

Tesis Doctoral



VNIVERSIDAD  
D SALAMANCA

# Regulación de la adipogénesis y termogénesis por APC/C-Cdh1: consecuencias fisiológicas *in* *vivo*



Rubén Rodríguez González

Salamanca, 2018





Universidad de Salamanca-CSIC  
Instituto de Biología Funcional y Genómica



El **Dr. D. Sergio Moreno Pérez**, Profesor de Investigación del Consejo Superior de Investigaciones Científicas,

y la **Dra. D<sup>a</sup>. Irene García Higuera**, Investigadora del Instituto de Biología Funcional y Genómica

**CERTIFICAN:**

Que la memoria titulada "Regulación de la adipogénesis y termogénesis por APC/C-Cdh1: consecuencias fisiológicas *in vivo*" presentada por el licenciado D. Rubén Rodríguez González para optar al grado de Doctor en Biología por la Universidad de Salamanca, ha sido realizada bajo su dirección en el Centro Mixto de Biología Funcional y Genómica, CSIC-Universidad de Salamanca.

Y para que así conste, firmamos el siguiente certificado en Salamanca,

a 8 de enero de 2018

Fdo. Sergio Moreno Pérez

Fdo. Irene García Higuera



El Dr. D. Francisco del Rey Iglesias, Catedrático del Departamento de Microbiología y Genética de la Universidad de Salamanca

**CERTIFICA:**

Que la memoria titulada “Regulación de la adipogénesis y termogénesis por APC/C-Cdh1: consecuencias fisiológicas *in vivo*” presentada por el licenciado D. Rubén Rodríguez González para optar al grado de Doctor en Biología por la Universidad de Salamanca, ha sido realizada bajo la dirección del Dr. D. Sergio Moreno Pérez y de la Dra. D<sup>a</sup>. Irene García Higuera en el Centro Mixto de Biología Funcional y Genómica, CSIC-Universidad de Salamanca.

Y para que así conste, firma el siguiente certificado en Salamanca,

a 8 de enero de 2018



Fdo. Francisco del Rey Iglesias



# Índice





# Índice

## Introducción

### 1. Obesidad<sup>8</sup>

- 1.1 Definición y prevalencia
- 1.2 Etiología
- 1.3 Problemas clínicos y comorbilidades asociadas
- 1.4 Tratamiento

### 2. Tejido adiposo<sup>10</sup>

- 2.1 Fisiología
- 2.2 Adipocitos
  - 2.1 Adipocitos blancos
  - 2.2 Adipocitos marrones
  - 2.2 Adipocitos beige o brite

### 3. Diferenciación de adipocitos o adipogénesis

- 3.1 Células precursoras
- 3.2 Regulación de la adipogénesis
- 3.3 Importancia de la ruta PI3K/AKT/mTOR/FoxO1 en adipogénesis
- 3.4 Relación entre las rutas b-adrenérgica y PI3K/AKT en adipocitos
- 3.5 Reguladores de ciclo y adipogénesis

### 4. Termogénesis no-temblorosa en adipocitos marrones y *beiges*

- 4.1 Introducción
- 4.2 Regulación de la termogénesis no-temblorosa y el *browning*.

### 5. Familia de proteínas desacoplantes UCPs: estructura, regulación

#### y degradación de UCP1

- 5.1 Familia de las proteínas desacoplantes UCPs

## ***-Índice-***

5.1.2 Actividad de UCP1

5.1.3 Regulación de UCP1

5.4 Sistema ubiquitina-proteasoma (UPS)

5.4.1 Sistema ubiquitina-proteasoma (UPS) y adipogénesis

5.4.2 Sistema ubiquitina-proteasoma (UPS) y mitofagia

5.4.3 Sistema ubiquitina-proteasoma (UPS) y UCPs

### **6. APC/C-Cdh1.**

6.1 Introducción

6.2 APC/C-Cdh1 y ciclo celular

6.3 APC/C-Cdh1 y diferenciación celular

6.3.1 APC/C-Cdh1 y el estado de quiescencia

6.3.2 APC/C-Cdh1 y neurogénesis

6.3.3 APC/C-Cdh1 y gametogénesis

6.3.4 APC/C-Cdh1 y miogénesis

6.3.5 APC/C-Cdh1 y osteogénesis

3.3.6 APC/C-Cdh1 y adipogénesis<sup>25</sup>

**6. Generación de modelos de delección génica inducibles por recombinasa Cre para el estudio de la adipogénesis y del tejido adiposo in vivo**

## **Objetivos**

## **Material y métodos**

### **1. Ratones<sup>4</sup>**

### **2. Genotipado**

2.1 Extracción de DNA

2.2 PCR

### **3. Cultivos celulares**

- 3.1 Establecimiento de cultivos primarios de MEFs
- 3.2 Establecimiento de cultivo de preadipocitos blancos
- 3.3 Ensayo de adipogénesis in vitro
- 3.4 Infecciones con adenovirus
- 3.5 Sincronización celular en G<sub>0</sub>-G<sub>1</sub> (quiescencia).
- 3.6 Análisis de la expansión clonal (proliferación celular por incorporación de EdU).
- 3.7 Tratamiento de las células en cultivo.
- 3.8 Transfecciones transitorias.

### **4. Cuantificación de la adipogénesis**

### **5. Técnicas de proteínas**

- 5.2 Preparación de extractos proteicos a partir de células en cultivo.
- 5.3 Preparación de extractos proteicos a partir de tejidos.
- 5.4 Cuantificación de la concentración de proteínas.
- 5.5 Inmunodetección por *Western blot*.

### **6. Consumo de oxígeno**

### **7. Potencial de membrana**

### **8. Carga mitocondrial**

### **9. Medida indirecta de la fermentación láctica**

- 9.1 Consumo de glucosa
- 9.2 Liberación de lactato

### **10. Histología e inmunohistoquímica**

### **11. Microscopía**

### **12. Citometría de flujo**

### **13. Mutagénesis dirigida**

### **14. Ensayos in vivo**

- 14.1 Peso y fotografías de los animales y tejidos.
- 14.2 Procesamiento de los tejidos.
- 14.3 Dieta grasa.

## ***-Introducción-***

- 14.4 Control de la ingesta
- 14.5 Tolerancia al frío.
- 14.6 Estimulación b-adrenérgica.
- 14.7 Curva de tolerancia a la glucosa.

### **15. Técnicas de mRNA**

- 15.1 Aislamiento de adipocitos maduros de WAT.
- 15.2 Purificación del mRNA
- 15.3 PCR cuantitativa a tiempo real (q-RT-PCR).

### **16. Tratamiento de datos y análisis estadístico**

## **Resultados**

### **1. Papel de APC/C-Cdh1 en adipogénesis**

- 1.1 La ausencia de Cdh1 incrementa la adipogénesis *in vitro*.
- 1.2 La adipogénesis en ausencia de Cdh1 cursa con una mayor expansión clonal.
- 1.3 El exceso de expansión clonal es responsable, pero sólo parcialmente, del incremento de adipogénesis en ausencia de Cdh1.
- 1.4 La depleción de Cdh1 sólo durante la diferenciación terminal también incrementa la adipogénesis *in vitro*.
- 1.5 La adipogénesis en ausencia de Cdh1 cursa con niveles disminuidos de p21 y p27, e incrementados de fosfo-AKT (pAKT). La hiperactivación de la ruta PI3K/AKT contribuye decisivamente al aumento de adipogénesis en ausencia de Cdh1.
- 1.6 La inactivación de APC/C no conduce a la hiperactivación de la ruta PI3K/AKT.

### **2. Papel de APC/C-Cdh1 en adipocitos maduros**

- 1.1. Los adipocitos Cdh1KO poseen menores niveles de PGC1a, y una menor inducción transcripcional de UCP1.
- 1.2. Los adipocitos Cdh1KO poseen menores niveles de PGC1a, y una menor inducción transcripcional de UCP1.
- 1.3. La ausencia de Cdh1 no modifica la carga mitocondrial en adipocitos maduros.
- 1.4. UCP1 se degrada de forma dependiente del proteasoma y de Cdh1.
- 1.5. UCP1 se estabiliza en ausencia de Cdh1 en adipocitos maduros.
- 1.6. La degradación de UCP1 es dependiente de Cdh1 y, al menos en células quiescentes, de su caja D.
- 1.7. El incremento de UCP1 en los adipocitos Cdh1KO es funcional, y tiene importantes consecuencias metabólicas.

### **1. Consecuencias fisiológicas *in vivo* de la depleción específica de Cdh1 durante la adipogénesis y/o en adipocitos maduros.**

- 1.1. Deleción de Cdh1 mediada por el transgén aP2-Cre o adipoQ-Cre.
- 1.2. Efecto en la adipogénesis y en la expansión clonal de la depleción mediada por el transgén aP2-Cre (modelo PACdh1KO) o adipoQ-Cre (modelo MACd-

h1KO).

- 1.3. Hiperactivación de la ruta PI3K/AKT y estabilización de UCP1, tras la depleción de Cdh1 en tejido adiposo, *in vivo*.
- 1.4. Fenotipo basal de los animales PACdh1KO.
- 1.5. Fenotipo basal de los animales MACdh1KO. Fenotipo basal de los animales Cdh1(-/D).
- 1.6. En respuesta a dieta grasa, los animales PACdh1KO presentan obesidad y comorbilidades asociadas.
- 1.7. En respuesta a dieta grasa, los animales MACdh1KO muestran protección frente a obesidad y comorbilidades asociadas.
- 1.8. Los ratones PACdh1KO presentan mayor tolerancia al frío.
- 1.9. Los ratones MACdh1KO son más termogénicos.

## **2. Regulación de Cdh1 tras la exposición al frío.**

## **Discusión**

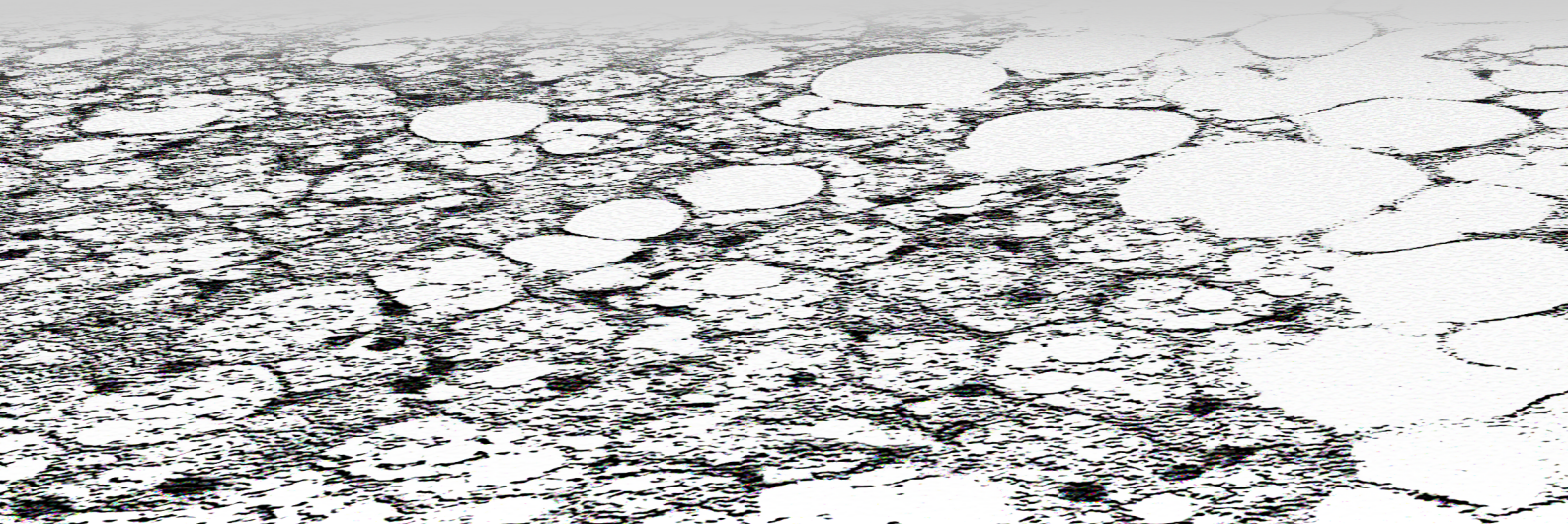
- 1. APC/C-Cdh1 inhibe la adipogénesis.**
  - 1.1. APC/C-Cdh1 inhibe la expansión clonal.
  - 1.2. Cdh1 inhibe la diferenciación terminal.
- 2. APC/C-Cdh1 promueve la degradación de UCP1.**
  - 2.1. Mayores niveles proteicos de UCP1 en ausencia de Cdh1.
  - 2.2. Mayor estabilidad proteica de UCP1 en ausencia de Cdh1.
  - 2.3. El incremento de UCP1 conlleva cambios metabólicos intracelulares en los adipocitos carentes de Cdh1.
- 3. Fenotipo *in vivo* de la depleción de Cdh1 en tejido adiposo.**
  - 3.1. Depleción de Cdh1 mediada por el transgén aP2-Cre o adipoQ-Cre.
  - 3.2. Hiperactivación de la ruta PI3K/AKT e incremento en los niveles proteicos de UCP1, en los animales Cdh1KO.
  - 3.3. Fenotipo de los mutantes PACdh1KO.
  - 3.4. Fenotipo de los mutantes MACdh1KO.
- 4. Fenotipo adiposo *in vivo* de la delección constitutiva de Cdh1.**
- 5. Regulación de Cdh1 en tejido adiposo en la exposición al frío.**
- 6. Modelo. Papel fisiológico de Cdh1 en tejido adiposo.**

## **Conclusiones**

## **Bibliografía**



# Introducción







### **1. Obesidad.**

#### 1.1. Definición y prevalencia.

‘Los que son excesivamente gordos por naturaleza están más expuestos que los delgados a una muerte repentina’. Así lo plasmó Hipócrates en su Aforismo 44, reconociendo ya en el siglo V a.C. que la obesidad era un problema médico (Haslam, 2007).

El sobrepeso y la obesidad se definen como una acumulación anormal o excesiva de grasa que puede ser perjudicial para la salud. Para su diagnóstico se utiliza, como valor indicativo, el índice de masa corporal (IMC), que se calcula dividiendo el peso de una persona en kilogramos por el cuadrado de su talla en metros ( $\text{kg}/\text{m}^2$ ). Así, un IMC igual o superior a 25 puede indicar sobrepeso, y un valor igual o superior a 30 sugiere obesidad (WHO, 2017).

En la actualidad, el sobrepeso y la obesidad se han convertido en un problema de salud mundial de proporciones pandémicas: 1) desde 1980, el número de personas obesas se ha duplicado en todo el mundo, 2) en 2014, más de 1900 millones de adultos tenían sobrepeso, y más de 500 millones eran obesos, suponiendo índices de obesidad del 30% en América y 20% en Europa, 3) cada año mueren, como mínimo, 2.8 millones de personas a causa de la obesidad o el sobrepeso, 4) la tasa de mortalidad debida a obesidad hoy en día es mayor que la asociada al infrapeso (WHO, 2017).

#### 1.2. Etiología.

La obesidad se desarrolla cuando crónicamente la ingesta calórica a través de la dieta excede el gasto energético total, almacenándose ese exceso energético en forma de grasa en el tejido adiposo (Spiegelman & Flier, 2001; Seale & Lazar, 2009). Es una patología de origen multifactorial, resultado del ambiente y del estilo de vida y genética de los individuos (Friedman, 2000; Wright & Aronne, 2012; Van der Klaauw & Farooqi, 2015).

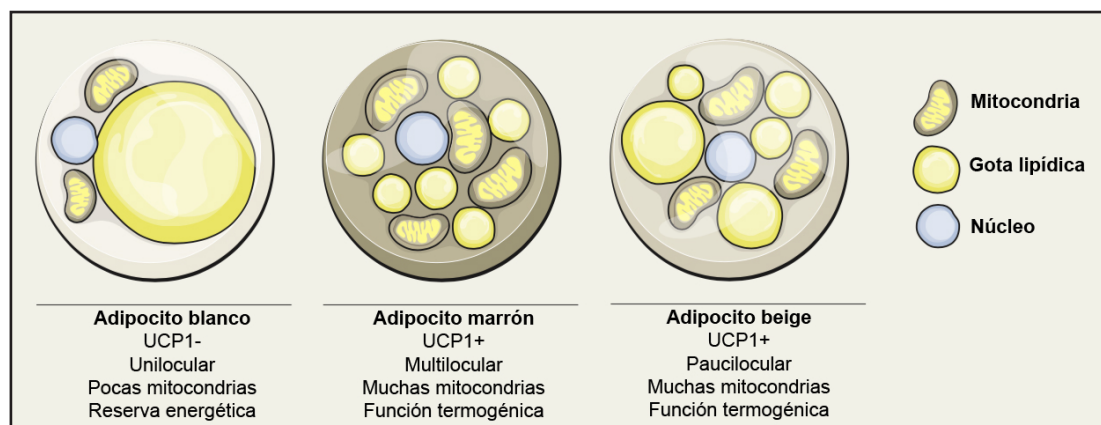
Uno de los atributos excepcionales del tejido adiposo es su capacidad de cambiar sus dimensiones, bien por incrementar el tamaño de sus células (hipertrofia) o por reclutar nuevos adipocitos (adipogénesis o hiperplasia) (Sun et al., 2011; Cawthorn et al., 2012; Wang et al., 2013; Jeffery et al., 2015). Aunque los adipocitos son capaces de adaptarse y expandirse fisiológicamente en respuesta al consumo calórico excesivo, existe un límite funcional más allá del cual el tejido adiposo deja de funcionar correctamente, resultando en la acumulación tóxica de lípidos en tejidos no adiposos y en la aparición de resistencia a insulina y dislipidemia (Virtue & Vidal-Puig, 2010; Pérez & Medina-Gómez, 2011). Si bien el número de células grasas puede aumentar a lo largo de toda la vida (Prins & O’Rahilly, 1997), típicamente en la obesidad de aparición tardía prima la hipertrofia de las células adiposas, incrementando el tamaño celular hasta un umbral límite (0.7-0.8  $\mu\text{g}/\text{célula}$ ). Sólo en casos de obesidad severa o mórbida, o en obesidad infantil, se produce también hiperplasia adipocitaria (Hirsch & Batchelor, 1976; Krotkiewski et al., 1983).

