesos celulares implicados en la adipogénesis/lipogénesis, podrían verse alterados por la presencia de campos magnéticos débiles de 50 Hz.

3. METODOLOGÍA

3.1. Modelo biológico

El modelo biológico elegido para el estudio de la potencial acción de CM consistió en cultivos de células madre mesenquimales procedentes de la fracción vásculo-estromal de tejido adiposo (adipose-tissue derived stem cells, ADSC) de donantes adultos sanos (Zuk y col., 2002). Dichas células son sometidas a una diferenciación in vitro mediante fórmula específica. El estudio de este tipo de células en sus diferentes fases de diferenciación permite investigar los procesos de síntesis y almacenamiento (adipogénesis o lipogénesis) y de degradación de los ácidos grasos (lipólisis).

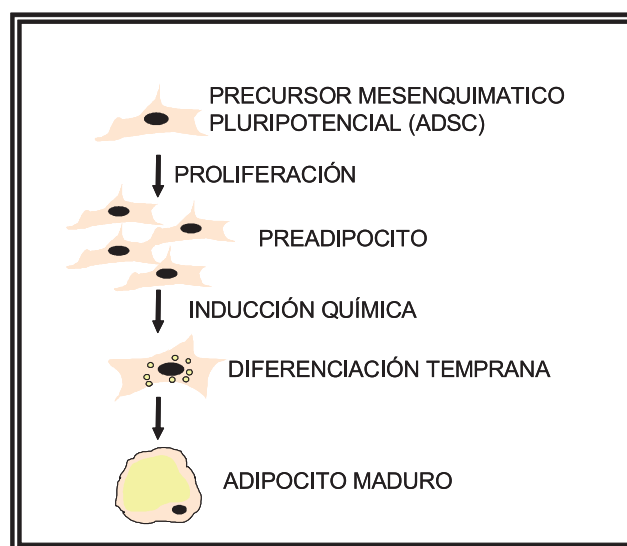


Figura 2. Sistema biológico- Se utilizaron células ADSC para analizar las fases de diferenciación adipocítica temprana en presencia o ausencia de CM.

Mediante procedimiento quirúrgico se obtuvieron muestras de panículo adiposo abdominal de un donante

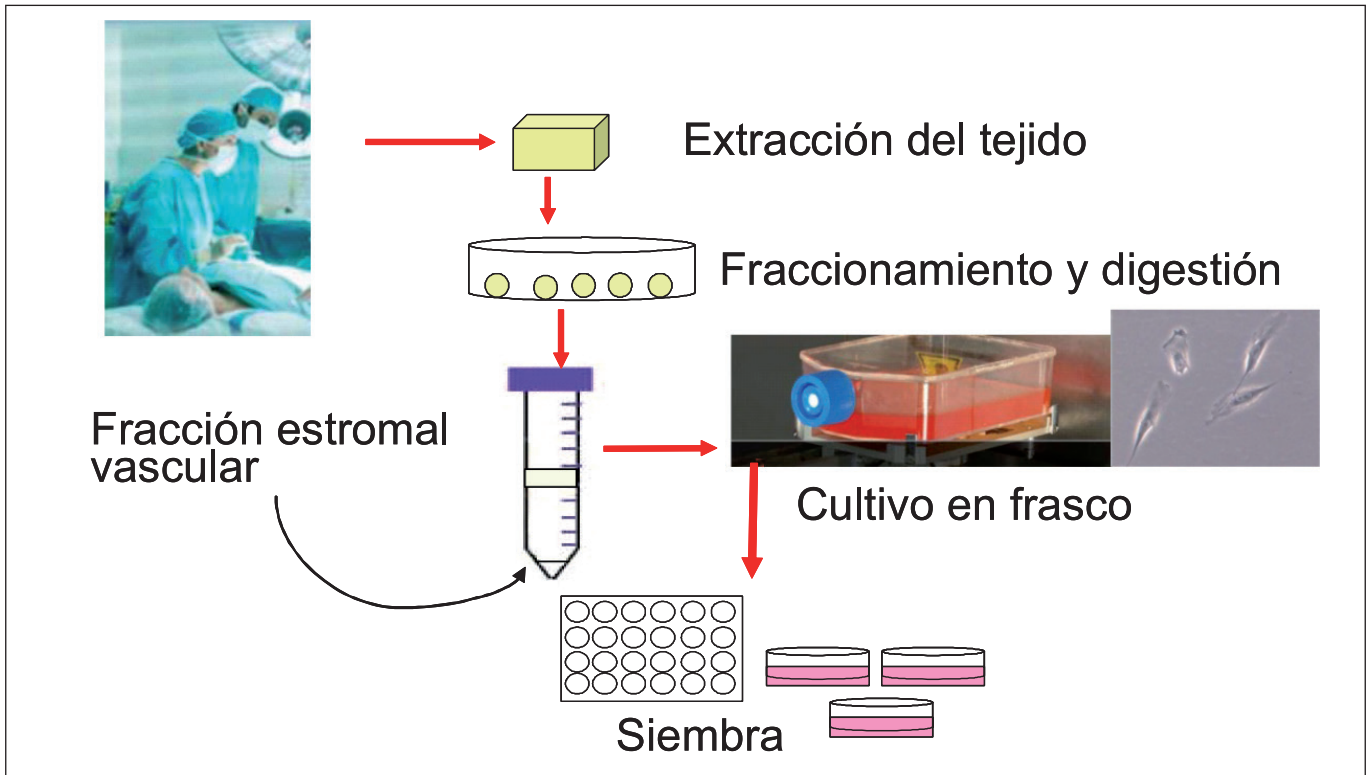


Figura 3. Obtención y mantenimiento de cultivos de células ADSC.

varón sano de 69 años, no obeso (72 Kg). Los protocolos quirúrgicos, experimentales y de obtención del consentimiento informado fueron aprobados por el Comité Ético del Hospital Ramón y Cajal, y se ajustan a las normativas españolas y europeas en vigor. Las células obtenidas tras digestión con collagenasa y posterior aislamiento de la fracción vásculo-estromal fueron sembradas en frascos de cultivo y crecidas en un medio específico (MesenPro, Invitrogen), dentro de incubadores con una atmósfera

controlada a 37° C y 5% CO₂. Dependiendo de la finalidad de los experimentos, en cada réplica experimental las células fueron sembradas en placas de 24 pocillos, sobre cubreobjetos de cristal de 12 mm de diámetro, a una densidad de 2000 células por cubreobjeto, o bien en placas Petri de 60 mm de diámetro a una densidad de 50000 células por placa (Figura 3). Durante los 5 primeros días de cultivo las células fueron mantenidas en el medio de crecimiento (Figura 4). A continuación, el medio de

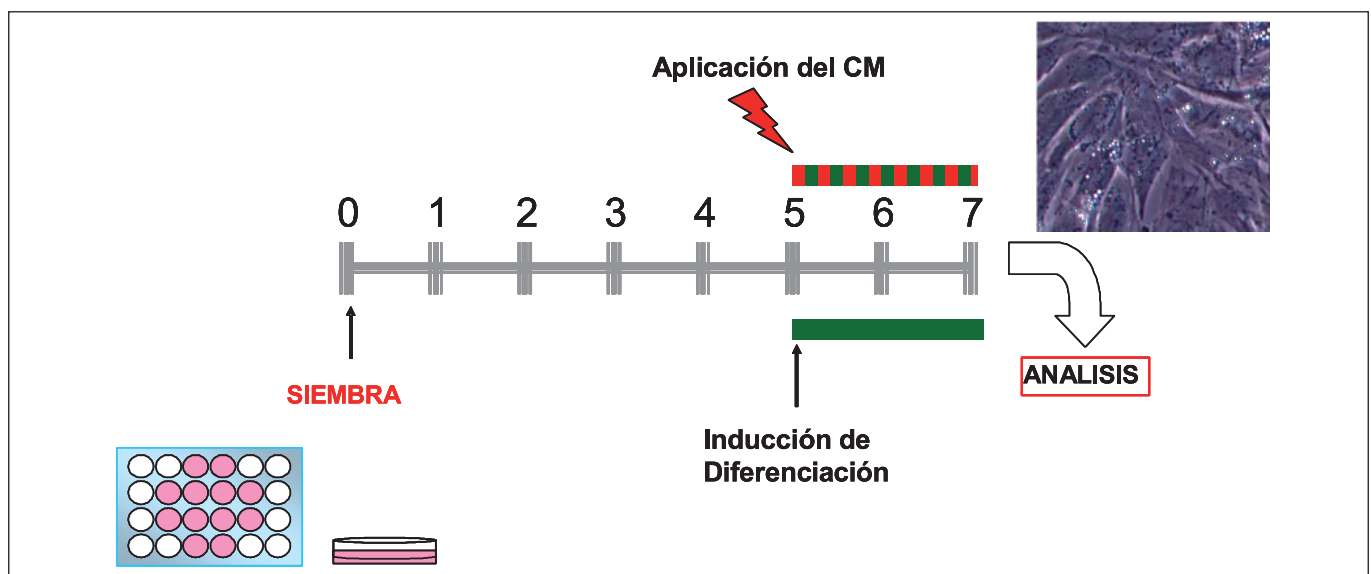


Figura 4. Protocolo de siembra y exposición a CM de cultivos de células ADSC.

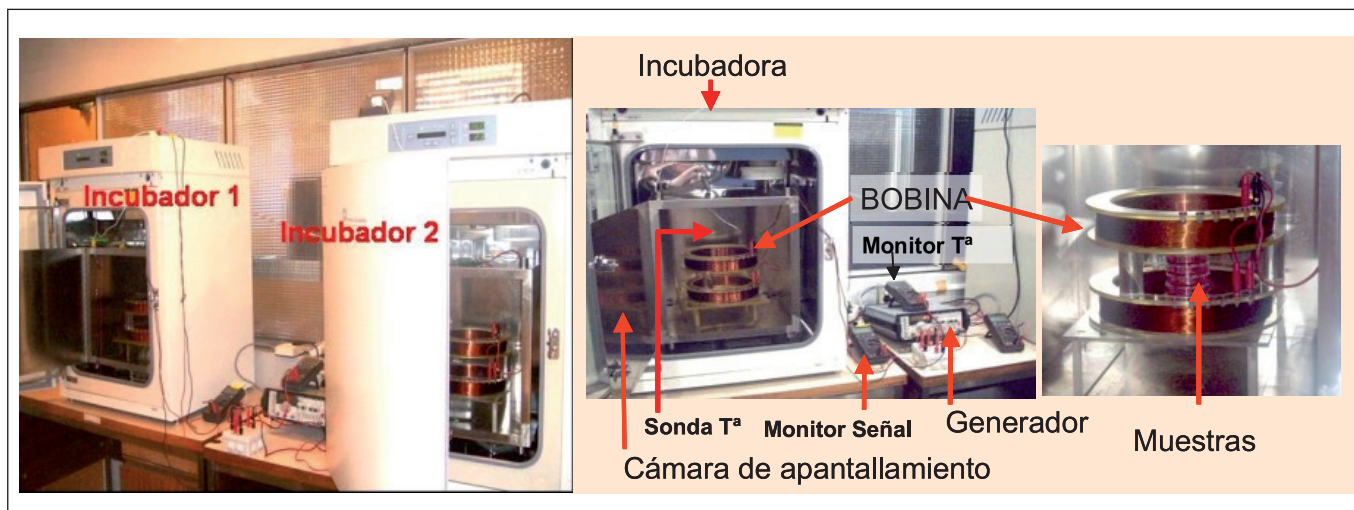


Figura 5. Sistema de exposición a CM de cultivos de células ADSC.

crecimiento fue retirado y sustituido por un medio de diferenciación compuesto por DMEM suplementado con un 10% de suero fetal bovino, 10 $\mu\text{g/ml}$ de insulina, 0,25 mM IBMX (3-isobutil-1-metilxantina), 200 μM indometacina y 1 μM dexametasona, 1% de glutamina y 1% de antibiótico/antimicótico.

Inmediatamente después de la adición del medio de diferenciación pro-adipocítica, y durante las primeras fases del proceso de diferenciación, se procedió a la estimulación durante 18 o 42 h con CM homogéneo, de polarización lineal vertical y $B=100 \mu\text{T}$ (muestras expuestas) o $B=0,0 \mu\text{T}$ (muestras control). Finalizado el periodo de exposición o de control, las células fueron procesadas para el estudio por inmunofluorescencia y por *western blot* de la expresión de PPAR γ y de la MAPK ERK1/2, así como para la cuantificación del contenido intracelular de ácidos grasos.

3.2. Protocolo de exposición al campo magnético

Las células expuestas fueron sometidas a un CM sinusoidal de 50 Hz de frecuencia y 100 μT de densidad de flujo magnético, aplicado en ciclos de 3h On/3h Off, durante periodos de 18 horas o de 42 horas. El sistema de exposición empleaba una pareja de incubadoras idénticas (Forma Scientific). En cada incubadora se ubicó una pareja de bobinas en configuración Helmholtz, situada en el interior una cámara de apantallamiento (co-netic metal; Amuneal Corp., Filadelfia, PA). Esta cámara permitía blindar la zona de exposición frente a contaminación por campos ambientales de frecuencias bajas, como los generados por los sistemas de calentamiento y ventilación de las incubadoras. Cada una de las bobinas, usadas alternativamente para la exposición magnética o para exposición simulada (*sham*) como control en réplicas experimentales sucesivas, constaba de dos solenoides de 20 cm \square , cada uno de ellos formado por 1000 vueltas de cable aislado. Los solenoides estaban alineados parale-

lamente, separados entre sí por un espacio de 10 cm y orientados para producir un campo magnético uniforme, de polarización vertical, en el volumen cilíndrico interior. Los dos conjuntos de bobinas Helmholtz fueron alimentados alternativamente por un único generador de baja frecuencia (Newtronic Mod. 200MSTPC, Madrid). La señal del generador era ajustada y monitorizada permanentemente con un multímetro (Hewlet Packard, 974A, Loveland CO) conectado en serie a las bobinas. Las placas de 24 pocillos o las placas Petri se colocaron apiladas en el interior de las bobinas (Figura 5).

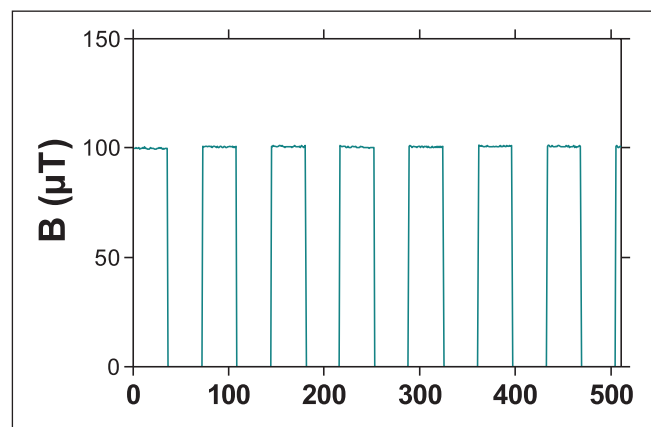


Figura 6. Registro de campo magnético realizado durante 42 horas de exposición. Se aprecian los trenes de señal sinusoidal de 50 Hz aplicados en ciclos de 3 h ON / 3 h OFF.

Se acopló al generador un temporizador, programado para la exposición intermitente al CM, en ciclos de 3 h On/ 3 h Off. La densidad de flujo magnético B en el área de exposición fue registrada, antes del comienzo y tras la finalización de cada réplica experimental, con un magnetómetro (EFA-3, Wandel & Goltermann GMW & Co. Germany). Periódicamente, se hicieron registros completos

de CM en el interior de las bobinas durante todo el periodo de exposición (Figura 6). El valor medio de los componentes alterno y estático de campo magnético ambiental registrado en el interior de las bobinas no estimuladas resultó ser: $AC = 0.035 \pm 0.03 \mu T$ y $DC = 0.05 \pm 0.008 \mu T$. La temperatura en el interior de las bobinas fue monitorizada mediante un sensor conectado a un multímetro. Aunque la presión parcial de CO_2 en el interior de las cámaras de apantallamiento era controlado por los sistemas automatizados de los propios incubadores, era comprobada rutinariamente antes, durante y después de cada experimento (Firite Combustión Test Kit; Bacharach).