## -Introducción-

### 1.3. Problemas clínicos y comorbilidades asociadas.

La asociación entre el aumento de depósitos grasos y las complicaciones de salud se observó por primera vez ya en los años 50 (Vague, 1956). La obesidad está asociada a aumentos significativos de morbilidad, mortalidad prematura y deterioro de la calidad de vida, y genera grandes costes en el sistema sanitario (Kopelman, 2000; Fontaine et al., 2003; Haslam & James, 2005). Es un importante factor de riesgo de diversos desórdenes asociados, tales como resistencia a insulina, diabetes tipo 2, hipertensión, dislipidemia, osteoartritis, enfermedad cardiovascular y diversos tipos de cáncer (Haslam & James, 2005; Olshansky et al., 2005; Flegal et al., 2007; Berrington de González et al., 2010; Flegal et al., 2013; Sundaram et al., 2013), debido a un aumento en los niveles plasmáticos de ácidos grasos no-esterificados, glicerol, hormonas, citoquinas inflamatorias y otros factores (Kahn et al., 2006). Además, la obesidad también se asocia frecuentemente a otros problemas clínicos, como apnea de sueño, dificultades respiratorias y de movilidad, trastornos depresivos, etc. (Kopelman, 2000; Puhl & Brownell, 2001).

Aunque la obesidad es un factor de riesgo de resistencia a insulina, diabetes tipo 2 y



**Figura 1. Tipos de adipocitos.** Dibujo representativo de los 3 tipos de adipocitos o células grasas. El adipocito blanco es el tipo mayoritario, actúa como reserva energética, y se caracteriza por tener una única vacuola lipídica muy grande (unilocular) y poca densidad mitocondrial. En cambio, el adipocito marrón es multilocular, posee muchas mitocondrias ricas en UCP1 y es el principal responsable de la termogénesis no-temblorosa. Por último, el adipocito *beige* es un tipo celular inducible, que sólo se genera en respuesta a la estimulación  $\beta$ -adrenérgica. Presenta muchas vacuolas lipídicas de mediano tamaño (paucilocular), un número alto de mitocondrias ricas en UCP1, y juega también un papel muy relevante en la termogénesis no-temblorosa.

enfermedad cardiovascular, no todos los pacientes obesos presentan estas comorbilidades (Abbasi et al., 2002). La acumulación de tejido adiposo por debajo de la cintura en localizaciones como glúteos y extremidades inferiores (obesidad periférica) se asocia con una menor prevalencia de trastornos metabólicos y cardiovasculares (Rexrode et al., 1998; Yusuf et al., 2005; Canoy et al., 2007). En cambio, los individuos con exceso de tejido adiposo intra-abdominal o visceral (obesidad central) corren un riesgo sustancialmente mayor de presentar resistencia a la insulina y sufrir síndrome metabólico (Després et al., 1990; Després, 2006; Sam et al., 2009).

### 1.4. Tratamiento.

Aunque a largo plazo el objetivo principal ha de ser la prevención de la obesidad a

través de cambios en la educación y en el modo de vida, es necesario tratar a los pacientes obesos. Sin embargo, sorprendentemente, las opciones de tratamiento a día de hoy son limitadas (Bessesen & Van Gaal, 2017; Omran, 2017). Los cambios en el estilo de vida en forma de dieta y/o ejercicio no producen generalmente una pérdida de peso marcada o sostenible (Dansinger et al., 2005; LeBlanc et al., 2011). Las terapias psicológicas efectivas, como la terapia cognitivo-conductual, no pueden ser fácilmente aplicables a gran escala y los resultados a largo plazo son decepcionantes (Wing et al., 2006; Rodgers et al., 2012). La cirugía bariátrica, como el *bypass* gástrico, es mucho más efectiva en términos de pérdida de peso, reducción de comorbilidad y supervivencia mejorada (Kral & Naslund, 2007; Sjostrom et al., 2007). Sin embargo, debido a problemas de mortalidad perioperatoria, las complicaciones quirúrgicas y la necesidad frecuente de reoperación, este abordaje suele estar reservado únicamente a obesos mórbidos, por lo que no representa una solución práctica a una epidemia global (Melnikova & Wages, 2006; Field et al., 2009; Dixon et al., 2011). Una estrategia alternativa a la cirugía bariátrica es desarrollar agentes terapéuticos que puedan reducir el peso corporal al disminuir el consumo o la absorción de los alimentos y/o aumentar el gasto energético (Cooke & Bloom, 2006; Melnikova & Wages, 2006; Sargent & Moore, 2009). Desafortunadamente, aunque se ha perseguido con avidez durante más de medio siglo, esta estrategia sólo ha tenido un éxito limitado hasta el momento. A pesar de los esfuerzos de la industria farmacéutica para desarrollar fármacos anti-obesidad, los medicamentos que han llegado al mercado apenas producen efectos marginales en el peso corporal, y la mayoría han sido retirados debido a sus efectos secundarios. De hecho, actualmente sólo están aprobados, por la Agencia Americana del Medicamento, 5 fármacos de tratamiento a largo plazo de la obesidad, con efectos limitados (Daneschvar et al., 2016; Kahan, 2017; Omran, 2017). Las revisiones recientes del campo llegan a la conclusión de que 'la historia del desarrollo de fármacos frente a la obesidad está lejos de ser glorioso, con balas mágicas transitorias y sólo un puñado de agentes con licencia para uso clínico' (Rodgers et al., 2010; Rodgers et al., 2012).

En resumen, esta epidemia obesogénica conduce a una población con gran prevalencia de enfermedades crónicas, gastos asombrosos en atención y cuidado de la salud y la predicción de que, por primera vez, la generación actual tendrá una vida útil más corta que las generaciones anteriores (Olshansky et al., 2005; Cai et al., 2010; Hammond & Levine, 2010). Por tanto, existe una necesidad urgente de conocer más profundamente los entresijos de la obesidad, y establecer nuevas dianas para su tratamiento.

## **2. Tejido adiposo.**

### **2.1. Fisiología.**

El tejido adiposo es un reservorio calórico biológico que se expande en condiciones de sobrenutrición, y libera lípidos en respuesta al déficit energético. Los adipocitos representan el tipo celular mayoritario del tejido adiposo, y son los responsables de almacenar el exceso de energía en forma de triacilglicéridos (TAG), sin sufrir la lipotoxicidad de otras células en estas condiciones (Lelliot & Vidal-Puig, 2004; Konige et al., 2014).

## ***-Introducción-***

Hasta 1940, el tejido adiposo era considerado como un 'simple' tejido conectivo responsable de acumular lípidos, un tejido pasivo y hormonalmente inerte, con funciones bien conocidas, tales como almacenamiento de energía, protección mecánica y aislamiento térmico. Esta idea ha ido cambiando paulatinamente con el tiempo, según se iba demostrando la gran plasticidad y variabilidad de las células adiposas, su función endocrina, y su papel central en la homeostasis glucídica, lipídica y energética (Kershaw & Flier, 2004; Trayhurn, 2005; Rosen & Spiegelman, 2006; Scherer, 2006; Cinti, 2012; Haas et al., 2012; Lee et al., 2014; Rosen & Spiegelman, 2014). El tejido adiposo es capaz de expandirse y contraerse en respuesta a alteraciones del balance energético, pudiendo representar tan sólo el 5% del peso corporal en atletas, el 10-15% en adultos sanos, o hasta el 60% en obesos mórbidos (Fleck, 1983; Ortega et al., 2010). También en condiciones de equilibrio energético los adipocitos se renuevan frecuentemente, con aproximadamente un 10% de tasa de renovación anual (Spalding et al., 2008; Rigamonti et al., 2011).

### 2.2. Adipocitos.

El tipo celular mayoritario en el tejido adiposo son los adipocitos o células grasas. Todos los eucariotas, desde levaduras hasta el hombre, son capaces de acumular calorías en forma de gotas lipídicas, gracias a una serie de genes evolutivamente muy conservados (Kadereit et al., 2008). Sin embargo, únicamente los vertebrados tienen células especializadas en acumular lípidos: los adipocitos (Ottaviani et al., 2011), células morfológicamente diferentes debido a la presencia de grandes vesículas lipídicas rodeadas de una proteína específica llamada perilipina 1 o Plin1 (Greenberg et al., 1991).

Además, los adipocitos son células secretoras muy activas, produciendo proteínas (como la proteína estimuladora de acilación o ASP), hormonas (denominadas adipoquinas, como leptina, adiponectina, resistina, adiposina o visfatina) y citoquinas (IL6 y TFNa), con importantes funciones metabólicas, inmunológicas, inflamatorias, y vasculogénicas (Miner, 2004; Fantuzzi, 2005; Trujillo et al., 2006; Waki et al., 2007; MacLaren et al., 2008; Caspar-Bauguil et al., 2009; Sun et al., 2011; Rutkowski et al., 2015).

Se distinguen 3 tipos de adipocitos (**Figura 1**):

#### 2.2.1. Adipocitos blancos (grasa blanca, *white adipose tissue*, o WAT).

Presentan una única vesícula lipídica (uniloculares) que prácticamente ocupa todo el volumen celular. Constituyen el grueso del tejido adiposo en la mayoría de los animales, y su principal función es almacenar energía en forma de grasa y liberar adipoquinas para regular la homeostasis energética (Moreno-Navarrete & Fernández-Real, 2012; Sánchez-Gurmaches et al., 2016). La expansión de los depósitos de grasa blanca también protege a ciertos órganos, como músculo e hígado, de la lipotoxicidad (Deng & Scherer, 2010).

#### 2.2.2. Adipocitos marrones (grasa marrón/parda, *brown adipose tissue*, o

BAT).

Son células altamente especializadas, con numerosas vesículas rellenas de lípidos (multiloculares), y que se diferencian de los adipocitos blancos en presentar abundantes mitocondrias ricas en UCP1 (también llamada termogenina), una proteína específica de la grasa marrón (Cannon & Nedergaard, 2004; Berriel Diaz et al., 2014). Gracias a UCP1, la función de estas células no es acumular grasa como reserva energética, sino quemarla para generar calor: son capaces de disipar la energía química acumulada en forma de calor, siendo el principal tejido responsable de la termogénesis no-temblorosa (Rosen & Spiegelman, 2014; Sánchez-Gurmaches et al., 2016). Además de sus efectos termogénicos, tienen una gran capacidad de absorción de glucosa y lípidos, pudiendo normalizar la hiperglucemia y la hiperlipidemia (Arbeeny et al., 1995; Bartelt, 2011). En línea con su notable capacidad de oxidación de sustratos, la grasa marrón también se activa en respuesta al consumo excesivo de nutrientes, en un proceso denominado termogénesis inducida por dieta (Rothwell & Stock, 1983).

Los adipocitos marrones filogenéticamente sólo están presentes en mamíferos placentarios (Hayward & Lisson, 1992), se localizan en depósitos específicos en la región interescapular y perirrenal de roedores, y están altamente innervados y vascularizados (Bartness et al., 2010). Hasta hace unos años, se creía que la especie humana sólo presentaba adipocitos marrones en neonatos y bebés, presumiblemente para proporcionar calor en el ambiente frío que se encuentran al nacer. Sin embargo, en el 2007 se demostró, por primera vez y de forma fortuita, la existencia de depósitos de grasa marrón en adultos humanos, mediante análisis por tomografía por emisión de positrones (PET) (Nedergaard et al., 2007). Numerosísimos estudios posteriores corroboraron la presencia de adipocitos marrones positivos para UCP1 (UCP1+) en individuos adultos, y una correlación inversa entre la cantidad de BAT y el IMC, el porcentaje de grasa corporal, la edad y los niveles de glucosa en sangre (Cypess et al., 2009; Saito et al., 2009; van Marken Lichtenbelt et al., 2009; Virtanen et al., 2009; Pfannenbergl et al., 2010; Ouellet et al., 2011; Vijgen et al., 2011; Yoneshiro et al., 2011; Van der Lans et al., 2012; Vijgen et al., 2012; Chondronikola et al., 2014; Hanssen et al., 2015; Porter, 2017). Estas observaciones atrajeron el interés en la fisiología de la grasa marrón y en la búsqueda de dianas terapéuticas para incrementar la cantidad/actividad de BAT y combatir así la obesidad.

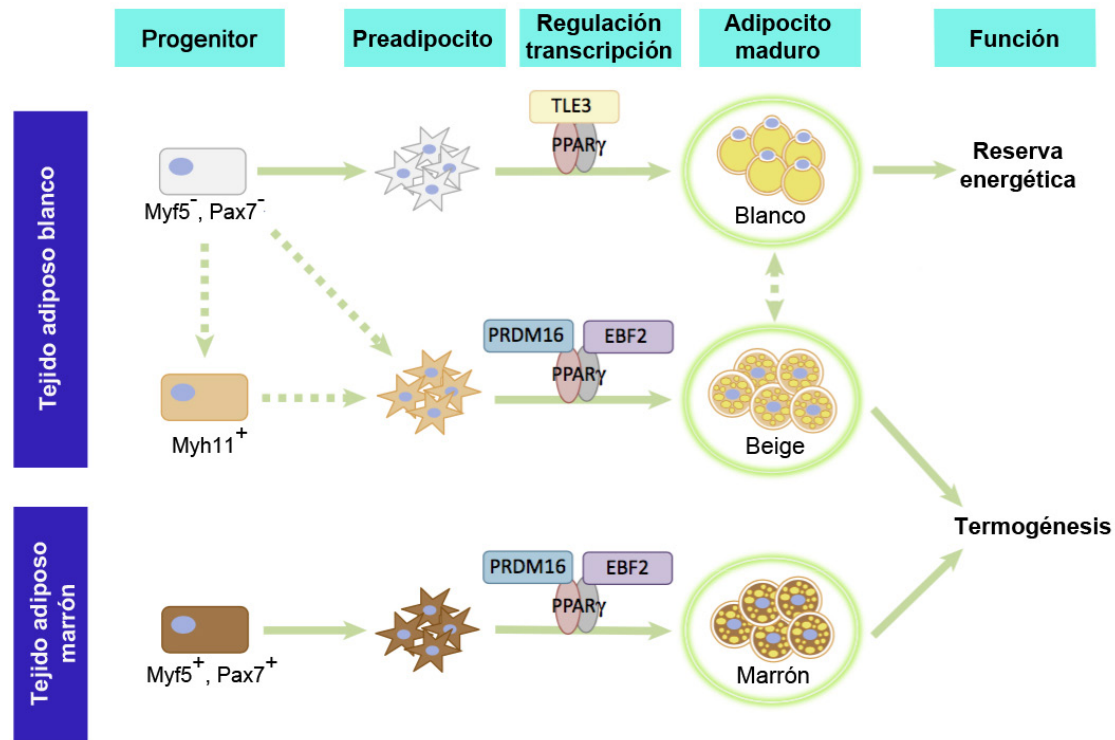
### 2.2.3. Adipocitos *beige* o *brite*.

Hace unos 30 años, ya se observó que una exposición prolongada al frío podía provocar, dentro de los depósitos de grasa blanca, la aparición de grupos de células multiloculares UCP1+ con morfología y fisiología similar al adipocito marrón (Young et al., 1984; Loncar et al., 1986; Loncar, 1991). Estas células están cobrando gran relevancia en la investigación en obesidad en los últimos años (Lee et al., 2012; Ohno et al., 2012; Wu et al., 2013). Su abundancia varía entre depósitos, siendo frecuentes en la grasa inguinal y retroperitoneal, y más escasos en grasa perigonadal. Los estudios sobre la expresión de UCP1 sugieren que un adulto sano posee un adipocito tipo ma-

## -Introducción-

rón disperso entre 100-200 adipocitos blancos viscerales (Oberkofler et al., 1997). La formación de este tipo de adipocitos en respuesta al frío se denomina 'pardeamiento' de la grasa blanca (o *browning*, en inglés).

Durante décadas, estas células estuvieron pobremente caracterizadas y se consideraban adipocitos marrones clásicos (Young et al., 1984; Cousin et al., 1992). Sin embargo, estudios más recientes han demostrado que el desarrollo de estas células inducibles está regulado por genes que no intervienen en la generación de adipocitos marrones (Xue et al., 2007), además de poseer un patrón de expresión génica distinto (Rosell et al., 2014). Por eso, actualmente se consideran como un tercer grupo de



**Figura 2. Los 3 tipos de adipocitos tienen orígenes distintos.** Los adipocitos blancos se forman a partir de la adipogénesis de precursores  $Myf5/Pax7^{-}$ . En cambio, la adipogénesis marrón tiene lugar en progenitores  $Myf5^{+}/Pax7^{+}$ ; y los adipocitos beige se forman gracias a células preadipocíticas  $Myh11^{+}$ . A pesar de la gran variabilidad de células precursoras, en todas ellas la cascada de transcripción adipogénica es muy similar, y está mediada principalmente por el factor de transcripción PPAR $\gamma$ . Éste es modulado por diversos cofactores, quienes determinan el carácter blanco o marrón de los adipocitos generados.

adipocitos: adipocitos *beige* o *brite* (***brown-like in white***), capaces también de contribuir a la termogénesis no-temblorosa (Young et al., 1984; Schulz et al., 2011; Sharp et al., 2012; Waldén et al., 2012; Wu et al., 2012; Keipert & Jastroch, 2014; Rosen & Spiegelman, 2014). Una diferencia notable entre los dos tipos de células (adipocitos marrones y *beiges*) es que los primeros expresan altos niveles de UCP1 y otros genes termogénicos ya en condiciones basales, mientras que los adipocitos *beiges* expresan estos genes sólo en respuesta a un estímulo, principalmente de tipo  $\beta$ 3-adrenérgico (Petrovic et al., 2010; Wu et al., 2013).

Se ha comprobado también que la pérdida selectiva de los adipocitos marrones clásicos da lugar a una inducción compensatoria de los adipocitos *beiges*, restaurándose

de este modo tanto la temperatura corporal como la resistencia a obesidad inducida por dieta, lo que sugiere funciones solapantes (Schulz et al., 2013). Sin embargo, la importancia relativa de ambos tipos de adipocitos en termogénesis aún no ha sido resuelta. Mientras algunos estudios defienden que los adipocitos marrones y *beiges* presentan niveles similares de UCP1, sugiriendo iguales capacidades termogénicas (Wu et al., 2012; Long et al., 2014), otros defienden que, en ratones expuestos al frío, la cantidad total de UCP1 en tejido completo es mucho menor en grasa subcutánea que en BAT, indicando una regulación diferencial entre ambos y que el grueso de la termogénesis ocurre en BAT (Shabalina et al., 2013). No obstante, sí está bien establecida una fuerte asociación inversa entre la capacidad de *browning* y la susceptibilidad a desarrollar obesidad inducida por la dieta (Guerra et al., 1998; Coulter et al., 2003; Seale et al., 2011). Múltiples estudios han demostrado también que la presencia de adipocitos *beiges* afecta positivamente a la regulación de la glucosa sanguínea, con importantes implicaciones en el tratamiento de la diabetes tipo 2 (Harms & Seale, 2013).

### 2.3. Depósitos grasos.

El tejido adiposo se desarrolla en múltiples localizaciones discretas formando depósitos específicos, cada uno con características propias y diferentes implicaciones metabólicas (Tchoukalova et al., 2010; Tchkonina et al., 2017). La clasificación más común distingue entre grasa subcutánea y visceral, en parte debido a que sólo esta última está directamente asociada con enfermedad metabólica (Lee et al., 2012; Lee et al., 2013; Tchernof & Després, 2013). La grasa subcutánea incluye la grasa axilar o anterior, la interescapular y la inguinal. Dentro de la grasa visceral, se incluyen numerosos depósitos como la grasa perigonadal, mesentérica y retroperitoneal, entre otros (Sánchez-Gurmaches et al., 2016). Los adipocitos marrones se encuentran en discretos depósitos estratégicamente situados en regiones con alta vascularidad sanguínea. En ratón, se encuentran en regiones interescapulares, subescapulares y cervicales (Cinti, 2005; Waldén et al., 2012; de Jong et al., 2015). En humanos, los fetos y los recién nacidos presentan BAT en regiones axilares, cervicales, perirrenales y periadrenales (Cannon & Nedergaard, 2004), mientras que en adultos sanos se detectan áreas de BAT metabólicamente activas en regiones cervical, supraclavicular, axilar y paravertebral (Nedergaard et al., 2007; Zingaretti et al., 2009; Frontini & Cinti, 2010; Sacks & Symonds, 2013; Vijgen et al., 2013; Borga et al., 2014).

Los adipocitos *beiges* son más abundantes en la grasa subcutánea inguinal (Vitali et al., 2012), pero también se observan en muchos otros depósitos blancos en respuesta al tratamiento en frío, incluyendo grasa epididimal, retroperitoneal, etc. (Himms-Hagen et al., 2000; Barbatelli et al., 2010; Cinti, 2012; Lee et al., 2012; Vitali et al., 2012). En humanos, se demostró *in vitro* que los preadipocitos blancos pueden diferenciarse a adipocitos *beiges* (Beranger et al., 2013; Gustafson et al., 2015; Lee et al., 2014) e, *in vivo*, se evidenció la presencia de adipocitos *beiges* en pacientes de feocromocitoma (tumores neuroendocrinos que generan altos niveles de señalización b-adrenérgica) (Frontini et al., 2013) y en adultos sanos (Cypess et al., 2013; Jespersen et al., 2013; Lidell et al., 2013; Shinoda et al., 2015; Sidossis et al., 2015; Chu & Gawronska-Kozak, 2017; Chu & Tao, 2017).

## **-Introducción-**

### 2.4. Regulación del metabolismo lipídico en los adipocitos.

El adipocito es como un banco: un lugar para almacenar el excedente (energético) en tiempos de abundancia (acumulándolo en forma de TAG = lipogénesis), y desde el cual se pueden retirar los ahorros (en forma de energía o calor) durante los tiempos de escasez (mediante la degradación de TAG = lipólisis). Los receptores b-adrenérgicos son las puertas a esta movilización (Collins, 2012). Así, la superficie de las gotas lipídicas de los adipocitos contiene proteínas estructurales y enzimas metabólicas específicas de este tipo celular (como Plin1), que responden a la estimulación b-adrenérgica y desencadenan la lipólisis (Brasaemle et al., 2004; Takahashi et al., 2013).

En épocas de exceso energético, la absorción de energía por los adipocitos está regulada principalmente por el papel anabólico de la insulina, mediando la absorción de glucosa y lípidos, la lipogénesis y la inhibición de la lipólisis (Wilcox, 2005). En este estado, la lipólisis está inhibida gracias a que Plin1 está secuestrando a CG1-58, el coactivador de la triacilglicerol lipasa adiposa (ATGL), la enzima limitante de la lipólisis (Brasaemle et al., 2007; Granneman & Moore, 2008; Lass et al., 2011).

En condiciones de déficit energético o ejercicio, el sistema nervioso central (SNC) coordina la respuesta b-adrenérgica en los distintos tipos de adipocitos para desencadenar la lipólisis (Collins & Surwit, 2001; Nielsen et al., 2014). Esta respuesta b-adrenérgica consiste en la liberación de catecolaminas [epinefrina y norepinefrina (NE)] para activar los receptores b-adrenérgicos  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  y  $\beta_3$ , todos ellos presentes en los adipocitos (Robidoux et al., 2004; Collins, 2012). Estos receptores b-adrenérgicos a su vez estimulan la adenilato ciclasa (Lafontan & Berlan, 1993), aumentando así los niveles intracelulares del segundo mensajero AMPc, y con ellos la actividad de la quinasa dependiente de AMPc (también llamada proteína quinasa A, o PKA) (Taylor et al., 2004; Zechner et al., 2005; Langin, 2006). PKA desencadena la lipólisis fosforilando a Plin1, dando lugar a la liberación de CG1-58 y la activación de ATGL (Brasaemle et al., 2004; Lass et al., 2006; Brasaemle, 2007; Bickel et al., 2009; Granneman et al., 2009), y a la lipasa sensible a hormonas (HSL), activándola (Lass et al., 2011). La ATGL es responsable de hidrolizar el primer ácido graso de los TAG, dando lugar a diacilglicéridos (DAG), hidrolizados por HSL. Los monoacilglicéridos (MAG) resultantes son hidrolizados por la MAG lipasa (Prentki & Madiraju, 2008; Zechner et al., 2012), generando ácidos grasos libres (*free fatty acid*, FFA) y glicerol, que son liberados a sangre para su utilización sistémica como combustible energético (Granneman et al., 2009; Kolditz & Langin, 2010; Lass et al., 2011; Collins, 2012).

En respuesta al frío, el SNC desencadena la termogénesis no-temblorosa activando la misma ruta b-adrenérgica, pero en esta situación los FFA son utilizados por los adipocitos marrones y *beiges* como combustible termogénico y activadores de UCP1 (Collins & Surwit, 2001; Cannon & Nedergaard, 2004).

### 3. Diferenciación de adipocitos o adipogénesis.

#### 3.1. Células precursoras.



Además de adipocitos, los tejidos adiposos contienen preadipocitos, células vasculares, endoteliales, nervios, macrófagos y fibroblastos (Cinti, 2005).

Los adipocitos se generan a partir de preadipocitos, los cuales proceden a su vez de células madre mesenquimales (MSCs), presentes aún en edad adulta (Rodeheffer et al., 2008; Tang et al., 2008). Los preadipocitos se encuentran dentro de lo que normalmente se conoce como SVF o fracción vascular estromal (Cawthorn et al., 2012; Berry & Rodeheffer, 2013). Dentro de la SVF, los preadipocitos son las únicas células adherentes, lo que permite su aislamiento *in vitro* (Zuk et al., 2001; Lin et al., 2010). El único marcador específico de preadipocitos es Pref1 (también llamado DLK1), de expresión muy alta en preadipocitos blancos y marrones, que inhibe la adipogénesis y disminuye drásticamente con la diferenciación (Villena et al., 2002; Wang et al., 2010; Hudak & Sul, 2013).

Hasta hace unos años, se asumía que los adipocitos blancos y marrones procedían de las mismas células precursoras. Sin embargo, recientemente se ha visto que no es así (**Figura 2**). Primero, se demostró que el perfil de expresión génica de los preadipocitos marrones se asemejaba mucho más al perfil de células musculares esqueléticas que al de preadipocitos blancos (Timmons et al., 2007). Luego, se evidenció que el músculo esquelético y los adipocitos marrones comparten un precursor común Pax7+/Myf5+ (Seale et al., 2008; Lepper & Fan, 2010), siendo el factor de transcripción PRDM16 el responsable de que estas células precursoras tomen el destino de adipocito marrón (Seale et al., 2008; Frühbeck et al., 2009; An et al., 2017). Los adipocitos blancos presentan otro origen, pues proceden de células madre perivasculares Pax7-/Myf5- (Tang et al., 2008; Zannettino et al., 2008; Cawthorn et al., 2012; Gupta et al., 2012). Pero además, los distintos depósitos adiposos blancos se generan a partir de precursores diferentes, ya que varían en cuanto a su cronología de aparición (Gesta et al., 2007), y existen diferencias en el patrón de expresión génica tanto entre adipocitos maduros como entre preadipocitos aislados de distintos depósitos (Gesta et al., 2006; Tchkonina et al., 2006; Tchkonina et al., 2007; Tchkonina et al., 2013). Por último, los adipocitos *beiges* no proceden de precursores Pax7+/Myf5+ (Seale et al., 2008; Waldén et al., 2012; Wu et al., 2012), sino que, al menos parte de estos adipocitos *beiges*, comparten precursores Myh11+ con el músculo liso (Long et al., 2014). La diferenciación de estos precursores a adipocitos *beiges* está guiada, de nuevo, por PRDM16 (Seale et al., 2011).

### 3.2. Regulación de la adipogénesis.

La adipogénesis es el proceso mediante el cual los preadipocitos, células de morfología fibroblástica, se diferencian a adipocitos maduros cargados de lípidos y sensibles a insulina (Lefterova & Lazar, 2009). Puede ser estudiada *in vitro* mediante la diferenciación de distintas células con características preadipocitarias (Moreno-Navarrete & Fernández-Real, 2012): líneas celulares de preadipocitos (3T3-L1, Ob17...), células desdiferenciadas procedentes de adipocitos maduros (células DFAT), células madre mesenquimales (células C3H10T1/2), células progenitoras derivadas del tejido adiposo (SVFs o preadipocitos) y fibroblastos embrionarios murinos (MEFs). En todos ellos se desencadena la misma cascada de transcripción adipogénica, idéntica a la

## ***-Introducción-***

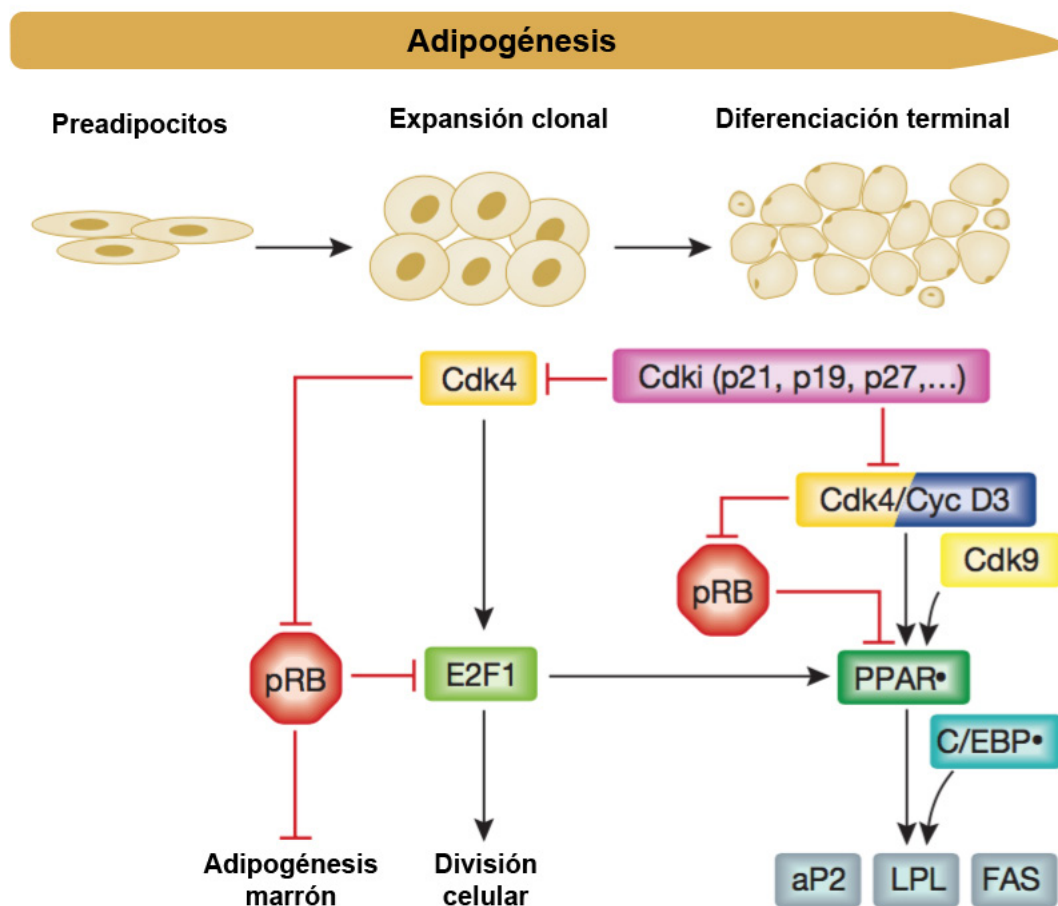
que tiene lugar *in vivo* (Hansen & Kristiansen, 2006; Rosen & Spiegelman, 2010). Los precursores preadipocíticos deben estar quiescentes antes de comenzar la diferenciación, por lo que, *in vitro*, se diferencian una vez alcanzan la confluencia y dejan de proliferar (Niemelä et al., 2008). La diferenciación se induce con un *cocktail* hormonal establecido ya en los años 80 y que, desde entonces, se utiliza unánimemente en todos los estudios de adipogénesis (Green & Kehinde, 1975; Rubin et al., 1978). Este *cocktail* (comúnmente denominado MDI) consiste en la combinación de isobutilmetilxantina (IBMX, un inhibidor de la fosfodiesterasa de AMPc, que estimula la ruta PKA), dexametasona (DXM, un glucocorticoide sintético), insulina, y suero fetal bovino (Student et al., 1980; Wu et al., 1996; Rosen & MacDougald, 2006; Niemelä et al., 2008).

La adipogénesis consta de 3 etapas principales (quiescencia, expansión clonal y diferenciación terminal) orquestadas por una cascada transcripcional que implica, entre otros, al receptor nuclear PPAR $\gamma$  y a la familia de factores de transcripción CEBPs (Rosen, 2005; Farmer, 2006; Lefterova & Lazar, 2009; Lefterova et al., 2014), y que está fina y temporalmente regulada a lo largo del proceso adipogénico (Choi et al., 2014). El principal regulador de la formación de células grasas es el factor de transcripción PPAR $\gamma$ , un receptor nuclear tan potente que es capaz de conducir la adipogénesis en fibroblastos y mioblastos, y el único factor necesario y suficiente por sí mismo para desencadenar la adipogénesis *in vitro* e *in vivo* (Tontonoz et al., 1994; Hu et al., 1995; Barak et al., 1999; Rosen et al., 1999; Jones et al., 2005; Lehrke & Lazar, 2005; Farmer, 2006; Rosen & MacDougald, 2006; Kajimura et al., 2008; Tontonoz & Spiegelman, 2008; Tontonoz & Spiegelman, 2008; Wang et al., 2013; Lefterova et al., 2014). Tras la unión de su agonista, PPAR $\gamma$  se transloca al núcleo y promueve la transcripción de los genes adipogénicos, pudiendo ser regulado por multitud de coactivadores y correpresores (Farmer, 2005; Grygiel-Górniak, 2014; Lefterova et al., 2014).

La familia de factores de transcripción CEBPs incluye 5 miembros (CEBP $\alpha$ , CEBP $\beta$ , CEBP $\delta$ , CEBP $\gamma$  y CHOP). Los 3 primeros participan positivamente en adipogénesis: una oleada inicial de CEBP $\beta$  y CEBP $\delta$  promueve la expresión de CEBP $\alpha$  y PPAR $\gamma$  (Farmer, 2005; Otto & Lane, 2005; Farmer, 2006). CEBP $\gamma$  y CHOP parecen suprimir la adipogénesis, quizás a través de la unión e inactivación de CEBP $\beta$  (Darlington et al., 1998). CEBP $\beta$  y CEBP $\delta$  se expresan en respuesta a estímulos hormonales (Ntambi & Kim, 2000; Ramji & Foka, 2002): CEBP $\beta$  inducido por DXM (Wu et al., 1996; Smas et al., 1999; Ayala-Summano et al., 2013), y CEBP $\delta$  inducido por IBMX (Cao et al., 1991). Sin inducción hormonal, Pref1 promueve la expresión de Sox9, y éste se une a los promotores de los genes CEBP $\beta$  y CEBP $\delta$ , reprimiendo su transcripción (Wang & Sul, 2009; Wang et al., 2010). CEBP $\beta$  y CEBP $\delta$  comienzan a acumularse en las primeras 24 horas tras la inducción, y gracias a ello las células re-entran en ciclo y sufren la expansión clonal, de forma sincrónica (Tang et al., 2003; Guo et al., 2015). Además, tanto CEBP $\beta$  como CEBP $\delta$  inducen directamente la expresión de PPAR $\gamma$  y CEBP $\alpha$  (Tang et al., 2005), entre los cuales se produce una retroalimentación positiva que dispara la diferenciación terminal (Wu et al., 1999; Rosen et al., 2002). Ellos solos, o en colaboración con otros factores, inducen la transcripción de genes que determinan y mantienen el fenotipo del adipocito (Gregoire et al., 1998): sensibilidad a la insulina, lipogénesis, lipólisis, transporte de glucosa (GLUT4), expresión de las proteínas de unión a ácidos grasos (FABP4, también llamada aP2), lipoproteína lipasa (LPL), ATGL,

expresión de adipocinas como adiponectina, leptina... (Lefterova et al., 2008; Nielsen et al., 2008; Lefterova & Lazar, 2009; Lowe et al., 2011).