3.3. Procedimientos analíticos

3.3.1. Análisis del contenido en ácidos grasos: tinción con Oil Red O

La tinción de las células con Oil Red O, fue utilizada como indicador de la acumulación intracelular de ácidos grasos. Las células fueron lavadas con PBS, fijadas con paraformaldehído al 4% durante 20 minutos a 4 °C, lavadas adicionalmente con isopropanol al 60% durante 2 minutos e incubadas con Oil Red O (3 partes de solución stock de Oil Red O y 2 partes de H_2O ; solución stock: 0,3% Red Oil O en alcohol isopropílico) durante 1h a temperatura ambiente. A continuación, y tras un lavado con isopropanol al 60% durante 5 minutos para retirar el exceso de colorante, las células fueron lavadas con agua destilada. Para la valoración de la coloración se utilizaron dos procedimientos complementarios: análisis de imagen fotomicrográfica de la tinción histoquímica de lípidos y estudio de acumulación de lípidos por espectrofotometría. Las muestras que se analizaron mediante microscopia fueron montadas con Aquatex (Merck) y analizadas al microscopio. Para cada una de las condiciones experimentales, en el estudio fotomicrográfico se analizaron imágenes digitales de 25 campos y 2 cubreobjetos (Control/Expuestos), utilizando un microscopio Eclipse TE300 (NIKON) y el programa de análisis de imagen Analysis 3.1 (Soft Imaging System, GMBH, Münster, Alemania). El análisis espectrofotométrico de la cantidad de Oil Red O captado por las muestras se realizó extrayendo el colorante con propanol. El contenido en colorante, proporcional a la cantidad de ácidos grasos, fue cuantificado por medición de la absorbancia a 510 nm.

3.3.2. Análisis morfométrico

El objetivo de este análisis era determinar si los posibles efectos del CM sobre la diferenciación adipocítica se traducían en el tipo de cambios morfológicos que son propios del proceso adipogénico. Así, se procedió a un análisis morfométrico comparativo de las células tratadas y de sus controles. Para ello, se registró el tamaño medio de los ejes mayor y menor de las células, en muestras obtenidas de 5 replicados experimentales y teñidas con Hematoxilina Harris. Para cada replicado y condición ex-

perimental (Control/Expuestos) se analizaron las imágenes digitales correspondientes a una media de 15 campos y 5 células por campo en un microscopio Eclipse TE300 (NIKON), usando el programa de análisis de imagen Analysis 3.1 (Soft Imaging System, GMBH, Münster, Alemania).

3.3.3. Ensayos de Inmunofluorescencia para PPAR γ y ERK1/2.

Se analizó mediante ensayo inmunocitoquímico la expresión de PPAR γ y de la forma fosforilada de ERK1/2 (activada). La tasa de células marcadas respecto al total de células en cada campo fue determinada mediante análisis de imagen.

Las células sembradas sobre los cubreobjetos fueron fijadas con paraformaldehído (4 %) / PBS durante 20 m a 4° C y, permeabilizadas con una solución de etanol : ácido acético (95:5) durante 20 m a -20° C. Después de un bloqueo con una solución de FBSi (10 %) / PBS durante 30 m a temperatura ambiente, las muestras fueron incubaron con los anticuerpos y diluciones correspondientes durante toda la noche a 4° C. Para el análisis de la forma activada de ERK1/2 se utilizó un anticuerpo de conejo que reconoce específicamente la forma fosforilada de las dos isoformas de ERK1/2: de 44 kDa y 42 kDa (Biosource). Para analizar la expresión de PPAR γ se utilizó un anticuerpo monoclonal de ratón (Santa Cruz Biotechnology). Los anticuerpos para p-ERK1/2 y PPAR γ (1/100) fueron diluidos en FCSi (5 %) / tritón X-100 (0,05 %) / PBS. Posteriormente, los cubreobjetos fueron incubados durante 1 h a temperatura de laboratorio, con el anticuerpo secundario correspondiente en cada caso: anti-conejo conjugado con el fluorocromo Alexa Fluor 488 y anti-ratón conjugado con el fluorocromo Alexa Fluor 568, respectivamente, a una dilución 1/500 en FCSi (10 %)/ PBS. Las preparaciones se montaron sobre portaobjetos en una solución anti-decolorante + bisbenzimidaz (Hoescht 33342, 3×10^{-5} M) que tiñe el ADN de todos los núcleos. En todos los análisis, se utilizaron como control de tinción muestras no incubadas con el anticuerpo primario.

Para la valoración de los análisis inmunocitoquímicos, las muestras se analizaron en un microscopio Eclipse TE300 (NIKON), usando el programa de análisis de imagen Analysis 3.1 (analy-SIS®; Soft Imaging System, GMBH, Münster, Alemania). Se contabilizaron las células marcadas (p-ERK1/2+ o PPAR γ +) respecto a los núcleos totales. En todos los ensayos y en cada replicado, se capturaron al azar y se digitalizaron para su análisis un total de 20 campos por cubre, y al menos 2 cubres por tratamiento.

3.3.4. Determinación de la expresión de PPAR γ y ERK1/2 mediante Western blot

La cantidad total de PPAR γ y ERK1/2 se valoró también mediante *Western blot*, a distintos tiempos y en las diferentes condiciones de experimentación:

Extracción de proteínas y preparación de las muestras

Las células fueron extraídas de las placas Petri mediante rascado en frío. Se recolectaron células de tres placas por muestra, en una única suspensión celular de 1 ml. Cada muestra fue centrifugada a 1200 rpm durante 5 m a 4 °C. El sedimento se resuspendió en 50 µl del tampón de lisis hipotónico, compuesto por tris-clorhídrico (10 mM); cloruro potásico (10 mM), ácido etilendiamintetraacético (EDTA, 1mM), inhibidores de fosfatasa (molibdato sódico 20 mM, y fluoruro sódico 100 mM (Merck) y -glicerofosfato 20 mM (Calbiochem)), inhibidores de proteasas (fenil-metil sulfonilo (PMSF, 1 mM) (Merck); leupeptina 10 µg/ml y pepstatina 5 µg/ml (Sigma)), ditiotreitól 1mM (Biorad), dodecyl sulfato sódico (SDS, 0,1%) (Merck) y tritón-X100 (0,5%) (ICN)). Tras un periodo de lisis de 45 m a 4 °C, las muestras se centrifugaron brevemente y el sobrenadante fue recuperado y almacenado durante, al menos, 1 h a -80° C.

Electroforesis y transferencia de las proteínas a membranas de nitrocelulosa

En el momento de comenzar la electroforesis, las muestras se descongelaron y el contenido de proteína total en cada muestra fue determinado mediante el método de Bradford.

La separación proteica se realizó en un equipo mini-protean Biorad. La electroforesis se llevó a cabo según el protocolo de Laemmli (1970) con algunas modificaciones: Un total de 30-40 µg del extracto de proteína / carril se diluyó en 7 µl de tampón de carga disociante (Tris-HCl, pH 6.8, 4mM; β-mercaptoetanol 5 %, SDS 0.002 % (Merck); glycerol 10% (Sigma); y azul de bromofenol 0.004 % (ICN)). Se añadió tris-clorhídrico (20 mM) hasta completar 21 µl / carril. De la misma forma se preparó un estándar proteico de diferentes pesos moleculares por gel. Las muestras y el estándar, tras ser desnaturalizados (3-5 min. a 95° C), fueron cargados en un gel discontinuo de SDS-poliacrilamida: compuesto por un gel concentrador preparado al 3 %, y un gel separador al 9 %. Una vez finalizada la separación electroforética a 180 voltios, los geles fueron colocados en una unidad de transferencia semi-seca (Biorad), donde las proteínas fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa siguiendo el protocolo recomendado por la casa comercial (90 m a 20 mA). Tras finalizar la transferencia, las membranas fueron marcadas con los anticuerpos correspondientes.

Inmunodetección

Después de varios lavados con TBS, las membranas fueron incubadas a temperatura de laboratorio, durante 1 h, en solución de bloqueo: Tween-20 (0.1 %) / leche desnatada sin biotina (5 %) / TBS. A continuación, las membranas fueron incubadas durante la noche a 4 °C con el anticuerpo correspondiente para p-ERK 1 y 2 (1/1000), PPARγ (1/500) o β-Actina (1/5000) –utilizado como control de carga–. Tras varios lavados con Tween 20 (0.1 %) /

TBS, las membranas fueron incubadas a temperatura ambiente, durante 1 h, con un anticuerpo secundario conjugado a peroxidasa, de la especificidad correspondiente: anti-conejo o anti-ratón, diluidos en solución de bloqueo (1:3000 y 1:2000, respectivamente). El inmunomarcaje fue revelado mediante quimioluminiscencia (ECL, GE Healthcare). Tras el revelado en placa fotográfica, las bandas obtenidas se analizaron mediante densitometría utilizando el software Diversity One for Polimorphic systems, PDI Quantity One -4.5.2 de Biorad.

3.4. Análisis estadístico

El conjunto de los datos en los tres grupos de cada serie de experimentos fueron expresados como medias ± error estándar de la media (SEM), y analizados mediante el test de la t de Student para datos no pareados, con un intervalo de confianza 95 % y p de dos colas.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Influencia del campo magnético sobre la lipogénesis. Análisis del contenido en ácidos grasos

Se procedió, en primer lugar, a valorar la cantidad de ácidos grasos (AG) acumulados en las células, expuestas o no a un CM de 50 Hz y 100 µT. Según el protocolo descrito anteriormente (resumido en la Figura 4), el CM se aplicó durante 42 h a partir del día 5 post-siembra, es decir, durante las fases tempranas de la diferenciación adipocítica estimulada químicamente. Como muestra la figura 7, la cantidad de Oil Red O incorporado por las células expuestas al CM se vio reducida significativamente con respecto a la media en los controles correspondientes. Dependiendo de la técnica aplicada (espectrofotometría o microscopia y análisis de imagen), la reducción fue de un 24 % o un 29 %. Por lo tanto, los resultados obtenidos mediante ambas técnicas se refuerzan mutuamente, y confirman que la exposición a un CM de 50 Hz y 100 µT induce un descenso estadísticamente significativo en la cantidad de ácidos grasos acumulados en forma de vesículas citoplásmicas.

Adicionalmente, el análisis de imagen fotomicrográfica (Figura 8) reveló que las muestras tratadas con CM presentaban una reducción en el número medio vesículas de AG por célula, unida a una menor proporción de células con vesículas. Esto indicaría que el estímulo de CM podría afectar a la propia diferenciación celular ya desde comienzo de la lipogénesis, o en fases muy tempranas de ésta. Los datos obtenidos son coherentes con nuestros resultados preliminares, que indicaban que el efecto del CM se ejercería preferentemente sobre las fases tempranas de la formación de tejido graso, y que procesos más tardíos de la diferenciación adipocítica, como la lipólisis, no se veían afectados significativamente por la exposición al CM.

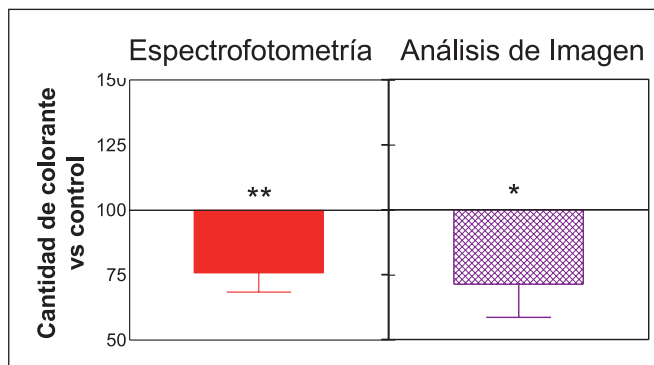


Figura 7. Efecto del CM sobre el contenido en ácidos grasos. Valoración de la cantidad de Oil Red O incorporado por las células mediante análisis espectrofotométrico (izquierda) y análisis de imagen asistido por ordenador (derecha). Medias \pm SEM de 10 replicados experimentales. Valores normalizados sobre las respectivas muestras control, (*: $0.01 < p < 0.05$; **: $p < 0.01$; t-Student).

4.2. Estudio del efecto del campo magnético sobre la morfología de las células. Estudio morfométrico

Alteraciones que tuvieran lugar durante el proceso de adipogénesis, por el que la célula mesenquimal se diferencia a adipocito maduro, podrían dar lugar a efectos sobre la síntesis o almacenamiento de ácidos grasos. Durante la fase de diferenciación desde pre-adipocito hacia adipocito maduro tiene lugar una serie de cambios morfológicos como consecuencia de la acumulación creciente de depósitos lipídicos en el citoplasma. En etapas tempranas de este proceso, el adipocito pasa desde una morfología de tipo fibroblástico a una geometría fusiforme, al tiempo que incrementa su volumen. En fases avanzadas de la diferenciación, la célula adiposa tiende a una morfología esférica, con el núcleo excéntrico, desplazado por la abundancia de vesículas de AG acumuladas en el citoplasma.

Análisis morfométrico: Para la ejecución del estudio morfométrico se utilizaron muestras de células expuestas al CM durante 42 horas en fases iniciales de su diferenciación (día 5 a día 7 post-siembra), como se ha descrito en la Figura 4. Para el análisis morfométrico de imagen asistido por ordenador, se registraron los valores correspondientes al tamaño de los ejes celulares y al ratio eje mayor/eje menor. Los resultados obtenidos revelaron diferencias sutiles en la morfología de las células expuestas a CM con respecto a la de las células control. Tales diferencias consistían en una reducción leve, aunque significativa estadísticamente, en el ratio eje mayor/eje menor de las células expuestas (Figura 9). Es decir, en promedio, las células tratadas presentarían una morfología más poligonales o esférica que las controles, lo cual pudiera ser indicativo de cambios en el citoesqueleto o en la adhesión celular, desencadenados en las primeras 24 h de exposición al CM.

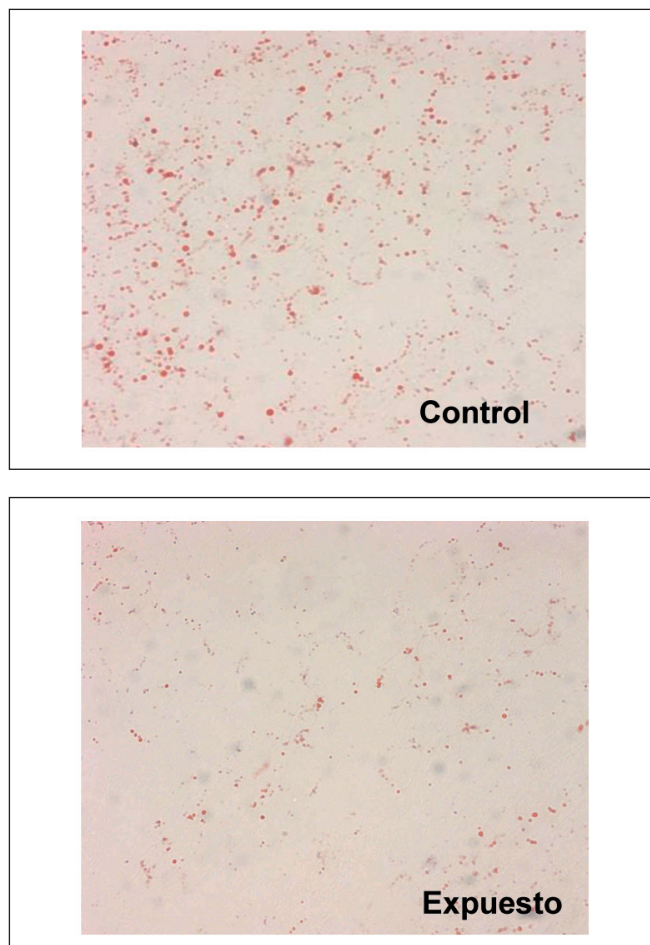


Figura 8. Análisis microscópico de la cantidad y distribución de ácidos grasos en células ADSC. Fotomicrografías representativas de cultivos en fases tempranas de la lipogénesis. El marcaje se acumula en el citoplasma, en forma de vesículas teñidas de rojo. En un cultivo expuesto a CM, tanto el porcentaje de células que incorporan Oil Red O como la cantidad y tamaño de las vesículas teñidas con el colorante, se vieron reducidos en comparación con el cultivo control.