Éstos son los factores adipogénicos más importantes, pero se han descrito muchísimos otros que participan en este proceso. La lista es inabarcable: STATs, SREBP1, CREB, EPAS1, FoxA2, FoxC2, ETO, IGF1, factor estimulante de macrófagos, prostaglandinas, corticoides, citoquinas proinflamatorias, autofagia, KLFs, Wnts, Bma1, EBF1, TGFb, IRF3/4, EGR2, CLOCK, los factores GATA, miRNAs... (Rosen & MacDougald, 2006; Lefterova & Lazar, 2009; Singh et al., 2009; Lowe et al., 2011; Moreno-Navarrete & Fernández-Real, 2012; Ali et al., 2013). Existen además coactivadores y correpresores de PPAR $\gamma$ , y proteínas que modulan su actividad mediante modificaciones post-traduccionales: HIC5, TAZ, TIP1/3, RBP1, PER2, SIRT1/2, FoxO1, TCF4, SMRT, MAPK, SUMO1, FKBP51, SRC1/2/3, TRAP, ARF6, MBF1, NRF2... (Miard & Fajas, 2005; Rosen & MacDougald, 2006; Cristancho & Lazar, 2011; Lowe et al., 2011; Floyd



**Figura 3.** Los reguladores de ciclo presentan importantes funciones pro/antiadipogénicas. Múltiples proteínas implicadas en el control del ciclo celular tienen un importante papel fisiológico en la formación del tejido adiposo. Simplificando, aquellos factores pro-proliferativos promueven la adipogénesis al estimular la expansión clonal; mientras que los anti-proliferativos la inhiben. Además, muchos de estos factores, como la proteína Retinoblastoma (pRB) o diversas Cdk, también participan en el control de la diferenciación terminal.

& Stephens, 2012; Kim et al., 2013; Lee & Ge, 2014; Stechschulte et al., 2016).

### 3.3. Importancia de la ruta PI3K/AKT/mTOR/FoxO1 en adipogénesis.

## ***-Introducción-***

La insulina desencadena la activación de una cascada transcripcional compleja con distintas funciones fisiológicas. Muy resumidamente, IGF1 y la insulina, al unirse a sus receptores (IGF1R, e IR, respectivamente) conducen la activación de los sustratos del receptor de insulina (IRS). Las proteínas IRS (IRS1-4) activan a la quinasa PI3K, que cataliza la fosforilación de PIP2 (fosfatidilinositol bifosfato) a PIP3 (fosfatidilinositol trifosfato). PIP3 acaba activando a la quinasa AKT (también llamada PKB), que actúa como mediador de gran parte de los efectos metabólicos de la insulina (Whiteman et al., 2002; Song et al., 2012). La fosfatasa PTEN se opone a la actividad de PI3K, al desfosforilar e inactivar a PIP3 (Maehama & Dixon, 1998; Sun et al., 1999; Jiang & Zhang, 2002; Chalhoub & Baker, 2009; Worby & Dixon, 2014).

La ruta de la insulina participa en las primeras etapas de la adipogénesis principalmente a través de la señalización por IGF1R, ya que los preadipocitos expresan muchos más receptores para IGF1 que para insulina, aunque esta ratio se invierte durante la diferenciación (Smith et al., 1988; Back & Arnqvist, 2009). Esta ruta es esencial para la supervivencia de los preadipocitos (Boucher et al., 2010) y la adipogénesis blanca y marrón (Bluher et al., 2002; Laurstsen et al., 2002; Tseng et al., 2004; Boucher et al., 2012), al igual que los principales efectores de esta ruta: PI3K, mTOR y AKT (Garofalo et al., 2003; George et al., 2004; Kim & Chen, 2004; Zhang et al., 2009; Shearln et al., 2016). Pero no sólo es importante para la adipogénesis, sino también para la termogénesis (Boucher et al., 2012), y para la función de los adipocitos maduros: su inactivación en adipocitos blancos y marrones maduros genera resistencia a insulina, intolerancia a la glucosa, hepatoesteatosis e intolerancia al frío.

La ruta PI3K/AKT promueve la adipogénesis y la termogénesis mediante numerosos mecanismos distintos, entre los que destacan:

- 1) La inhibición de necdin, un inhibidor de E2F y de la adipogénesis (Tseng et al., 2005; Cypess et al., 2011).
- 2) La fosforilación y activación de CREB, un factor adipogénico (Reusch et al., 2000; Klemm et al., 2001; Tseng et al., 2005; Cypess et al., 2011).
- 3) La fosforilación y exclusión nuclear de GATA2, también un inhibidor adipogénico (Menghini et al., 2005).
- 4) La estimulación de la traducción de Skp2, necesario para la expansión clonal (Nogueira et al., 2012).
- 5) La activación de mTORC1 (Zhang et al., 2009).
- 6) La fosforilación y exclusión nuclear de FoxO1 (factor antiproliferativo), que inhibe su actividad hasta que finaliza la expansión clonal (Zhang et al., 2002; Nakae et al., 2003; Cypess et al., 2011).

Esta ruta juega un papel muy complejo en adipogénesis y termogénesis, con una regulación muy fina. Así, tanto la hiperactivación como la supresión total de algunos

efectores de esta ruta (FoxO1, mTORC1) conducen a una menor adipogénesis y aumento termogénico (Zou et al., 2014; Magdalon et al., 2016).

En cuanto a la fosfatasa PTEN, no sólo juega un papel muy importante en la fisiopatología del cáncer y el envejecimiento, sino también en obesidad al inhibir la adipogénesis (Song et al., 2012; Ortega-Molina & Serrano, 2013). PTEN suprime la señalización de la insulina y la captación de glucosa en adipocitos (Tang et al., 2005). La sobreexpresión suprafisiológica de PTEN reduce *in vitro* la adipogénesis y la reprograma hacia la formación de adipocitos de tipología marrón, mediante la estabilización y activación de FoxO1 (que dispara la transcripción de PGC1a y UCP1), e *in vivo* produce ratones con un BAT hiperactivo, mayor gasto energético, protegidos frente a obesidad y síndrome metabólico (García-Cao et al., 2012; Ortega-Molina et al., 2012). La inhibición total o parcial de PI3K genera fenotipos similares (Becattini et al., 2011; Kobayashi et al., 2011; Foukas; et al., 2013 Perino et al., 2014; Ortega-Molina et al., 2015). La delección específica de PTEN en el linaje Myf5+ (por tanto, eliminando PTEN en músculo y BAT, pero no en WAT) da lugar a ratones con lipodistrofia, con depósitos de BAT de mayor tamaño y sin apenas WAT visceral (Sánchez-Gurmaches et al., 2012). Además, se ha demostrado una fuerte asociación entre la hiperactivación de la señal PI3K, debido a una haploinsuficiencia de PTEN, y la obesidad en humanos (Pal et al., 2012).

### 3.4. Relación entre las rutas b-adrenérgica y PI3K/AKT en adipocitos.

En adipocitos, la ruta b-adrenérgica y la ruta de la insulina se inhiben mutuamente en numerosos puntos (Jost et al., 2002). Por ejemplo, la estimulación b-adrenérgica reduce tanto los niveles de IRS1 y IRS2 como la actividad de AKT (Klein et al., 1999); y la insulina provoca una caída en los niveles de receptores adrenérgicos  $\beta_3$  (Fève et al., 1994), e inhibe la estimulación b-adrenérgica de UCP1 (Klein et al., 2000).

### 3.5. Reguladores de ciclo y adipogénesis.

Uno de los acontecimientos más tempranos en la adipogénesis es una breve oleada proliferativa (denominada expansión clonal) seguida por una parada del ciclo celular y la diferenciación terminal (Fajas, 2003; Tang et al., 2003; Lefterova & Lazar, 2009; Chavey et al., 2013). La expansión clonal es esencial para la adipogénesis de preadipocitos 3T3-L1 (Reichert & Eick, 1999) y MEFs (Tang et al., 2003), y juega un papel muy relevante en la adipogénesis humana tanto *in vitro* como *in vivo* (Entenmann & Hauner, 1996; Jefcoate et al., 2008; Rodríguez-Acebes et al., 2010; Márquez et al., 2017). Así, los inhibidores de la proliferación como U0126 (inhibidor de MEK quinasa), roscovitina (inhibidor de la actividad Cdk), afidicolina (inhibidor de la síntesis de DNA) o rapamicina (inhibidor de mTORC1) inhiben la expansión clonal y la adipogénesis *in vitro* (Reichert & Eick, 1999; Tang et al., 2003; El-Chaar et al., 2004; Li et al., 2007).

La expansión clonal supone la transición  $G_1$ -S, lo que confiere a los reguladores de ciclo importantes funciones pro/antiadipogénicas (**Figura 3**). La transición  $G_1$ -S depende de la reactivación de los complejos Cdk/ciclina de  $G_1$  y  $G_1$ -S (Cdk 4 y 6, cuya

## **-Introducción-**

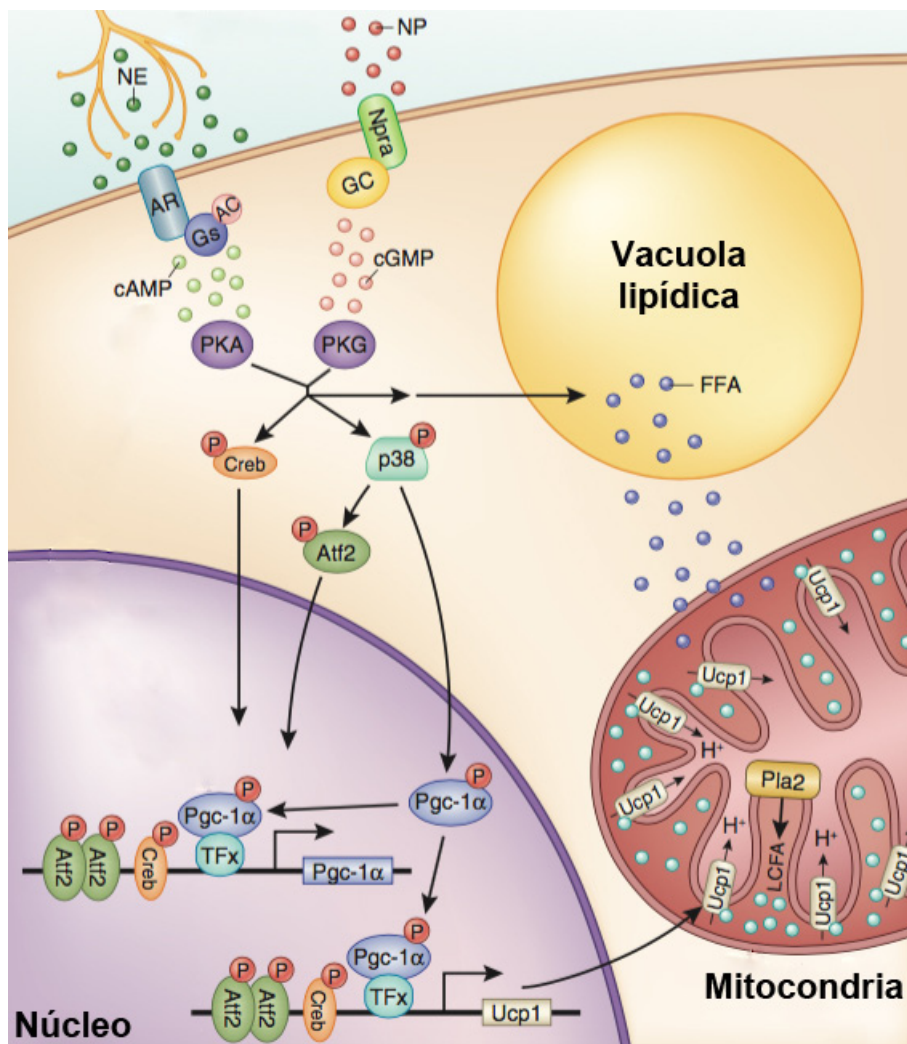
actividad quinasa depende de su unión a ciclinas tipo D; y Cdk2, mediante su interacción con ciclina E) (Matsushime et al., 1992; Malumbres & Barbacid, 2005). De hecho, con la estimulación hormonal adipogénica se produce la inducción de las ciclinas D y la degradación de p27 y p21 [inhibidores de la actividad Cdk, o CKIs (Harper et al., 1993; Polyak et al., 1994)], resultando en la activación de Cdk2 y Cdk4 (Phelps & Xiong, 1998; Tang et al., 2003). Así, varios trabajos han puesto de manifiesto el papel de Cdk4 y Cdk6 (Abella et al., 2005; Sarruf et al., 2005) y las ciclinas de tipo D (Wang et al., 2003; Fu et al., 2005; Sarruf et al., 2005) promoviendo la expansión clonal, además del papel negativo de factores inhibidores de la actividad Cdk, como p27 (Morrison & Farmer, 1999; Patel & Lane, 2000). La transición  $G_1$ -S también depende de la ruta E2F-Retinoblastoma (Rb): en  $G_1$ , los factores de transcripción E2F (E2F1-8), encargados de disparar la entrada en fase S, están inactivados debido a la interacción con Rb (Nevins, 1992; Dyson, 1998; Nguyen & McCance, 2005; van den Heuvel & Dyson, 2008). Por ello, Rb debe ser fosforilado por la actividad Cdk para permitir la liberación de E2F, la expresión de sus genes diana y la entrada en fase S (Richon et al., 1997; Attwooll et al., 2004; Dimova & Dyson, 2005). Así, varios estudios han demostrado un papel dual de Rb en adipogénesis:

1) Durante la expansión clonal, Rb está mayoritariamente hiperfosforilado y, por tanto, inactivo (Hansen et al., 2004). La fracción de Rb que permanece activa inhibe esta etapa al secuestrar a E2F, y la diferenciación mediante la formación del complejo PPAR $\gamma$ -Rb-HDAC3, inhibiendo a PPAR $\alpha$  (Fajas et al., 2002).

2) Más tardíamente, Rb se activa y permite la salida de ciclo (Richon et al., 1997; Hansen et al., 2004), además de estimular la diferenciación terminal gracias a la activación de CEBP $\beta$  (Chen et al., 1996; Cole et al., 2004; Hansen et al., 2004; Scime et al., 2005). De hecho, la delección o inhibición de Rb suprime la diferenciación terminal de la adipogénesis, mientras que su sobreexpresión la promueve (Higgins et al., 1996; Classon et al., 2000). *In vitro*, el bloqueo adipogénico en ausencia de Rb se supera mediante el tratamiento con agonistas de PPAR $\gamma$ , generando adipocitos con altos niveles del factor de transcripción FoxC2, que confiere a los mismos un marcado carácter marrón, más mitocondrias y mayores niveles de UCP1 (Ross et al., 1992; Hansen et al., 1999; Hansen et al., 2004; Hakim-Weber et al., 2011).

Skp2 es otro factor importante en la progresión del ciclo celular, ya que forma parte del complejo SCF<sup>Skp2</sup>, una E3 ubiquitina-ligasa que dirige la degradación por el proteasoma de p27 y p21, entre otras (Zhang et al., 1995; Carrano et al., 1999; Sutterluty et al., 1999; Tsvetkov et al., 1999; Nakayama et al., 2004; Nakayama & Nakayama, 2005). SCF<sup>Skp2</sup> también ubiquitina y promueve la degradación de FoxO1, en un mecanismo dependiente de la fosforilación de FoxO1 por la ruta PI3K/AKT (Huang et al., 2005). Mediante la degradación de FoxO1 [que promueve la transcripción de p27 (Medema et al., 2000; Ramaswamy et al., 2002)], Skp2 también regula negativamente los niveles de estos inhibidores de Cdk. En consonancia, se ha comprobado que la delección de Skp2 *in vivo* inhibe la adipogénesis (Cooke et al., 2007) y el incremento en hiperplasia y la resistencia a insulina en ratones con tendencia a obesidad (Sakai et al., 2007).

La expresión sostenida de p21 o p27, inhibidores de la actividad Cdk, genera una parada del ciclo celular (el-Deiry et al., 1993; Harper et al., 1993; Hunter, 1993; Xiong et al., 1993; Noda et al., 1994; Polyak et al., 1996; Morrison & Farmer, 1999; Sherr & Roberts, 1999), por lo que *in vitro* actúan como un factor antiadipogénico: se necesita su degradación, estimulada por la inducción hormonal, para permitir la entrada en fase S (expansión clonal), y sus niveles se incrementan durante la diferenciación terminal (Morrison & Farmer, 1999; Spiegelman & Flier, 2001; Nakae et al., 2003; Tang & Otto, 2003; Sakai et al., 2007). Sin embargo, *in vivo* los resultados son contradicto-



**Figura 4. Principales efectores de la ruta β-adrenérgica participantes en la regulación de la termogénesis.** La activación β-adrenérgica iniciada por la acción de las catecolaminas (como norepinefrina, NE) desencadena una compleja cascada de señalización que termina por estimular la expresión y activación de PGC1α y UCP1, principales efectores de la termogénesis.

rios. Por una parte, algunos estudios indican que la delección constitutiva individual o combinada de p21 y p27 da lugar a ratones obesos (Naaz et al., 2004). En cambio, otros estudios muestran que la delección de p21 genera ratones protegidos frente a la obesidad inducida por dieta, con menores depósitos grasos y mayor sensibilidad a insulina (Inoue et al., 2008), y que la delección de p27, a pesar de mostrar una adipogénesis alterada, no genera diferencias en el tamaño de los depósitos grasos (Lin et al., 2003).

## ***-Introducción-***

Una vez finalizada la expansión clonal, las células vuelven a salir de ciclo y abordan la diferenciación terminal (Scott et al., 1982; Fajas, 2003; Niemelä et al., 2008). Esta transición se lleva a cabo gracias a PPAR $\gamma$  y CEBP $\alpha$  (Lefterova & Lazar, 2009).