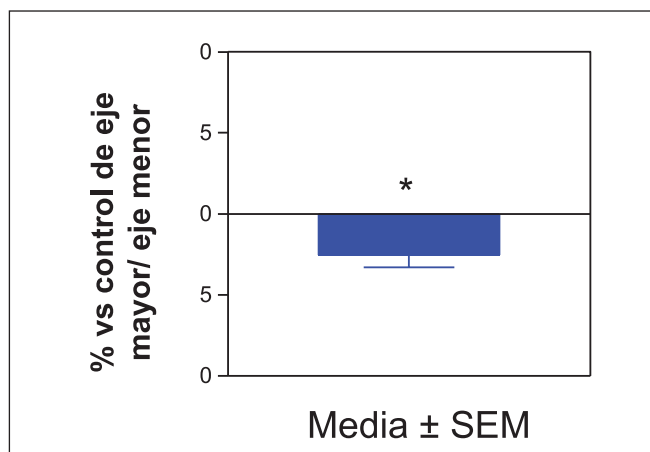


Figura 9. Estudio morfométrico. Valoración del efecto de la exposición de 42 h al CM mediante análisis morfométrico asistido por ordenador de la relación de tamaño entre los ejes mayor y menor de la célula (*: $0.01 < p < 0.05$; t-Student).

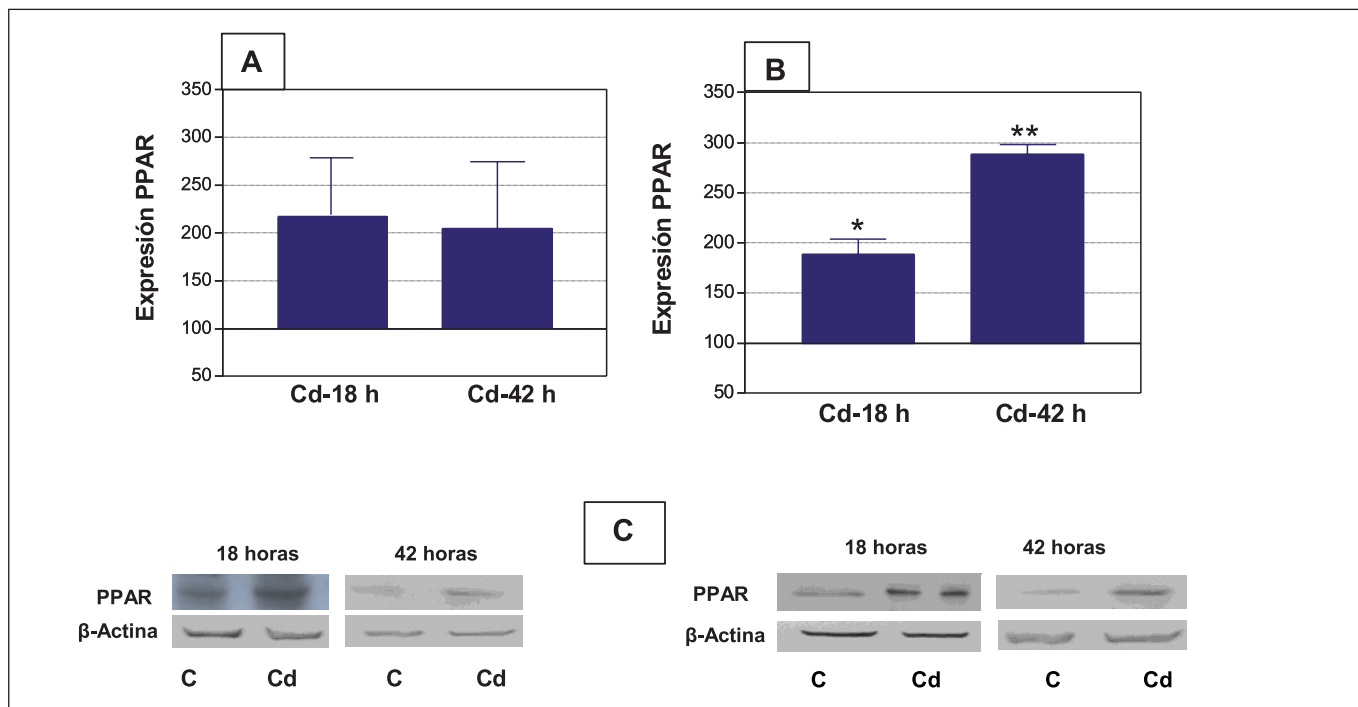


Figura 10. Estudio de la expresión de PPAR γ en células ADSC de pasajes ≤ 4 (A) o de pasajes ≥ 4 (B) tras 18 o 42 h de incubación en medio suplementado con factores de diferenciación (Cd) y en ausencia de estimulación con CM. Datos de densidad óptica en valores normalizados respecto a los controles respectivos: células crecidas en medio privado de factores químicos de diferenciación. C) Blots representativos, en los diferentes pasajes, de la expresión de PPAR γ a 18 y 42 h en controles no diferenciados, C, y en controles diferenciados, Cd. La expresión de β -actina fue utilizada como control de carga. n = 4 replicados experimentales; *: p<0.01; **: p<0.01 (t de Student).

4.3. Expresión del factor de diferenciación adipocítica PPAR γ en respuesta al medio diferenciador, en ausencia de CM. Estudio por Western blot

La expresión del PPAR γ , factor de relevancia para la diferenciación adipocítica, se analizó mediante la técnica de *Western blot*. La expresión de PPAR γ en los cultivos suplementados con los factores de inducción adipocítica ("controles diferenciados" químicamente, Cd) fue comparada con la observada en el grupo de cultivos crecido en medio privado de los factores de inducción adipocítica ("controles no diferenciados" C), utilizado como referencia de la expresión basal de PPAR γ . Los resultados mostraron diferencias en función del pasaje del cultivo celular y del tiempo de incubación. Así, en la figura 10 se representan los niveles de expresión de PPAR γ tras 18 o 42 h de incubación en medio diferenciador, comparando células en pasajes ≤ 4 (Figura 10 A) con pasajes ≥ 4 (Figura 10 B). Como puede observarse, en células de pasajes > 4 el medio de diferenciación induce incrementos significativos en la expresión de PPAR γ tanto a 18 h como a 42 h. Por su parte, en pasajes ≤ 4 los incrementos en la expresión del mismo factor no llegaron a ser significativos estadísticamente. Esta diferencia en la respuesta podría interpretarse como debida a una menor sensibilidad de los estadios iniciales del cultivo a los factores químicos de diferenciación.

4.4. Influencia del CM sobre la expresión del factor de diferenciación adipocítica PPAR γ . Estudio por Western blot

La expresión de PPAR γ en las células expuestas a CM fue comparada con la observada en las células no expuestas ("controles diferenciados" químicamente, Cd). Los resultados mostraron diferencias en función del pasaje del cultivo celular y en función del tiempo de exposición al CM (Figuras 11 y 12). En la figura 11 se representan los resultados observados en células en pase ≤ 4 , tras 18 o 42 h de exposición al CM. Como puede observarse, una exposición de 42 h al CM redujo significativamente la expresión de PPAR γ con respecto a la observada en células no expuestas. Sin embargo, no se observaron cambios significativos estadísticamente al final de un periodo de 18 de exposición al CM (Figura 11 A).

Por su parte, la figura 12 muestra los resultados del análisis de la expresión de PPAR γ en células ADSC de pasajes superiores 4. En estos estadios avanzados el CM no se mostró efectivo ni a 18 ni a 42 horas, no observándose cambios significativos en la expresión de PPAR γ inducidos por la exposición al CM.

En su conjunto, estos resultados revelan que en pasajes tempranos ($P \leq 4$), una exposición de 42 horas al CM puede reducir la expresión de PPAR γ , bloqueando o retrasando el incremento en la expresión de este factor, que es propia de las fases tempranas del proceso de

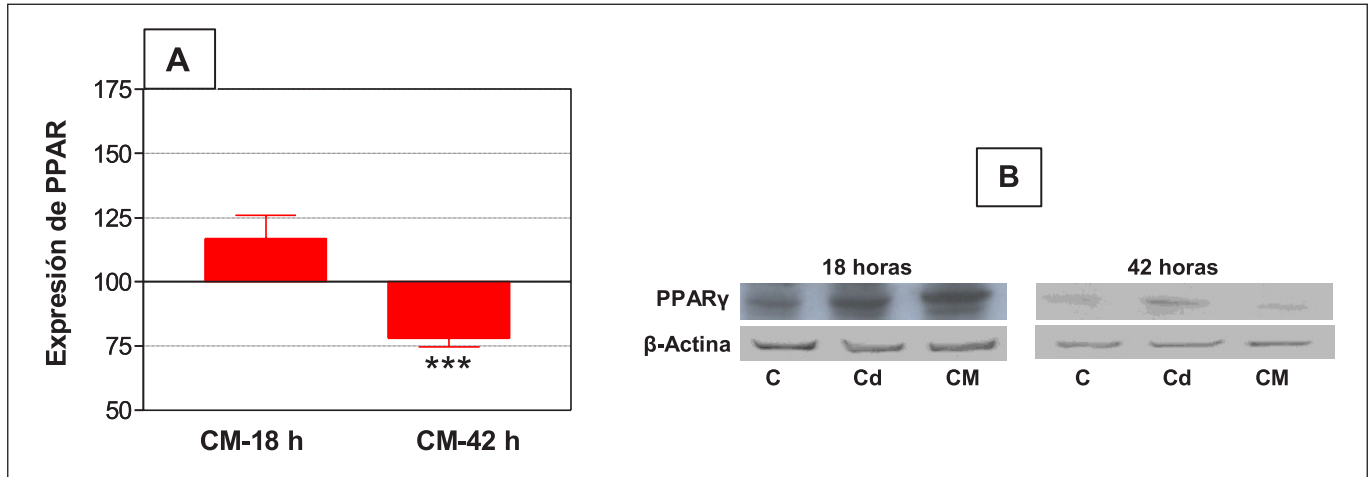


Figura 11. A) Estudio de la expresión de PPAR γ en células ADSC de pasajes ≤ 4 , tras 18 o 42 h de exposición al CM. Datos de densidad óptica en valores normalizados frente a controles diferenciados químicamente (Cd). B) Blot representativo de la expresión de PPAR γ tras 18 y 42 h de exposición al campo magnético (CM), comparados con controles no diferenciados (C), utilizados como referencia de la expresión basal de PPAR γ , y con controles diferenciados (Cd). La expresión de β -actina fue utilizada como control de carga. n = 6 replicados experimentales; ***: $p < 0.001$ (t de Student).

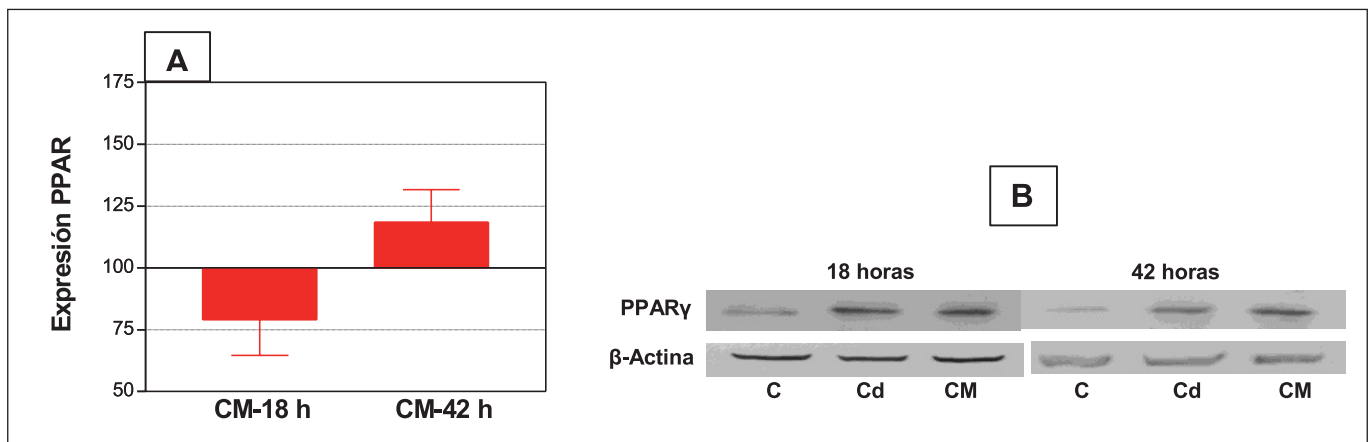


Figura 12. A) Estudio de la expresión de PPAR γ en células ADSC de pasajes > 4 , tras 18 o 42 h de exposición al CM. Datos de densidad óptica en valores normalizados frente a controles diferenciados químicamente (Cd). B) Blot representativo de la expresión de PPAR γ tras 18 y 42 h de exposición al campo magnético (CM), comparados con controles no diferenciados (C), y con controles diferenciados (Cd). n = 4 replicados experimentales.

diferenciación adipocítica. Tal efecto, sería dependiente de variables como el tiempo de exposición y el pasaje celular en el cual se impone el estímulo magnético.

4.5. Influencia del medio de diferenciación y efecto del CM sobre la activación de ERK1/2 (p-ERK1/2). Análisis por Western blot

La activación de la MAPK ERK1/2 se valoró mediante cuantificación por *Western blot* de los niveles de expresión de la forma activa, fosforilada, de ERK1/2 (p-ERK1/2). Para ello se seleccionaron células ADSC en pasajes ≤ 4 , y se incubaron durante 42 horas en presencia o ausencia de CM. Al término de las 42 horas se procedió a la valoración de la expresión de ERK1/2 en los cultivos suple-

mentados con los factores de inducción adipocítica ("controles diferenciadas", Cd), comparada con la expresión en el grupo de células crecido en ausencia de los factores de inducción adipocítica (C) y utilizado como referencia de la expresión basal de PPAR γ . Según se aprecia en la figura 13 A, el medio diferenciador por sí solo, en ausencia de CM, redujo significativamente (57,22%; $p < 0.01$) la activación de ERK1/2 observada en controles crecidos en medio privado de factores de diferenciación química.

Por otro lado, tras 42 h de exposición al CM los niveles de expresión de p-ERK1/2 se vieron incrementados significativamente (36,06%, $p < 0.05$) con respecto a los observados en controles crecidos en medio diferenciador (Cd), en ausencia de CM (Figura 13 B).

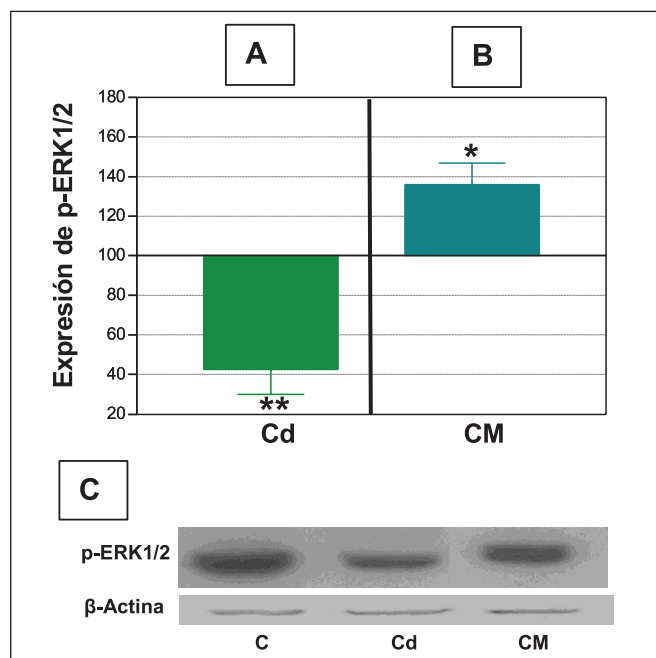


Figura 13. Estudio de la expresión de p-ERK1/2 tras 42 h de la exposición al CM y/o incubación en medio de diferenciación (Cd). Datos de densidad óptica en valores normalizados respecto a sus controles respectivos: **A)** Representa la expresión de p-ERK1/2 en ausencia de exposición a CM, comparando los valores en cultivos crecidos en medio de diferenciación con los de sus controles privados de factores diferenciadores. **B)** Efecto de la exposición a campo magnético (CM) con respecto a controles incubados en medio de diferenciación (Cd). **C)** Blot representativo, tras 42 h de incubación, en controles no diferenciados, C, controles diferenciados, Cd, y muestras crecidas en medio de diferenciación y en presencia de campo magnético, CM. n = 6 replicados experimentales; * p<0.05; ** p<0.01 en la t de Student.

Según se menciona en la introducción de la presente memoria, la activación de la proteína quinasa ERK1/2 se considera implicada en los procesos de diferenciación del tejido adiposo. Por tanto, una modificación en dicha activación podría desencadenar alteraciones en la diferenciación del tejido adiposo. Nuestros resultados indican que la exposición a un CM puede inducir un incremento significativo en la activación de ERK que, a su vez podría conducir a una inhibición o retraso en la diferenciación adipocítica. Este tipo de respuesta es coherente con la observación, descrita en el apartado anterior, de disminución significativa en la expresión del factor de diferenciación PPAR γ tras 42 horas de exposición al CM, así como con los resultados del análisis de contenido de ácidos grasos y del estudio morfométrico en respuesta al CM.