CEBP $\alpha$  tiene actividad antimitótica, inhibiendo la actividad Cdk y uniéndose e inactivando a E2F (Porse et al., 2001; Johnson, 2005). PPAR $\gamma$  promueve la fosforilación e inactivación de E2F (Altiok et al., 1997). Además, PPAR $\gamma$  y CEBP $\alpha$  pueden promover la salida de ciclo estimulando la transcripción de inhibidores de Cdk (CKIs) como p21 y p27 (Morrison & Farmer, 1999; Timchenko et al., 1999).

Además, los reguladores de ciclo también participan en la diferenciación adipogénica mediante mecanismos independientes de la expansión clonal:

- 1) Durante la expansión clonal, el complejo Cdk2-ciclina A fosforila y activa a CEBP $\beta$ , impulsando la diferenciación terminal (Li et al., 2007).
- 2) Cdk4 también interacciona y activa a PPAR $\gamma$ , pero no mediante fosforilación directa. Su delección *in vivo* genera ratones con menor peso corporal y depósitos grasos más pequeños (Abella et al., 2005).
- 3) Cdk5 fosforila a PPAR $\gamma$ , sin alterar su capacidad adipogénica ni *in vitro* ni *in vivo*, pero desregulando la expresión de un gran número de genes implicados en obesidad (Choi et al., 2010; Choi et al., 2010; Choi et al., 2011; Banks et al., 2015).
- 4) Cdk6 se une y fosforila a PPAR $\gamma$ , aumentando su actividad transcripcional y, por tanto, promoviendo la adipogénesis (Sarruf et al., 2005).
- 5) Cdk7 fosforila e inactiva a PPAR $\gamma$  (Helenius et al., 2009).
- 6) Cdk9 favorece la adipogénesis mediante la fosforilación y activación de PPAR $\gamma$  (Iankova et al., 2006).
- 7) E2F1 promueve la adipogénesis induciendo la expresión de PPAR $\gamma$  (Fajas et al., 2002).
- 8) E2F4 inhibe la expresión de PPAR $\gamma$  y la adipogénesis (Fajas et al., 2002; Landsberg et al., 2003).
- 9) La ciclina D1 reprime la actividad de PPAR $\gamma$  mediante el reclutamiento de HDAC (histona deacetilasa) a los promotores de genes dianas de PPAR $\gamma$  (Fu et al., 2005).
- 10) La ciclina D3 promueve la adipogénesis a través de la activación de PPAR $\gamma$ , y su delección *in vivo* genera ratones con resistencia a obesidad inducida por dieta, mayor tolerancia a la glucosa y adipocitos más pequeños (Sarruf et al., 2005).

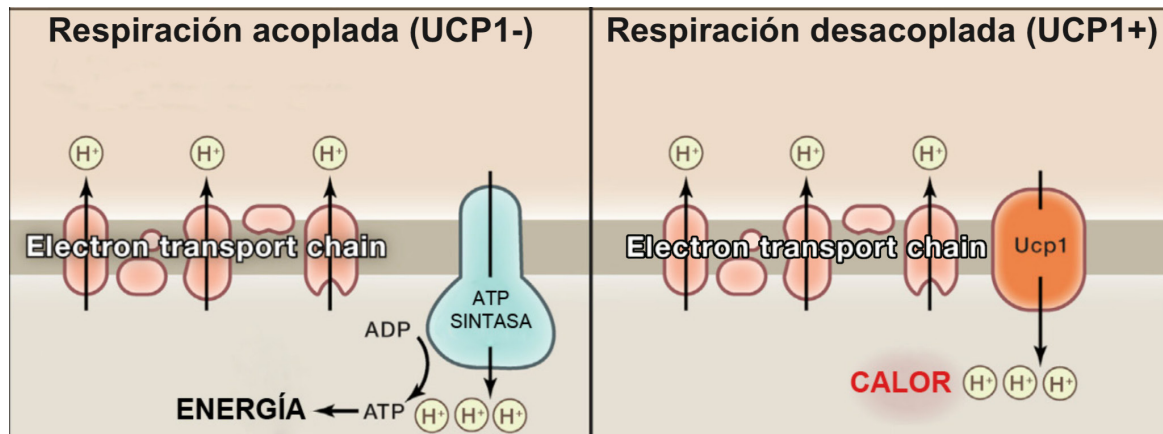
### **4. Termogénesis no-temblorosa en adipocitos marrones y *beiges*.**

#### **4.1. Introducción.**

Como animales endodermos, los humanos producimos nuestro propio calor corporal y podemos regular nuestra temperatura, siendo el hipotálamo el centro coordinador de esta termorregulación (Tansey & Johnson, 2015). El organismo presenta diversos mecanismos para compensar un descenso en la temperatura corporal, destacando la termogénesis no-temblorosa.



La termogénesis no-temblorosa es crucial para el mantenimiento de la temperatura corporal en mamíferos (Heldmaier, 1971). Se lleva a cabo gracias a la proteína UCP1 presente en la grasa marrón (Cannon & Nedergaard, 2004; Kajimura et al., 2015; Sidossis & Kajimura, 2015) y en los adipocitos *beiges* (Rosenwald et al., 2013; Schulz et al., 2013; Shabalina et al., 2013; Kajimura et al., 2015; Sidossis & Kajimura, 2015).



**Figura 5. Actividad de UCP1.** UCP1, proteína de la mitocondria interna, es una desacoplante mitocondrial que disipa el potencial de membrana y convierte la energía química del gradiente de protones en energía térmica, en calor. En células UCP1-, la actividad de la cadena respiratoria genera un gradiente electroquímico de protones a ambos lados de la membrana mitocondrial, que es aprovechado por la ATP sintasa para generar ATP. Sin embargo, en las células UCP1+, la actividad de la cadena respiratoria está desacoplada de la síntesis de ATP, ya que el gradiente protoquímico es disipado por UCP1 de forma pasiva, y la energía acumulada se libera en forma de calor.

Además del frío, otro potente inductor de la termogénesis no-temblorosa es la ingesta calórica excesiva, en la denominada 'termogénesis inducida por dieta' (Rothwell & Stock, 1983), y la incapacidad de utilizar esta estrategia para eliminar el exceso calórico induce la aparición de obesidad (Feldmann et al., 2009).

Aunque UCP1 está establecido como el componente más importante en termogénesis, él por sí solo no puede explicar completamente toda la respuesta termogénica. Los ratones deficientes en UCP1 sólo desarrollan obesidad en condiciones de termoneutralidad (Feldmann et al., 2009), y se pueden adaptar a una exposición crónica al frío cuando la transición térmica es gradual (Golozoubova et al., 2001). Esto sugiere la existencia de otros mecanismos de termogénesis independientes de UCP1, que compensan parcialmente su ausencia (Ukropec et al., 2006; Meyer et al., 2010). Así, se han descrito dos mecanismos de termogénesis no-temblorosa que cursan sin la participación de UCP1: en músculo, la sarcolipina desacopla la hidrólisis de ATP del transporte de  $\text{Ca}^{2+}$ , dando lugar a un ciclo fútil que genera calor (Bal et al., 2012); los adipocitos *beiges* presentan mecanismos adicionales de termogénesis basados en un ciclo fútil de creatina quinasa (Kazak et al., 2015; Reilly & Saltiel, 2015; Szabo & Zoratti et al., 2017).

#### 4.2. Regulación de la termogénesis no-temblorosa y el *browning*.

Un área de estudio de particular crecimiento en los últimos años es la regulación fisiológica de la termogénesis en adipocitos *beiges* y marrones. La termogénesis es un proceso extremadamente costoso energéticamente, por lo que está altamente regu-

## ***-Introducción-***

lado (Porras & Benito, 2002; Whittle et al., 2011; Harms & Seale, 2013). El SNC tiene gran importancia en esta regulación, con áreas hipotálamicas y extrahipotálamicas como integradoras de la respuesta al frío (Chechi et al., 2013; Bartness & Ryu, 2015; Contreras et al., 2015; Labbé et al., 2015). El tejido marrón está innervado por axones que liberan NE como neurotransmisor y activan sus receptores  $\beta_3$ -adrenérgicos, estimulando la termogénesis (Trayhurn & Ashwell, 1987; Cannon & Nedergaard, 2004). Además, en condiciones fisiológicas en las que se requiere la termogénesis no-temblosa, también se induce la formación de nuevos adipocitos marrones (adipogénesis marrón) y *beiges* (*browning*), incrementando la masa total de células termogénicas (Bukowiecki et al., 1986; Cannon & Nedergaard, 2004; Rosenwald et al., 2013; Lee et al., 2015). Por tanto, los mecanismos de regulación de la termogénesis y del *browning* son prácticamente idénticos.

La señalización b-adrenérgica induce la expresión de UCP1, mediada por una cascada de señalización iniciada por la unión de las catecolaminas a los receptores b-adrenérgicos de los adipocitos (Ricquier et al., 1986, Collins, 2012) (**Figura 4**). La NE liberada por las terminales simpáticas se unen a los receptores adrenérgicos  $\beta_3$  e incrementan los niveles intracelulares de AMPc, activando a PKA e induciendo la lipólisis y la activación de PPAR $\alpha$  (Collins, 2011; Bartelt & Heeren, 2012) y CREB (Yubero et al., 1998), ambos factores de transcripción que promueven la expresión de UCP1 y otros genes termogénicos (Zhang et al., 2016). PKA también fosforila y activa a p38MAPK, que indirectamente dispara la expresión de UCP1 (Collins et al., 2004; Robidoux et al., 2005; Gauthier et al., 2008; Omar et al., 2009) mediante la fosforilación activadora de factores de transcripción como PGC1a (Cao et al., 2004), Zfp516 (Dempersmier et al., 2015), ATF2 (Cao et al., 2004) y CREB (Mayr & Montminy, 2001).

Sin embargo, los receptores adrenérgicos  $\beta_3$  no son esenciales para el *browning* del tejido adiposo, lo que sugiere la compensación por otras rutas termogénicas (de Jong et al., 2017). Así, se han descubierto varios mecanismos adicionales que activan la termogénesis en los adipocitos *beiges* y marrones, siendo la más importante la estimulación tiroidea (Oppenheimer et al., 1991; Bonet et al., 2013; Villarroya & Vidal-Puig, 2013). Las hormonas tiroideas tiroxina (T4) y triyodotironina (T3, diez veces más activa) actúan a través de sus receptores nucleares [TR $\alpha$ -1, TR $\alpha$ -2 y TR $\beta$ , presentes en WAT y BAT (Obregón, 2014)], que se unen a los elementos de respuesta tiroideos (TREs) de los promotores de sus genes diana (Brent, 1994).

### **5. Familia de proteínas desacoplantes UCPs: estructura, regulación y degradación de UCP1.**

#### 5.1. Familia de las proteínas desacoplantes UCPs.

La familia de proteínas UCPs (*uncoupling proteins*), proteínas desacoplantes de la membrana mitocondrial interna, consta de 5 miembros (UCP1-5), de los cuales los 3 primeros presentan notable homología en su secuencia y son los más estudiados (Ricquier & Bouillaud, 2000; Krauss et al., 2005). A pesar de esa homología, sólo UCP1 posee capacidad termogénica *in vivo* (Matthias et al., 2000; Golozoubova et al., 2001; Nedergaard & Cannon, 2003; Krauss et al., 2005). Esto podría explicarse por la redu-

cida presencia de UCP2 y UCP3 en mitocondrias (sólo representan el 0.01-0.1% de las proteínas mitocondriales, frente al 8-10% que supone UCP1), que limita en gran medida su capacidad de disipar el potencial de membrana (Kozak & Koza, 2008).

### 5.2. Estructura de UCP1.

*UCP1* es un gen presente en casi todos los mamíferos placentarios (con alguna excepción, como el cerdo), con papel termogénico. También se han descrito ortólogos de *UCP1* en peces, anfibios, y mamíferos monotremados y marsupiales, con funciones en muchos casos desconocidas (Ledesma et al., 2002; Hughes & Criscuolo, 2008; Jastroch et al., 2008; Jastroch et al., 2010; Hou et al., 2017).

UCP1 (o termogenina) es una proteína mitocondrial de 32 kDa y 306 aminoácidos considerada específica de adipocitos de carácter marrón (Cannon & Nedergaard, 2004). Sin embargo, en los últimos años se ha detectado UCP1 también en timocitos (Carroll et al., 2004; Carroll et al., 2005; Porter, 2006; Adams et al., 2007; Adams et al., 2008), aunque gran parte de los expertos en el campo defiende que estos resultados son artefactuales, y se deben a la presencia de BAT rodeando al timo. Sea como fuere, UCP1 no juega un papel termogénico en este tejido, sino que, en todo caso, participa en la selección y proliferación de los timocitos (Adams et al., 2010).

Las proteínas UCPs están constituidas por tres dominios repetidos, cada uno de los cuales está compuesto por dos hélices  $\alpha$ -transmembrana que se extienden por la membrana mitocondrial interna (Krauss et al., 2005; Echtay, 2007). Así, estas proteínas contienen en total de 6 dominios transmembrana con los extremos carboxi y amino dispuestos en el espacio intermembrana, y 3 bucles inmersos en la matriz (Aquila et al., 1985; Schleiff & McBride, 2000; Ledesma et al., 2002).

### 5.3. Actividad de UCP1.

A pesar del alto contenido en mitocondrias, y de su elevada tasa de respiración celular, los adipocitos marrones tienen una reducida capacidad de síntesis de ATP, en parte debido a que poseen bajos niveles de ATP sintasa (Cannon & Vogel 1977; Houstek et al., 1991; Kramarova et al., 2008). Además, las mitocondrias de los adipocitos marrones y *beiges* son únicas porque contienen UCP1 (Nicholls et al., 1978; Lin & Klingenberg, 1980; Parker et al., 2009).

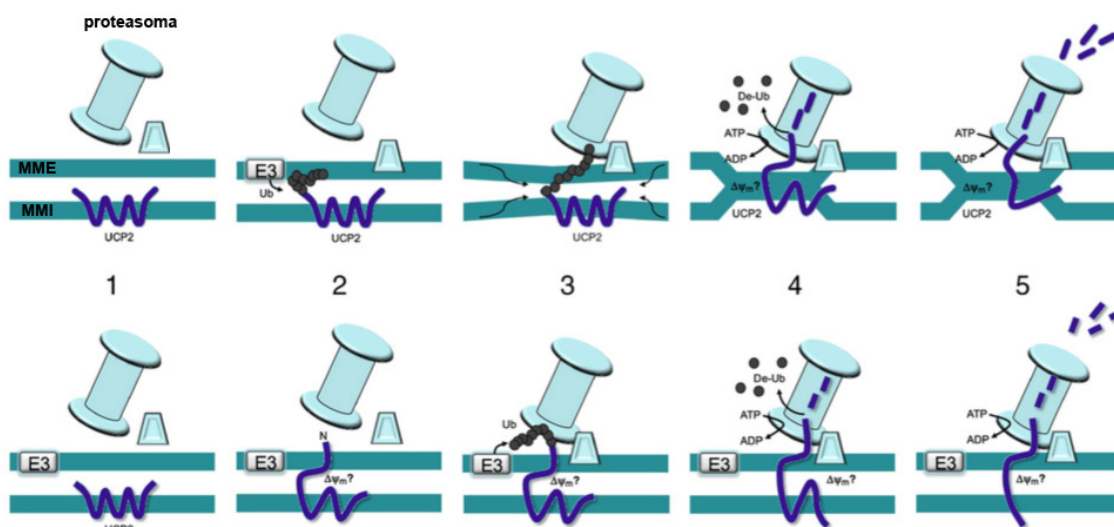
UCP1 presenta las mismas características clave que el resto de transportadores mitocondriales (Crichton et al., 2017), pero con una funcionabilidad única: UCP1 desacopla la cadena respiratoria de la producción de ATP y convierte la energía electroquímica en energía térmica – un proceso denominado termogénesis no-temblorosa (Heaton et al., 1978; Klingenberg et al., 1999; Kozak & Harper, 2000; Cannon & Nedergaard, 2004; Parker et al., 2009; Fedorenko et al., 2012) (**Figura 5**). Es decir, en las células que no expresan UCP1, la oxidación de los sustratos generados en el catabolismo produce un gradiente electroquímico de protones a ambos lados del espacio intermembrana mitocondrial (potencial de membrana), aprovechado por la ATP sintasa para generar ATP (Hirono-Hara et al., 2001). En las mitocondrias de los adipocitos marrones y *beiges*, UCP1 actúa como una bomba pasiva de protones, por

## -Introducción-

lo que la fuerza protón-motriz no se traduce en energía química (ATP), sino que se disipa generando energía térmica (calor), que se distribuye al resto del cuerpo a través del torrente circulatorio (Argyropoulos & Harper, 2002; Ricquier, 2012). Debido a esta funcionalidad única, y a su papel transcendental en la fisiopatología de la obesidad, UCP1 es una proteína de gran relevancia en la actualidad (Ricquier et al., 2017).

Los niveles de UCP1 no reflejan necesariamente la capacidad termogénica del adipocito marrón, ya que sin estimulación (en termoneutralidad), UCP1 está inactivo en parte debido a la acción inhibitoria de nucleósidos de purina di- y tri-fosfatos (ADP, ATP, GDP y GTP) (Nicholls & Locke, 1984; Nicholls, 2006; Sluse et al., 2006). Como ya se ha comentado anteriormente, en respuesta al frío, ejercicio o excesiva ingesta calórica, los estímulos adrenérgicos disparan la lipólisis, generando ácidos grasos libres que se unen y activan a UCP1 a la vez que proporcionan combustible para la termogénesis mediante su  $\beta$ -oxidación (Shabalina et al., 2004; Nicholls, 2006; Lehr et al., 2006; Sluse et al., 2006; Fedorenko et al., 2012).

La relevancia fisiológica de UCP1 para el control del peso corporal ha quedado avallada por numerosos estudios. Así, se ha comprobado que la expresión constitutiva de UCP1 en WAT y BAT genera ratones resistentes a obesidad (Kopecky et al., 1995), y la expresión forzada de UCP1 en adipocitos blancos produce un aumento en la captación de glucosa, liberación de lactato y descenso en la acumulación de triglicéridos (Si et al., 2007). Es decir, la expresión ectópica de UCP1 permite incrementar el gasto energético, y reducir la adiposidad y la resistencia a insulina. Sin embargo, niveles excesivos de UCP1 pueden conducir a la muerte de células musculares e incluso



**Figura 6. Modelo hipotético descrito por Azzu y colaboradores para explicar el posible mecanismo de degradación de proteína** Tabla 1. Oligonucleótidos utilizados para el genotipado de los animales. s de la membrana mitocondrial interna por el sistema ubiquitina-proteasoma (UPS). Múltiples evidencias sugieren que las proteínas UCPs, entre otras proteínas de la membrana mitocondrial interna, se degradan por el sistema UPS, pero se desconoce el mecanismo responsable. Se han propuesto algunos modelos para intentar explicar cómo podría ocurrir la retrotranslación de las proteínas UCPs al citoplasma, permitiendo así su degradación por el sistema UPS. Este proceso quizás podría desencadenarse tras la fusión de las membranas mitocondriales externa (MME) e interna (MMI) (arriba), o la activación de exportasas o desplegasas mitocondriales (abajo). Modificado de X. X

de los adipocitos marrones, por lo que sus niveles deben estar finamente regulados

(Kozak et al., 2010). Por otro lado, los ratones deficientes en UCP1 muestran mayor susceptibilidad al frío (Enerbäck et al., 1997), y son incapaces inicialmente de realizar termogénesis no-temblorosa (Golozoubova et al., 2001), aunque finalmente acaban por adaptarse (Golozoubova et al., 2006; Ukropec et al., 2006). También carecen de la capacidad de termogénesis inducida por dieta, y son obesos en condiciones de termoneutralidad, es decir, a 30°C (Feldmann et al., 2009; von Essen et al., 2017). Sin embargo, en hipotermia estos ratones no presentan obesidad inducida por dieta (Liu et al., 2003), sugiriendo la existencia de mecanismos alternativos de termogénesis que compensan la falta de UCP1. Por último, en humanos se han descrito varios polimorfismos en la secuencia de *UCP1* asociados a un mayor riesgo de sufrir obesidad (Villarroya et al., 2017).

### 5.4. Regulación de UCP1.

Estructuralmente, la región 5' del gen *UCP1* incluye (Obregón, 2014; Villarroya et al., 2017):

- 1) Secuencias de regulación por CEBPs, y secuencias ATF2 reguladas por AMPc (Yubero et al., 1994; Yubero et al., 1998; Kozak et al., 1994; Cao et al., 2001; Cao et al., 2004).
- 2) Secuencias de unión a PPAR $\alpha$  y PPAR $\gamma$  (Sears et al., 1996; Barbera et al., 2001; Santos et al., 2015).
- 3) Secuencias de unión de receptores de hormona tiroidea (Cassard-Doulier et al., 1994; Rabelo et al., 1995).
- 4) Secuencias reconocidas por receptores de ácido retinoico (Rabelo et al., 1996; Álvarez et al., 1995; Álvarez et al., 2000).
- 5) Secuencias de unión a Zfp516, un factor de transcripción que induce la expresión de UCP1 (Dempersmier et al., 2015).

Todos estos factores promueven la transcripción de UCP1, siendo el mecanismo de regulación más estudiado para esta proteína (Villarroya et al., 2017).

### 5.5. Degradación de proteínas mitocondriales.

#### 5.5.1. Sistema ubiquitina-proteasoma (UPS).

El sistema ubiquitina-proteasoma (UPS) juega un papel crucial en la regulación de numerosos procesos celulares a través del control de la abundancia, actividad y localización de una gran variedad de proteínas celulares (Varshavsky, 2016). Así, el sistema UPS es el mecanismo principal de degradación de las proteínas reguladoras de ciclo celular (Craney & Rape, 2013; Teixeira & Reed, 2013). La ubiquitina, un polipéptido de 79 aminoácidos, se une a la proteína diana en un residuo de lisina, en una secuencia de reacciones en las que participan 3 enzimas: E1, E2 y E3 ubiquitina-ligasas (Pickart, 2001; Nakayama & Nakayama, 2006; Brown et al., 2014). La E1 (enzima activadora de ubiquitina) une una molécula de ubiquitina, y la transfiere a la enzima E2 (enzima conjugadora de ubiquitina). La enzima E3 cataliza la transferencia de la ubiquitina a la proteína aceptora. Existe una gran variedad de proteínas E3 ubiquitina-ligasas (en humanos, aproximadamente 600) en distintas localizaciones celulares, y cada una de ellas actúa sobre una serie de sustratos a los que marcan para su degra-

## ***-Introducción-***

dación (Deshaies & Joazeiro, 2009). Habitualmente, para que la proteína a degradar sea reconocida por el proteasoma 26S se requiere su poliubiquitinación, y será degradada por este macro-complejo con gasto de ATP (Pines, 2011; Komander & Rape, 2012; Mocciaro & Rape, 2012; Sivakumar & Gorbsky, 2015).

### 5.5.2. Sistema ubiquitina-proteasoma (UPS) y adipogénesis.

Muchas de las proteínas clave en la fisiología del tejido adiposo son degradadas mediante el sistema UPS. Por ejemplo, PPAR $\gamma$  tiene una vida media corta en adipocitos (Waite et al., 2001) y su tasa de renovación está regulada por el sistema UPS (Hauser et al., 2000; Floyd & Stephen, 2002; Kilroy et al., 2009). Así, varias E3 ubiquitina-ligasas, como MKRN1 (Kim et al., 2014), Siah2 (Kilroy et al., 2012), Nedd4-1 (Han et al., 2013), CHIP (Kim et al., 2017) y TRIM23 (Watanabe et al., 2015) participan en la ubiquitinación y degradación de PPAR $\gamma$  mediada por el proteasoma. Otras proteínas involucradas en la adipogénesis se degradan mediante el sistema UPS, como p21 (Blagosklonny et al., 1996; Sheaff et al., 2000) y p27 (Pagano et al., 1995).

### 5.5.3. Sistema ubiquitina-proteasoma (UPS) y mitofagia.

La mitofagia es un reciclaje selectivo de las mitocondrias en respuesta a estrés o a señales de desarrollo, en el que Parkin, una E3 ubiquitina-ligasa, juega un importante papel en colaboración con su cofactor PINK (Gegg et al., 2010; Poole et al., 2010; Tanaka et al., 2010; Ziviani et al., 2010; Glauser et al., 2011; Youle & Narendra, 2011; Lionaki et al., 2015).

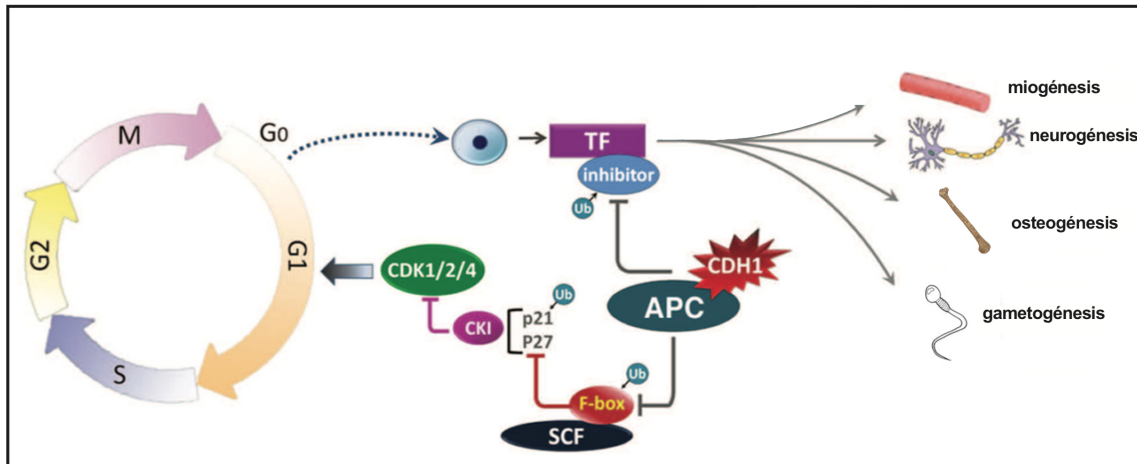
La mitofagia y el sistema UPS participan en la regulación del *browning*. Los adipocitos *beiges* retornan a un fenotipo de adipocito blanco cuando el estímulo b-adrenérgico termina, para lo que requieren eliminar mitocondrias mediante mecanismos mitofágicos (Rosenwald et al., 2013; Gospodarska et al., 2015; Altshuler-Keylin et al., 2016; Altshuler-Keylin & Kajimura, 2017). *In vitro*, los niveles de Parkin y la actividad mitofágica disminuyen tras la estimulación del *browning* (Taylor & Gottlieb, 2017). *In vivo*, tras el *browning*, los niveles de Parkin muestran una relación inversa con los niveles de UCP1: Parkin disminuye en la grasa subcutánea, donde UCP1 se expresa fuertemente; mientras que en grasa perigonadal, donde los niveles de UCP1 aumentan menos, Parkin no varía (Taylor & Gottlieb, 2017). De hecho, la delección de Parkin genera ratones con niveles de UCP1 muy elevados en grasa perigonadal (Taylor & Gottlieb, 2017).

### 5.5.4. Sistema ubiquitina-proteasoma (UPS) y UCPs.

Recientemente se ha demostrado que el sistema UPS juega un importante papel en el control de la calidad de proteínas mitocondriales (Margineantu et al., 2007; Radke et al., 2008). Son numerosas las proteínas mitocondriales que se regulan mediante este sistema: no sólo proteínas de la membrana mitocondrial externa, sino también proteínas de la matriz, proteínas intermembrana (Margineantu et al., 2007; Heo & Rutter, 2011; Bragoszewski et al., 2013), e incluso proteínas de la membrana mitocondrial interna (Lehmann et al., 2016; Lehmann et al., 2016). El sistema UPS también media la degradación proteolítica de pre-proteínas codificadas en el núcleo, antes de su im-

porte a la mitocondria (Karbowski & Youle, 2011; Bragoszewski et al., 2013).

En el año 2008 se observó una fracción de UCP1 fosforilado en la mitocondria de BAT, que aumenta tras la aclimatación al frío (Carroll et al., 2008). La fosforilación se ha identificado como una señal para la ubiquitinación (Myung et al., 2001; Hicke et



**Figura 7. APC/C-Cdh1 promueve numerosos procesos de diferenciación celular.** El complejo APC/C-Cdh1 no sólo promueve la entrada y el mantenimiento en la quiescencia celular mediante la inhibición de la actividad CDK, sino que además estimula la formación de numerosos tipos celulares, como miocitos, neuronas, o gametos. Modificado de X X

al., 2005), lo que planteaba la posibilidad de que la estabilidad de UCP1 se regulase mediante el sistema UPS, como ocurre con UCP2 y UCP3 (Azzu et al., 2010; Azzu et al., 2010). En estos estudios se comprobó que UCP2 y UCP3 presentan una vida media muy corta (unas pocas horas), y que la inhibición del proteasoma citosólico bloquea su degradación. También se utilizó un sistema *in vitro* (mitocondrias purificadas) para demostrar que el proteasoma citosólico degrada ambas proteínas, de forma dependiente de ubiquitina, ATP, un alto potencial de membrana y pH en un rango dado (Rousset et al., 2007; Azzu et al., 2008; Azzu et al., 2010; Azzu et al., 2010; Azzu & Brand, 2010; Mookerjee & Brand, 2011). Sin embargo, la vida media de UCP1 es mucho mayor (al menos en adipocitos marrones en cultivo), con un rango que va desde las 20 horas en adipocitos marrones adrenérgicamente estimulados de forma aguda, 72 horas en adipocitos marrones con estimulación adrenérgica crónica, y 84 horas en cultivos primarios sin estimulación adrenérgica (Puigserver et al., 1992; Moazed et al., 2002; Rousset et al., 2007), lo que sugeriría que posiblemente UCP1 no se degrada por la vía UPS (Azzu et al., 2010). Sin embargo, posteriormente el trabajo de Clarke y colaboradores demostró *in vitro* (en un sistema de conjugación de ubiquitina) e *in vivo* (en mitocondrias aisladas de BAT), que UCP1 es ubiquitinada y, además, que puede ser degradada en un sistema ubiquitina-proteasoma *in vitro*, con una vida media de 30-72 horas en adipocitos marrones, y de 3 horas en timocitos (Clarke et al., 2012). La degradación por el proteasoma citosólico de proteínas de la membrana mitocondrial interna plantea el problema del mecanismo, que aún no se ha descrito. Es posible que las proteínas se expongan al proteasoma mediante retrotranslocación (quizás por

sitios de contacto entre la membrana interna y externa), que podría ser llevada a cabo por la fracción 19S del proteasoma (Mayer et al., 1998; Lee et al., 2004; Barthelme & Sauer, 2012) o por desplegasas o exportasas en la mitocondria (Soltys & Gupta, 1999; Azzu & Brand, 2010) (**Figura 6**). Estudios recientes apuntan a un papel de la chaperona VCP (Cdc48, o p97), bien conocida por facilitar la extracción de sustratos en la degradación de proteínas del retículo endoplásmico (Heo et al., 2010; Tanaka et al., 2010; Xu et al., 2011; Meyer et al., 2012), quizás en asociación con Vms1, una proteína de respuesta al estrés mitocondrial (Heo et al., 2010; Esaki & Ogura, 2012; Heo et al., 2013).

## 6. APC/C-Cdh1.

### 6.1. Introducción.

El complejo promotor de la anafase/ciclosoma (APC/C) es una E3 ubiquitina-ligasa de 1.5 megadalton, un complejo proteico constituido por entre 11-19 subunidades diferentes, según el organismo, y altamente conservado filogenéticamente (Barford, 2011; McLean et al., 2011; Zhang et al., 2013; Chang et al., 2014; Chang et al., 2015; Yamaguchi et al., 2015).

APC/C controla la progresión del ciclo celular durante las fases M y G<sub>1</sub> del ciclo celular, y para el reconocimiento de sus sustratos necesita la interacción con los cofactores Cdh1 (codificado por el gen *Fzr1* en mamíferos) o Cdc20 (Nakayama & Nakayama, 2006; Sarikas et al., 2011; Chang & Barford, 2014; Sivakumar & Gorbsky, 2015; Zhou et al., 2016), promoviendo la ubiquitinación y degradación de ciclinas mitóticas y otros reguladores (Peters, 2006). Cdh1 y Cdc20 poseen tres motivos necesarios para su unión a APC/C: la caja C, el motivo KILR y el motivo IR; y un dominio con repeticiones WD40 necesario para su interacción con las proteínas diana (Castro et al., 2005; Peters, 2006; Pines, 2011; Primorac & Musacchio, 2013; Chang et al., 2014; Sivakumar & Gorbsky, 2015).

Los complejos APC/C-Cdc20 y APC/C-Cdh1 reconocen sus sustratos mediante dos posibles secuencias o motivos de reconocimiento: la denominada caja D (cuya secuencia consenso es RXXL, o RXXLXXXXN en su versión más estricta) y la caja KEN (KENXXXN) (Pfleger & Kirschner, 2000; Burton et al., 2005). Además de estas dos secuencias mayoritarias, se han identificado otras en algunos sustratos, como la caja O, caja G, caja A o caja CRY (Peters, 2006; Reis et al., 2006; Pines, 2011; Sivakumar & Gorbsky, 2015).

### 6.2. APC/C-Cdh1 en ciclo celular.

APC/C es la E3 ubiquitina-ligasa que, junto a SCF, juega un papel clave en la regulación del ciclo celular siendo esencial para garantizar una salida adecuada de mitosis (Peters, 2006).

La actividad de APC/C-Cdc20, complejo que solamente está activo en mitosis, está inhibida inicialmente por Mad2 y BubR1 a través del punto de control del huso mitó-



tico (SAC), y sólo se libera de esta inhibición cuando las cromátidas hermanas están alineadas en la placa metafásica. En ese momento, este complejo dispara la degradación de securina y ciclina B, y con ello la transición de metafase a anafase (Hagting et al., 2002; Thornton & Toczyski, 2003; Musacchio & Salmon, 2007; Yu et al., 2007). La degradación mitótica de la ciclina B provoca una reducción de la actividad Cdk, que posibilita la activación de Cdh1. El complejo APC/C-Cdh1 sólo se encuentra activo en una parte muy concreta del ciclo celular: desde la anafase mitótica hasta el final de la fase G<sub>1</sub>. Esto se debe a que Cdh1 es fosforilado e inactivado por la actividad Cdk, y no es hasta anafase cuando supera esta inactivación, gracias a la actividad de APC/C-Cdc20 (Crasta et al., 2008; Pines, 2011). El complejo APC/C-Cdh1 dirige la degradación proteolítica de Cdc20, dando lugar así al recambio de un cofactor por otro (Manchado et al., 2006; Peters, 2006; Pines, 2011; Sivakumar & Gorbsky, 2015). Una vez activo, APC/C-Cdh1 regula dos procesos clave durante el ciclo celular:

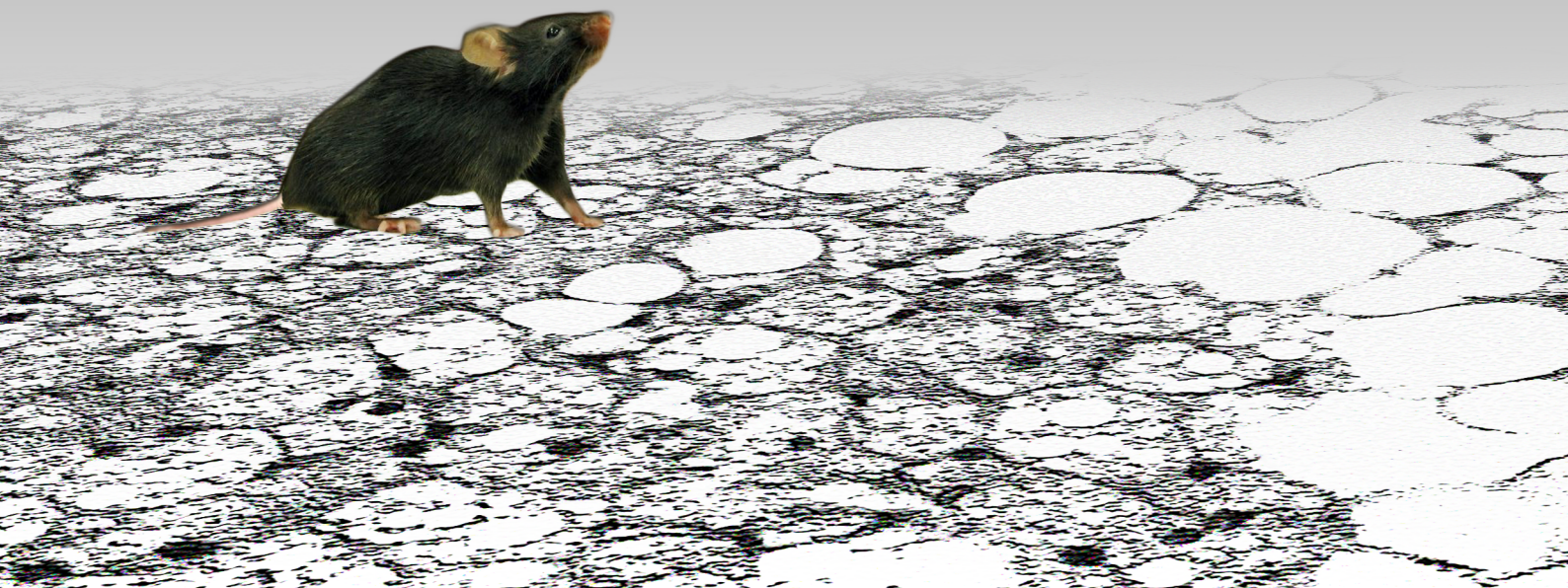
**A.** APC/C-Cdh1 promueve la transición mitosis-fase G<sub>1</sub>, actuando sobre las ciclinas A y B, y sobre algunas quinasas mitóticas como Aurora A, Aurora B, Plk1 y Nek2. Sin embargo, Cdh1 no es esencial para este proceso, ya que en su ausencia, Cdc20 puede compensar su actividad (Castro et al., 2005; Floyd et al., 2008; Manchado et al., 2010; Pines, 2011; Sivakumar & Gorbsky, 2015).