4.6. Influencia del CM sobre la expresión de PPAR γ y ERK1/2 tras 42 horas de exposición al CM. Estudio Inmunoquímico

Para reforzar los resultados descritos anteriormente obtenidos mediante *Western blot*, se procedió a un análisis adicional, mediante técnicas inmunoquímicas, de la expresión de PPAR γ y p-ERK1/2 en células ADSC de pasajes ≤ 4 .

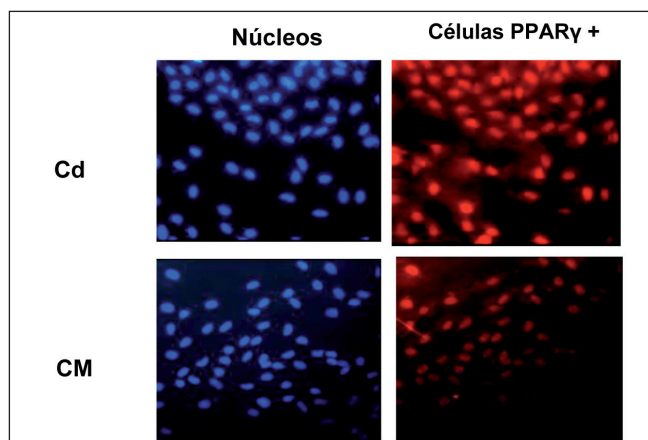


Figura 14. Fotomicrografías representativas de la expresión de PPAR γ (rojo) tras 42 h de la diferenciación adipocítica, en células no expuestas (Cd) o expuestas al campo durante las 42 h (CM). Los núcleos (azul) fueron teñidos con Hoescht 33342 (x40).

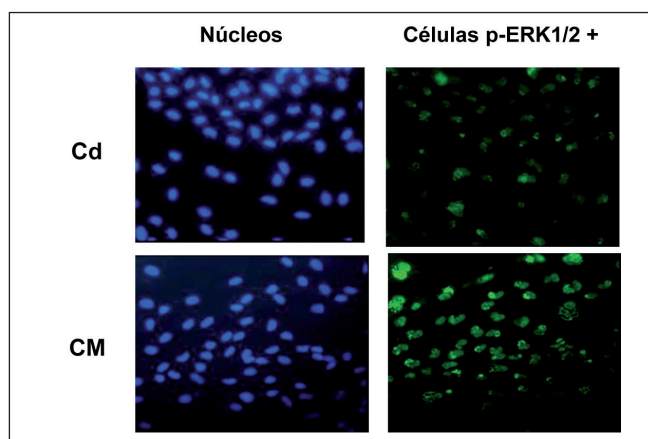


Figura 15. Fotomicrografías representativas de la expresión de p-ERK1/2 (verde) a las 42 h de la diferenciación adipocítica, en células no expuestas (Cd) o expuestas al campo durante las 42 h (CM). Los núcleos (azul) fueron teñidos con Hoescht 33342 (x40).

Los resultados de los análisis de inmunoquímicos ilustrados en las Figuras 14 y 15 se resumen en la figura 16, y revelan que al final de las 42 h de exposición, el CM indujo un descenso significativo en la tasa de células que expresaban PPAR γ (27,9 % vs. controles diferenciados, p<0.01), y un incremento significativo en la tasa de células que expresaban p-ERK1/2 (37,3 % sobre controles diferenciados, p<0,001). Estos datos confirman los efectos del CM sobre dichos factores, descritos en los apartados anteriores de la presente Memoria.

En su conjunto, los resultados sobre los efectos del CM en la expresión de los factores PPAR γ y p-ERK1/2, obtenidos a partir de los análisis inmunoquímicos y de *Western-blot*, son indicativos de que la exposición a 50 Hz, 100 μ T induce alteraciones en las vías de señalización intracelular en las que participan dichos factores, y de que tales alteraciones tendrían como resultado un retraso o inhibición en el proceso de la diferenciación adipocítica.

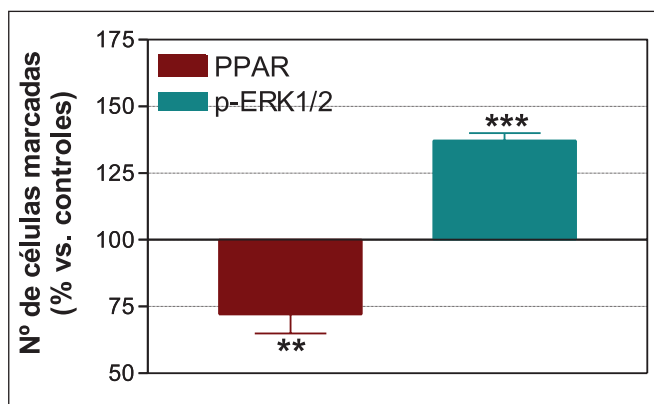


Figura 16. Influencia del CM sobre la expresión de PPAR γ y p-ERK1/2. Contaje de células inmunomarcadas al final de un intervalo de 42 h de exposición al CM. Datos normalizados con respecto a los cultivos de células diferenciadas (Cd) no expuestas a CM. El CM alteró significativamente la expresión de ambos factores, que se sabe están estrechamente relacionados con la diferenciación adipocítica. **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$ con respecto a Cd. (test t de Student).

5. CONCLUSIONES

Nuestro estudio pone en evidencia que campos magnéticos débiles de frecuencia industrial, que pueden encontrarse en determinados ambientes ocupacionales, son capaces de inducir alteraciones en la diferenciación de células componentes del tejido adiposo humano. Esto podría constituir un respaldo experimental a la hipótesis, propuesta por diversos autores, que relaciona la exposición ocupacional a CM de baja frecuencia con alteraciones en el tejido adiposo subcutáneo (ver, por ejemplo, Yang y col., 2010).

Según se desprende del análisis de la incorporación del colorante específico de ácidos grasos Oil Red O, la exposición a un campo magnético de 50 Hz y 100 μ T es capaz de provocar alteraciones en el proceso de formación del tejido adiposo en células ADSC humanas, procedentes de un donante sano. Los resultados revelaron un descenso significativo en la cantidad de ácidos grasos sintetizados por células ADSC expuestas al CM en fases tempranas de su diferenciación. Los datos indican que, en sus estadios iniciales, la diferenciación adipocítica puede verse ralentizada o bloqueada parcialmente por la exposición a campos débiles de 50 Hz.

El mecanismo intracelular implicado en dicho efecto parece estar mediado por cambios en la expresión del factor PPAR γ y en la activación de ERK1/2. Los niveles de expresión de estos factores, así como los patrones cronológicos correspondientes, están implicados en la diferenciación de los pre-adipocitos. Los cambios inducidos por el CM, revelados en el presente estudio, se traducen en decrementos significativos, dependientes del tiempo de exposición, en la tasa de células que expresan PPAR γ . Esta alteración sería coherente con una inhibición/retraso de la adipogénesis. Distintos factores de tipo biológico, como el pasaje de los cultivos celulares y el tiempo de

exposición se han revelado, asimismo, determinantes en la respuesta inducida por el campo magnético.

También se ha observado que el campo magnético provoca incrementos significativos, tanto la tasa de células que expresan la forma fosforilada de ERK1/2 (p-ERK1/2) como en la expresión de p-ERK1/2. Tras un periodo de exposición de 48 h, estos efectos se han mostrado asociados a alteraciones en las fases iniciales de la lipogénesis o en la acumulación de ácidos grasos en el citoplasma de las células ADSC.

Diferentes agentes químicos, preferentemente factores de crecimiento, han sido descritos como inhibidores de la lipogénesis en diferentes tipos de celulares adipocíticos y, por lo general, tal acción inhibitoria se ha visto asociada a modulaciones o cambios en la expresión de PPAR γ . En algunos estudios dicha respuesta se ha visto también mediada por cambios en la expresión/activación de la proteína MAPK-ERK1/2 (Hu y col., 1996; Bost y col., 2005; Kim y col., 2007). A partir del bloque de evidencia experimental, se ha propuesto que la activación de ERK puede tener efectos opuestos durante la adipogénesis. Así, en estadios tempranos de la diferenciación adipocítica, ERK resultaría activada a fin de promover la proliferación, mientras que en estadios posteriores se requeriría una segunda activación de ERK. Sin embargo, algunos autores (Kim y col., 2007) han observado que el segundo pico de activación de ERK (a 48 horas) tiene, de hecho, un efecto inhibitorio de la diferenciación adipocítica, asociado a una inhibición de la inducción de PPAR γ . Estos datos serían coherentes con los resultados del presente estudio que muestran que, tras 42 h de exposición, el campo magnético puede inducir descensos en los niveles de PPAR γ , asociados a incrementos en la activación de ERK1/2. Mientras que tras 18 h de exposición, el CM no induce cambios significativos en el factor PPAR γ . Estas diferencias podrían explicarse por la existencia de un patrón cronológico diferencial en la respuesta inducida por la activación de ERK1/2.