**B.** APC/C-Cdh1 mantiene una baja actividad Cdk durante la fase G<sub>1</sub>, garantizando así que la subsiguiente fase S sea correcta. Para ello, conduce la degradación de una serie de sustratos, siendo los más importantes: las ciclinas A y B, reduciendo la actividad Cdk (Eguren et al., 2011); Skp2, uno de los componentes del complejo SCF, que promueve la degradación de p27, p21 y p57 (Bashir et al., 2004; Wei et al., 2004); Cdc25A, la fosfatasa activadora de los complejos Cdk (Donzelli et al., 2002). Por otro lado, APC/C-Cdh1 actúa sobre factores replicativos tales como geminina, Cdc6 y Dbf4, impidiendo su acumulación prematura (Petersen et al., 2000; Sivaprasad et al., 2007; Skar & Pagano, 2008; Clijsters et al., 2013; Yamada et al., 2013). Por último, recientemente se ha descrito que E2F7 y E2F8, represores transcripcionales de la familia E2F, también son sustratos de APC/C-Cdh1, sugiriendo una nueva vía de control de la transición G<sub>1</sub>-S (Boekhout et al., 2016).

Con la entrada en fase S, APC/C-Cdh1 se inactiva mediante distintos mecanismos (Pines, 2011; Sivakumar & Gorbsky, 2015): la fosforilación de Cdh1 por el complejo Cdk2-ciclina A, que lo disocia de APC/C (Jaspersen et al., 1999; Lukas et al., 1999), facilita su exportación al citoplasma (Jaquenoud et al., 2002; Zhou et al., 2003), y promueve su degradación mediada por SCF (Benmaamar & Pagano, 2005; Fukushima et al., 2013); la inhibición por Emi1, una diana de E2F actúa como pseudo-sustrato (Grosskortenhau & Sprenger, 2002; Hsu et al., 2002; Martínez et al., 2006; Miller et al., 2006; Machida & Dutta, 2007; Frye et al., 2013); la auto-ubiquitinación y estimulación de su propia degradación (Listovsky et al., 2004).

En consonancia con su importante papel durante la fase G<sub>1</sub>, la delección de Cdh1 en células humanas o de ratón, si bien permite la salida de mitosis, acorta la duración de la fase G<sub>1</sub> y produce una fase S más larga e ineficiente, acumulación de daño en el DNA y un claro fenotipo de estrés replicativo (Engelbert et al., 2008; García-Higuera et al., 2008; Sigl et al., 2009; Garzón et al., 2017). Por otro lado, los ratones heteroci-

# Objetivos



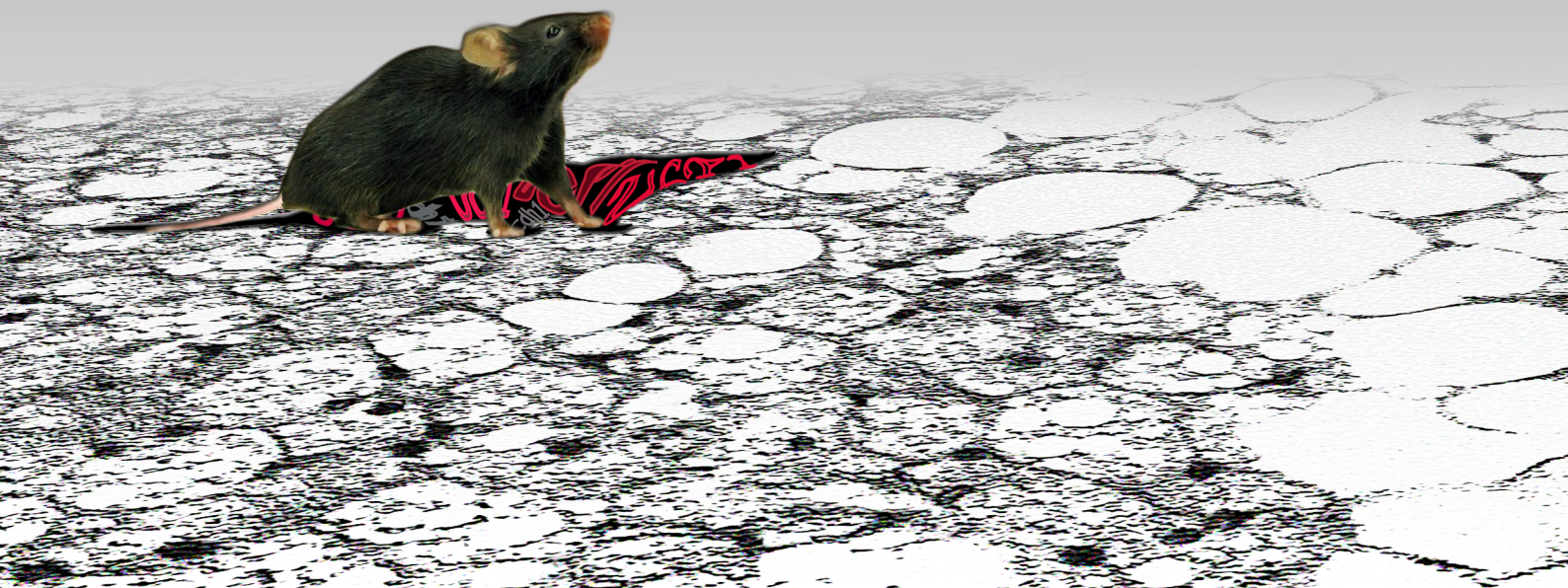


## ***-Introducción-***

- 1.** Estudiar si APC/C-Cdh1 participa en la diferenciación adipogénica, *in vitro*. Y, en su caso, identificar el mecanismo molecular subyacente.
- 2.** Analizar el fenotipo de los adipocitos maduros carentes de Cdh1, *in vitro*.
- 3.** Evaluar *in vivo* las consecuencias fisiológicas de la depleción de Cdh1 durante todo el proceso adipogénico.
- 4.** Determinar, *in vivo*, el impacto fisiológico de la pérdida de Cdh1 exclusivamente en adipocitos maduros.



# Material y métodos



### **1. Ratones.**

La cría de los animales utilizados para esta Tesis se llevó a cabo en el animalario OMG (Organismos Modificados Genéticamente) perteneciente al Servicio de Experimentación Animal de la Universidad de Salamanca. El mantenimiento de los animales se realizó en este mismo centro, o en el estabulario del Instituto de Biología Funcional y Genómica.

Los ratones condicionales *Cdh1*(lox/lox) se generaron introduciendo secuencias loxP flanqueando los exones 2 y 3 de este gen (García-Higuera et al., 2008). *Cdh1* es esencial para la formación de los trofoblastos en la placenta (García-Higuera et al., 2008), por lo que para conseguir ratones viables *Cdh1*KO utilizamos el transgén *Sox2-Cre*, que expresa la recombinasa Cre únicamente en el embrión. Cruzando hembras *Cdh1*(lox/lox) y machos *Cdh1*(+/-); *Sox2-Cre*, se obtuvieron ratones control (*wildtype*, WT) ***Cdh1*(+/-lox)** y ratones deficientes en *Cdh1* (*knockout* para *Cdh1*, *Cdh1*KO o KO) *Cdh1*(-/lox); *Sox2-Cre*, a los que llamaremos para simplificar ***Cdh1*(-D)**. En un fondo genético C57BL6 los animales mutantes presentaban mortalidad perinatal, pero el enriquecimiento en el fondo CD1 permitió incrementar su supervivencia y obtener animales adultos.

Los ratones *Cdh1*KO específicos de tejido adiposo se obtuvieron cruzando animales *Cdh1*(lox/lox) con líneas transgénicas aP2-Cre o adipoQ-Cre, que expresaban la recombinasa Cre específicamente en tejido adiposo, gentilmente cedidas por la Dra. Guadalupe Sabio (Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares, Madrid):

- **Modelo PAC*Cdh1*KO**, o delección de *Cdh1* en preadipocitos. El cruce *Cdh1*(lox/lox) y *Cdh1*(lox/lox); aP2-Cre permitió obtener animales control (*wildtype*, WT) *Cdh1*(lox/lox) [que llamaremos ***Cdh1*<sup>L/L</sup>**] y animales deficientes de *Cdh1* en preadipocitos (ratones PAC*Cdh1*KO) *Cdh1*(lox/lox); aP2-Cre [que llamaremos ***Cdh1*<sup>L/L</sup>; aP2-Cre**].
- **Modelo MAC*Cdh1*KO**, o delección de *Cdh1* en adipocitos maduros. El cruce *Cdh1*(lox/lox) y *Cdh1*(lox/lox); adipoQ-Cre permitió obtener animales control (*wildtype*, WT) *Cdh1*(lox/lox) [que llamaremos ***Cdh1*<sup>L/L</sup>**] y animales deficientes de *Cdh1* en adipocitos maduros (ratones MAC*Cdh1*KO) *Cdh1*(lox/lox); adipoQ-Cre [que llamaremos ***Cdh1*<sup>L/L</sup>; adipoQ-Cre**].

Estos modelos condicionales se mantuvieron en un fondo genético C57BL6.

### **2. Genotipado.**

El genotipado de los animales se realizó por PCR, a partir de muestras de DNA genómico obtenidas de un pequeño fragmento de la cola.

#### 2.1. Extracción de DNA.

Se llevó a cabo digiriendo la muestra de tejido en una solución tamponada con pro-

## ***-Material y métodos-***

teinasas K (100 µg/ml), durante 2-3 horas a 55°C en agitación constante. La composición del tampón utilizado fue la siguiente: 50 mM de KCl, 1.5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 10 mM de Tris-HCl pH 8.5, 0.01% de gelatina, 0.45% de Nonidet P-40, 0.45% de Tween-20. Tras la digestión, se inactivó la proteinasa K calentando la muestra a 95°C durante 15 minutos.

### 2.2. PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa).

Utilizando los nucleótidos de la **Tabla 1** (a una concentración final de 1 µM), se amplificaron las regiones de localización de Cdh1 y Cre, en presencia de 200 µM de dNTPs, 1.5 mM de MgCl<sub>2</sub> y 1 M de betaína en una PCR de 35 ciclos de 30 segundos de desnaturalización a 95°C, 30 segundos de anillamiento a 58°C y 30-60 segundos de extensión a 72°C. Tras la electroforesis en geles de agarosa al 3%, los fragmentos amplificados se visualizaron tiñendo con *Midori Green* (*Nippon Genetics Europe*).

**Tabla 1.** Oligonucleótidos utilizados para el genotipado de los animales.

| <b>Nucleótido</b> | <b>Secuencia</b>         |
|-------------------|--------------------------|
| <b>Cdh1-32-Fw</b> | AGCATGGTGACCGCTTCATCC    |
| <b>Cdh1-34-Rv</b> | CCTGGTCCACAGAGGAAATTC    |
| <b>Cdh1-43-Rv</b> | TGGCTGGGGGACTTCTCATTTTCC |
| <b>Cre-Fw</b>     | CCGGTTATTCAACTTGCACC     |
| <b>Cre-Rv</b>     | CTGCATTACCGGTTCGATGCAAC  |

### 3. Cultivos celulares.

#### 3.1. Establecimiento de cultivos primarios de MEFs (fibroblastos embrionarios murinos).

A partir de embriones de 14.5 días se purificaron y cultivaron MEFs primarios siguiendo el siguiente protocolo, en una cabina de flujo laminar vertical para evitar contaminaciones. Se extrajeron los embriones de la hembra gestante y se desecharon el saco vitelino, la cabeza y los tejidos rojos (hígado, corazón...). Con una hoja de bisturí, se trituró el resto del embrión, y se disgregó incubándolo 5-10 minutos con 1 ml de tripsina (0.25% tripsina-EDTA, rojo fenol - *Gibco*). Una vez dissociado, se homogeneizó en 10 ml de DMEM con 4500 mg/L de glucosa (*Sigma*) suplementado con 2 mM de



L-Glutamina (*Gibco*), 1% de penicilina/estreptomicina (*Gibco*) y 10% de FBS (suero fetal bovino, *Gibco*) [a partir de ahora, DMEM] y se plaqueó uniformemente en una placa Petri de 150 mm de diámetro (Falcon<sup>®</sup>).

Una vez obtenido el cultivo, éste se mantuvo en un incubador a 37°C en condiciones de CO<sub>2</sub> (5%) y humedad constantes. Tras 24 horas, se renovó el medio para eliminar las células muertas. Al alcanzar la subconfluencia (2-3 días), las células se recogieron tripsinizando 5 minutos, y se lavaron con PBS. Entonces, se centrifugaron 5 minutos a 1500 rpm y 4°C. Por último, las células se congelaron en FBS con 10% de DMSO (*Sigma*), manteniéndolas en el tanque de N<sub>2</sub> *líquido hasta su uso*.

### 3.2. Establecimiento de cultivos primarios de preadipocitos blancos.

Todo el proceso se llevó a cabo en una cabina de flujo laminar para evitar contaminaciones. Se diseccionó la grasa blanca subcutánea inguinal de animales de 2-3 meses de edad, se lavó en DMEM y se trituró con tijeras y una hoja de bisturí. Posteriormente, se disgregó el tejido incubándolo en una solución filtrada de PBS con 2 mg/ml de colagenasa A (*Roche*) y 20 mg/ml de BSA (albúmina de suero bovino, *Sigma*) durante 40 minutos en un baño a 37°C con agitación constante. Una vez disociado, se homogeneizó *mediante pipeteo*, se añadieron 3 volúmenes de DMEM:F12 (*Gibco*) suplementado con 2 mM de L-Glutamina (*Gibco*), 1% de penicilina/estreptomicina (*Gibco*) y 10% de FBS (*Gibco*) [a partir de ahora, DMEM:F12], y se pasó a través de un filtro de nylon de 70 µm (Falcon<sup>®</sup>). El filtrado se centrifugó a 250 x g durante 8 minutos a 4°C, se conservó el *pellet* en hielo, y el sobrenadante se volvió a centrifugar, a 400 x g durante 8 minutos a 4°C. Se desechó el sobrenadante, se resuspendieron y mezclaron los dos *pellets* en 2 ml de DMEM:F12 y se plaqueó todo el volumen en un pocillo de una placa de cultivo de 6 pocillos (Falcon<sup>®</sup>).

Ya en cultivo, las células se mantuvieron en un incubador a 37°C en condiciones de CO<sub>2</sub> (5%) y humedad constantes. A las 24 horas se renovó el medio, y durante los días sucesivos se expandió el cultivo mediante pases (como máximo, 1/4), hasta obtener el número de pocillos necesario para el experimento.

### 3.3. Ensayo de adipogénesis *in vitro*.

Los MEFs o preadipocitos primarios se diferenciaron a adipocitos *in vitro* mediante un protocolo ya establecido desde los años 80 (Student et al., 1980): tras dos *días* postconfluentes, se indujo la diferenciación adipogénica mediante un *cocktail* hormonal (comúnmente denominado MDI o medio de diferenciación) constituido por DMEM (MEFs) o DMEM:F12 (preadipocitos) suplementado con 1 µM de dexametasona (DXM, *Sigma*), 0.5 mM de isobutilmetilxantina (IBMX, *Sigma*), 10 mg/ml de insulina (*Sigma*) y 1 µM de rosiglitazona (*Sigma*). Tras dos días en el medio de diferenciación, éste se cambió por medio de mantenimiento, formado por DMEM/DMEM:F12 más 10 mg/ml de insulina y 1 µM de rosiglitazona, y las células se mantuvieron en cultivo otros 8-10 días más, renovando el medio cada dos días, hasta obtener adipocitos maduros.

NOTA: en algunos experimentos se utilizó 10 µM de troglitazona (*Santa Cruz Biotechnology*) para potenciar aún más la activación de la ruta PI3K/AKT, ya que las tia-

## ***-Material y métodos-***

zolidinedionas (como rosiglitazona y troglitazona), son potentes sensibilizadores de insulina (Yau et al., 2013).