En nuestro estudio, al igual que en el de Kim y col., la respuesta inducida por el CM, de disminución de la síntesis ácidos grasos en fases tempranas de la lipogénesis, podría ser el resultado de una desregulación, también inducida por el CM, de la expresión de ERK a lo largo del periodo de diferenciación adipocítica.

También los estímulos mecánicos han sido descritos como factores capaces de inhibir la diferenciación adipocítica a través de la modulación del factor PPAR γ (David y col., 2007). Y también la activación de la MAPK-ERK1/2 ha sido propuesta como implicada en la inhibición del factor PPAR γ causada por estímulos mecánicos inhibidores de la diferenciación de adipocítica (Tanabe y col., 2004). Dado que está admitida generalmente la implicación de estímulos de tipo mecánico en el desarrollo de la lipoatrofia semicircular, aunque este aspecto de la lesión no ha sido abordado en el presente estudio, cabe proponer la existencia de una posible sinergia de factores, mecánicos y electromagnéticos, en el desarrollo de la LS en ambientes ocupacionales.

En definitiva, los resultados obtenidos en el presente estudio respaldan la hipótesis de que la exposición a

campos débiles de frecuencia industrial, presentes en determinados ambientes ocupacionales, son capaces de provocar alteraciones en la diferenciación de células del tejido adiposo. El mecanismo de actuación del campo magnético implicaría la activación de la MAPK-ERK1/2. El efecto sobre la diferenciación de la célula adiposa estaría mediado, al menos en parte, por el factor de diferenciación adipocítica PPAR γ . Estos datos apoyarían que un campo magnético de frecuencia industrial podría actuar como cofactor en la etiología de la lipoatrofia semicircular.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Betti R, Urbani CE, Inselvini E, Crosti C. Semicircular lipoatrophy. *Clin Exp Dermatol* 17: 382-3, 1992.
- Bordel Gómez MT. Lipoatrofia semicircular unilateral. *Piel* 21: 414-5, 2006.
- Chehab FF. Obesity and lipodystrophy--where do the circles intersect? *Endocrinology* 149(3):925-34, 2008.
- Bost F, Aouadi M, Caron L, Binétruy B. The role of MAPKs in adipocyte differentiation and obesity. *Biochimie* 87(1):51-6, 2005.
- David V, Martin A, Lafage-Proust MH, Malaval L, Peyroche S, Jones DB, Vico L, Guignandon A. Mechanical loading down-regulates peroxisome proliferator-activated receptor gamma in bone marrow stromal cells and favors osteoblastogenesis at the expense of adipogenesis. *Endocrinology* 148(5):2553-62, 2007.
- De Groot AC. Is lipoatrophia semicircularis induced by pressure? *Br J Dermatol* 131: 887-90, 1994.
- Gómez-Espejo C, Bernal-Pérez A, Camacho-Martínez F. A new case of semicircular lipoatrophy associated with repeated external microtraumas and review of the literature. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 19:459-61, 2005.
- Gschwandtner WR, Münzberger H. Lipoatrophia semicircularis. Linear and circular atrophy of the subcutaneous fat in the extremities. *Hautarzt* 25:222-7, 1974.
- Gruber PC, Fuller LC. Lipoatrophy semicircularis induced by trauma. *Clin Exp Dermatol* 26:269-71, 2001.
- Guallar JP, Rojas-García R, García-Arumi E, Domingo JC, Gallardo E, Andreu AL, Domingo P, Illa I, Giralt M, Villarroya F. Impaired expression of mitochondrial and adipogenic genes in adipose tissue from a patient with acquired partial lipodystrophy (Barraquer-Simons syndrome): a case report. *J Med Case Reports* 2:284-9, 2008.
- Hermans V, Hautekiet M, Haex B, Spaepen AJ, Van der Perre G. Lipoatrophia semicircularis and the relation with office work. *Appl Ergon* 30: 319-24, 1999.
- Hu, E., J. B. Kim, P. Sarraf, and B. M. Spiegelman. Inhibition of adipogenesis through. MAP kinase-mediated phosphorylation of PPARgamma. *Science* 274:2100-103, 1996.
- Herane MI, Urbina F, Sudy E. Lipoatrophia semicircularis: a compressive lipoatrophy consecutive to persistent mechanical pressure. *J Dermatol* 34: 390-3, 2007.
- ICNIRP. Guidelines for Limiting Exposure to Time-Varying Electric, Magnetic and Electromagnetic Fields. *Health Phys* 74: 494-522, 1998.
- Kim KA, Kim JH, Wang Y, Sul HS. Pref-1 (preadipocyte factor 1) activates the MEK/extracellular signal-regulated kinase pathway to inhibit adipocyte differentiation. *Mol Cell Biol* 27(6):2294-308, 2007.
- Maes A, Curvers B, Verschaeve L. Lipoatrophia semicircularis: the electromagnetic hypothesis. *Electromagnet Biol Med* 22: 183-93, 2003.
- Mallet RB, Champion RH. Lipoatrophia semicircularis. *Br J Dermatol* 105:591-93, 1981.
- Martínez MA, Cid MA, Úbeda A, García VJ, Leal J, Trillo MA. A role of ERK signaling in the proliferative effects of 50 Hz MF on human neuroblastoma cells. In Kostarakis P, editor. Biological Effects of Electromagnetic Fields. Proceedings from the 4th International Workshop on Biological Effects of Electromagnetic Fields. 2006, October 16-20. Crete, Greece Vol II:1051-55, 2006.
- Mascaro JM, Ferrando J. The perils of wearing jeans: lipoatrophia semicircularis. *Int. J Dermatol* 22: 333, 1983.
- Rosen ED, Spiegelman BM. Molecular regulation of adipogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 16:145-71, 2000.
- Sanz P, Nogue S, Farrús X, Molina JM. Lipoatrofia semicircular en oficinistas. *Med Clin (Barc)*. doi:10.1016/j.medcli.2009.02.030, 2009.
- Tanabe Y, Koga M, Saito M, Matsunaga Y, Nakayama K. Inhibition of adipocyte differentiation by mechanical stretching through ERK-mediated downregulation of PPARgamma2. *J Cell Sci* 117 (Pt 16):3605-14, 2004.
- Tang QQ, Otto TC, Lane MD: Mitotic clonal expansion: a synchronous process required for adipogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:44-9, 2003.
- Vernochet C, Milstone DS, lehle C, Belmonte N, Phillips B, Wdziekonski B, Villageois P, Amri EZ, O'Donnell PE, Mortensen RM, Ailhaud G, Dani C. PPAR γ -dependent and PPAR γ -independent effects on the development of adipose cells from embryonic stem cells. *FEBS Lett* 510:94-8, 2002.
- Yang Y, Tao C, Zhao D, Li F, Zhao W, Wu H EMF acts on rat bone marrow mesenchymal stem cells to promote differentiation to osteoblasts and to inhibit differentiation to adipocytes. *Bioelectromagnetics* 31(4):277-85, 2010.
- Zafra-Cobo MI, Yuste-Chaves M, Garabito-Solovera E., Santos-Briz Á., Morán-Estefanía M, de Unamuno-Pérez P. Lipoatrofia semicircular inducida por presión. *Actas Dermosifiliogr* 99:396-8, 2008.
- Zuk, PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, Alfonso ZC, Fraser JK, Benhaim P, Hedrick MH. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell* 13: 4279-4295, 2002.

Conflicto de intereses

Los autores hemos recibido ayuda económica de FUNDACIÓN MAPFRE para la realización de este proyecto. No hemos firmado ningún acuerdo por el que vayamos a recibir beneficios u honorarios por parte de alguna entidad comercial o de FUNDACIÓN MAPFRE.