### 3.4. Infecciones con adenovirus.

La infección con adenovirus portadores de la recombinasa Cre ('Ad. Cre') y adenovirus vacíos (como control, 'Ad. Control') se utilizó para promover la escisión de Cdh1 en MEFs o adipocitos condicionales Cdh1(lox/lox). Los virus, utilizados a una multiplicidad de 500 partículas virales/célula, fueron adquiridos a través de *Gene Transfer Vector Core* (Universidad de Iowa).

Las infecciones se llevaron a cabo añadiendo los virus sobre el medio de cultivo correspondiente durante 24 horas.

### 3.5. Sincronización celular en G<sub>0</sub>-G<sub>1</sub> (quiescencia).

Para la sincronización de MEFs en fase G<sub>0</sub>-G<sub>1</sub>, en una situación de subconfluencia se desechó el medio de cultivo, se lavó intensamente con PBS, y se mantuvieron las células durante 48 horas en DMEM sin FBS.

### 3.6. Análisis de la expansión clonal (proliferación celular por incorporación de EdU).

Las células se incubaron con 10 µM de EdU (5-etinil-2'-deoxiuridina, un análogo de la timidina que se incorpora al DNA que se está sintetizando) durante 1 hora. Tras ello, las células se recogieron tratando con tripsina 5 minutos, se lavaron con PBS y se fijaron con 4% de paraformaldehído (PFA, *Electron Microscopy Sciences*) durante 15 minutos. Después de otro lavado con PBS, el *pellet* celular se resuspendió en 1 ml de 1% BSA en PBS, manteniendo las células a 4°C como máximo 1 semana, hasta su análisis por citometría de flujo (ver apartado 12 en 'Material y métodos').

### 3.7. Tratamiento de las células en cultivo.

**Roscovitina** (*Sigma*). Inhibidor de la actividad Cdk. Se utilizó a 18 µM durante los 4 primeros días de la adipogénesis.

**LY294002** (*Sigma*). Inhibidor específico de PI3K. Se usó a 10 mM durante todo el proceso adipogénico.

**proTAME** (*Boston Biochem*). Inhibidor específico de la actividad APC/C. Se trataron las células, el tiempo indicado, a una concentración de 20 µM.

**MG132** (*Sigma*). Inhibidor específico del proteasoma. Se usó a una concentración de 10 mM durante 24 horas.

**Cicloheximida** (*Sigma*): Inhibe la traducción, la síntesis de nuevas proteínas. Se usó a 10 µg/mL durante distintos tiempos, con un máximo de 12 horas.

**Triyodotironina (T3, Sigma)**: Estimulación tiroidea. Se utilizó a 10 nM.

**Isoproterenol** (*Sigma*). Agonista b-adrenérgico, 200 nM.

### 3.8. Transfecciones transitorias.

Se utilizaron los siguientes plásmidos: cDNA de Cdh1 humano insertado en un vec-

tor pcDNA3; cDNA de GFP en un vector P12; cDNA de UCP1 murino sin etiquetar ('UCP1 RXXL') insertado en el vector pCMV6-Kan/Neo, adquirido en *OriGene Technologies*; cDNA de UCP1 mutado en su caja D ('UCP1 AXXA') mediante mutagénesis dirigida - ver apartado 13 en 'Material y métodos'. Se transfectaron químicamente en MEFs y células U2OS (células tumorales de osteosarcoma), utilizando el reactivo jet-PEI<sup>®</sup> (*Polypplus*), siguiendo el protocolo de la casa comercial para células adherentes.

#### **4. Cuantificación de la adipogénesis.**

La cuantificación de la adipogénesis *in vitro* se realizó espectrofotométricamente. Primero, se lavaron las células con PBS, y se fijaron (aún pegadas a la placa) tratándolas con una solución de PFA al 4% durante 30 minutos. Se hizo un lavado con PBS, otro con agua, y se tiñeron las placas durante 1 hora con una mezcla filtrada de una solución 0,5% del colorante lipídico Oil Red-O (ORO, *Sigma*) y agua en proporción 6:4. Tras la tinción, las placas se lavaron con agua, se dejaron secar y se escanearon (escáner HP Scanjet G4050).

Finalmente, se extrajo el ORO incubando las células con isopropanol durante 10 minutos, y se cuantificó espectrofotométricamente a una longitud de onda de 510 nm (Varioskan<sup>®</sup> Flash, *Thermo*). Para poder determinar la concentración de ORO de las muestras, se realizó, en cada ocasión, una recta patrón construida a partir de concentraciones conocidas de ORO.

#### **5. Técnicas de proteínas.**

##### **5.1. Preparación de extractos proteicos a partir de células en cultivo.**

Las células en cultivo (MEFs, preadipocitos, adipocitos...) se recogieron tratando con tripsina durante 5 minutos, se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 minutos a 4°C, y el *pellet* celular se lavó con PBS, se congeló en hielo seco, y se conservó a -80°C hasta su uso.

En hielo, los precipitados celulares se resuspendieron en 50-100 µl del tampón Tris (10 mM de Tris pH 7.5, 2 mM de EDTA) con inhibidores de proteasas y fosfatasa. La lisis celular se llevó a cabo añadiendo un volumen equivalente del tampón de lisis 2x (125 mM de Tris HCl pH 6.8, 4% de SDS, 20% de glicerol), agitando la muestra en el vórtex e hirviendo inmediatamente a 99°C durante 15 minutos. Tras ello, se centrifugó la muestra a 4°C durante 10 minutos a 13200 rpm, y se transfirió el sobrenadante (extracto proteico) a un tubo nuevo.

##### **5.2. Preparación de extractos proteicos a partir de tejidos.**

Los tejidos, previamente congelados en N<sub>2</sub> líquido, se mantuvieron en hielo y se homogeneizaron mecánicamente, utilizando un homogeneizador rotor-estator Ultra-Turrax T10 (*IKA*<sup>®</sup>) a velocidad máxima y en 2 ciclos de 30 segundos cada uno, en 400-500 µl de tampón Tris (10 mM de Tris pH 7.5, 2 mM de EDTA) con inhibidores

## ***-Material y métodos-***

de proteasas y fosfatasa. Tras añadir un volumen equivalente del tampón de lisis 2x (125 mM de Tris HCl pH 6.8, 4% de SDS, 20% de glicerol), ésta se llevó a cabo de la misma forma que para las células en cultivo, pero hirviendo las muestras a 99°C durante 30 minutos. Para poder eliminar completamente la grasa de los tejidos adiposos, las muestras se centrifugaron a 4°C durante 20 minutos a 13200 rpm, y se transfirió con cuidado el sobrenadante, evitando llevarse grasa, a un tubo nuevo. Tras repetir la centrifugación, se traspasó el sobrenadante (extracto proteico), totalmente limpio de grasa, a un tubo nuevo.

### 5.3. Cuantificación de la concentración de proteínas.

Se llevó a cabo utilizando el kit comercial *Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo)*, basado en la reducción de  $\text{Cu}^{2+}$  a  $\text{Cu}^+$  por parte de las proteínas en medio básico. El  $\text{Cu}^+$  forma un producto quelado con dos moléculas de BCA, dando lugar a un producto soluble cuya absorbancia puede ser determinada en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 562 nm (*Varioskan® Flash, Thermo*). Para poder determinar la concentración proteica de las muestras, se realizó, en cada ocasión, una recta patrón construida a partir de concentraciones conocidas de BSA.

### 5.4. Inmunodetección por *Western blot*.

#### 5.4.1. Preparación de las muestras.

Siempre que fue posible se prepararon las muestras con 50  $\mu\text{g}$  de proteína total, añadiendo el tampón de carga (62.5 mM de Tris HCl pH 6.8, 2% de SDS, 10% de glicerol, 100 mM de DTT y azul de bromofenol) hasta un volumen final de 30-40  $\mu\text{l}$ . Tras calentar las muestras durante 5 minutos a 95°C y centrifugarlas, quedaban listas para cargar en el gel.

#### 5.4.2. Electroforesis de proteínas en SDS-PAGE.

Las proteínas se separaron unidimensionalmente según su tamaño mediante la técnica de *SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis)*. Se utilizaron geles de poliacrilamida (*ProtoGel® 30%* de una solución acrilamida-bisacrilamida (ratio 37.5:1), *National Diagnostics*) a distintas concentraciones (8-14%) según el tamaño de las proteínas a identificar. Los geles de poliacrilamida se prepararon en una solución *tamponada con Tris y SDS*, utilizando persulfato amónico y TEMED (*BioRad*) como agentes polimerizantes para la gelificación.

La electroforesis se realizó en una cubeta *Mini-Protein II (BioRad)*, utilizando como tampón de carrera una solución de 25 mM de Tris, 0.2 M de glicina y 0.1% de SDS. Como guía, cargamos un marcador de peso molecular preteñido (*Precision Plus Protein™, Biorad*). Los geles se corrieron a temperatura ambiente y voltaje constante (100-150V).

#### 5.4.3. Transferencia de proteínas.

Tras la electroforesis, los geles se transfirieron a membranas de nitrocelulosa de ta-

maño de poro 0.45  $\mu\text{M}$  (BioRad) utilizando el sistema *Mini Trans-Blot* (BioRad). La transferencia se realizó con una solución tamponada (25 mM de Tris, 0.19 M de glicina y 20% de metanol) en cámara fría (4°C), a amperaje constante (300 mA) durante 2 horas. Para comprobar que la transferencia funcionó correctamente, se *tiñeron las membranas con el colorante Rojo Ponceau* (BioRad). Finalmente, se bloquearon con 5% de leche (Nestlé) en TBS-T (0.05% de Tween-20 en TBS) durante 1 hora a temperatura ambiente, y se lavaron posteriormente un par de veces con TBS antes de incubarlas con los anticuerpos primarios.

#### 5.4.4. Inmunodetección de proteínas.

Las proteínas de interés se detectaron mediante la incubación con los anticuerpos primarios correspondientes (diluidos en TBS con 5% de BSA y 0.05% de azida, **Tabla 2**) en cámara fría (4°C) durante toda la noche en un *Navigator*<sup>TM</sup>. Tras 3 lavados con TBT-T durante 10 minutos cada uno, la membrana se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario conjugado a peroxidasa, diluido en TBS-T con 5% de leche (**Tabla 3**). Tras lavar nuevamente, las membranas se revelaron con el reactivo de quimioluminiscencia *ECL* (Perkin Elmer® *Plus-ECL*). Para la detección de la quimioluminiscencia se emplearon las películas autorradiográficas *Amersham Hyperfilm ECL*. Tras el revelado, la cuantificación de las proteínas se realizó con el programa de análisis de imágenes *ImageJ*.

**Tabla 2.** Anticuerpos primarios (IHQ: inmunohistoquímica; WB: *Western blot*).

| Anticuerpo          | Casa comercial  | Especie                | Dilución | Aplicación |
|---------------------|---|------------------------|----------|------------|
| AKT                 | <i>Cell Signaling</i><br>#2920                                | Ratón<br>(monoclonal)  | 1/1000   | WB         |
| fosfo-AKT<br>(S473) | <i>Cell Signaling</i><br>#4060                                | Conejo<br>(monoclonal) | 1/1000   | WB         |
| fosfo-AKT<br>(T308) | <i>Cell Signaling</i><br>#13038                               | Conejo<br>(monoclonal) | 1/1000   | WB         |
| Cdh1 (clon<br>AR38) | Cedido por el Dr.<br>Gannon ( <i>Cancer<br/>Research UK</i> ) | Ratón<br>(monoclonal)  | 1/10     | WB         |
| CEBP $\alpha$       | <i>Cell Signaling</i><br>#8178                                | Conejo<br>(monoclonal) | 1/1000   | WB         |
| CEBP $\beta$        | <i>Abcam</i><br>ab18336                                       | Ratón<br>(monoclonal)  | 1/1000   | WB         |
| CEBP $\delta$       | <i>Abcam</i><br>ab65081                                       | Conejo<br>(policlonal) | 1/1000   | WB         |

## ***-Material y métodos-***

|                                |                                 |                        |         |        |
|--------------------------------|---------------------------------|------------------------|---------|--------|
| <b>FoxO1</b>                   | <i>Cell Signaling</i><br>#2880  | Conejo<br>(monoclonal) | 1/1000  | WB     |
| <b>GAPDH</b>                   | <i>Abcam</i><br>ab8245          | Ratón<br>(monoclonal)  | 1/10000 | WB     |
| <b>p21</b>                     | <i>Santa Cruz</i><br>sc-6246    | Ratón<br>(monoclonal)  | 1/250   | WB     |
| <b>PGC1<math>\alpha</math></b> | <i>Invitrogen</i><br>PA5-38021  | Conejo<br>(policlonal) | 1/1000  | WB     |
| <b>PPAR<math>\gamma</math></b> | <i>Cell Signaling</i><br>#2435  | Conejo<br>(monoclonal) | 1/1000  | WB     |
| <b>PTEN</b>                    | <i>Cell Signaling</i><br>#9188  | Conejo<br>(monoclonal) | 1/1000  | WB     |
| <b>Rb</b>                      | <i>Abcam</i><br>ab39689         | Conejo<br>(policlonal) | 1/500   | WB     |
| <b>fosfo-Rb</b>                | <i>Cell Signaling</i><br>#9308  | Conejo<br>(policlonal) | 1/1000  | WB     |
| <b>TOMM20</b>                  | <i>Abcam</i><br>Ab56783         | Ratón<br>(monoclonal)  | 1/1000  | WB     |
| <b>Tubulina</b>                | <i>Sigma</i>                    | Ratón<br>(monoclonal)  | 1/3000  | WB     |
| <b>UCP1</b>                    | <i>Abcam</i><br>ab10983         | Conejo<br>(policlonal) | 1/1000  | WB/IHQ |
| <b>UCP1</b>                    | <i>Cell Signaling</i><br>#14670 | Conejo<br>(monoclonal) | 1/1000  | WB     |
| <b>VDAC</b>                    | <i>Abcam</i><br>ab34726         | Conejo<br>(policlonal) | 1/1000  | WB     |

Para poder reutilizar las membranas e incubarlas con varios anticuerpos de la misma especie, en algunos casos se incubó la membrana durante 10 minutos en 0.5 M de NaOH con objeto de eliminar los anticuerpos pegados a su superficie.

## 6. Consumo de oxígeno.

El consumo de oxígeno mitocondrial se midió a 37°C en una cámara termostatazada con agua mediante un electrodo de oxígeno (O<sub>2</sub>) de tipo Clark (*Rank Brothers*). El electrodo se calibró con el medio de cultivo saturado de oxígeno con aire (6.7 mg/L de oxígeno en nuestras condiciones de presión y temperatura, considerándose el valor obtenido como 100% de oxígeno), y desoxigenado tras añadir ditionito sódico (y considerando ese valor como 0%).

**Tabla 3.** Anticuerpos secundarios (IHQ: inmunohistoquímica; WB: *Western blot*).

| <b>Anticuerpo</b>                               | <b>Casa comercial</b> | <b>Dilución</b> | <b>Aplicación</b> |
|---|-----------------------|-----------------|-------------------|
| <b>anti-ratón/conejo (IgG)<br/>HRP</b>          | <i>Dako</i>           | 1/10.000        | WB                |
| <b>anti-conejo (IgG)<br/>Cy3</b>                | <i>Invitrogen</i>     | 1/5000          | IHQ               |
| <b>anti-ratón (cadenas ligeras IgG)<br/>HRP</b> | <i>Jackson</i>        | 1/5000          | WB                |

Una vez recogidas por tripsinización, las células se contaron en una cámara de Neubauer, se centrifugaron (1500 rpm, 5 minutos) y se resuspendieron en 1 ml de medio de mantenimiento adipogénico. La determinación se llevó a cabo introduciendo el mililitro de células en la cámara del electrodo, y registrando la evolución en la concentración de O<sub>2</sub> en el medio durante 10 minutos. La pendiente de consumo de oxígeno obtenida para cada cultivo se utilizó para cuantificar su consumo de oxígeno por célula y minuto.

## 7. Potencial de membrana.

La evaluación del potencial de membrana se llevó a cabo por citometría de flujo, utilizando el kit comercial *MitoProbe™ DiIC1 Assay Kit for Flow Cytometry* (*Thermo*). Las células, aún adheridas a la placa, se incubaron con una concentración 10 µM de la sonda DiIC (1,1', 3, 3, 3', 3' - hexametilindodicarbo-yoduro de cianina) a 37°C durante 15 minutos. Esta sonda se acumula en las mitocondrias polarizadas debido a su carácter catiónico, por lo que su acumulación es un índice de polarización mitocondrial. Tras la incubación con la sonda, las células se levantaron, evitando la utilización de tripsina, se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 minutos y los precipitados se resuspendieron en 500 µl de PBS. Rápidamente, las células se pasaron vivas por el citómetro de flujo (ver apartado 12 en 'Material y métodos').

## ***-Material y métodos-***

### **8. Carga mitocondrial.**

La determinación de la densidad mitocondrial se realizó utilizando el kit comercial *MitoTracker™ Deep Red FM (Invitrogen)*. Se trataron las células en cultivo añadiendo al medio, sin suero, 100 nM de *MitoTracker<sup>o</sup>* (una sonda que penetra de forma pasiva en las mitocondrias) durante 30 minutos. Después, se recigeron por tripsinización y se fijaron con 4% de PFA durante 15 minutos. Tras centrifugar a 1500 rpm durante 5 minutos, el *pellet* celular se resuspendió en PBS y se pasó por el citómetro (ver apartado 12 en 'Material y métodos').

### **9. Medición indirecta de la fermentación láctica.**

Analizamos la fermentación láctica de la glucosa en los adipocitos mediante dos medidas indirectas: cuantificamos el consumo de glucosa (sustrato de la glucólisis) y la liberación de lactato (subproducto resultante de la fermentación láctica).

#### 9.1. Consumo de glucosa.

Tras 24 horas de cultivo con el medio de mantenimiento adipogénico, éste se centrifugó a 1500 rpm durante 5 minutos, y se recogió el sobrenadante. En él, se midió la concentración de glucosa, utilizando un glucómetro (*Accu-Chek<sup>a</sup>, Aviva*). La diferencia entre la concentración de glucosa inicial (4500 mg/l) y la restante en el medio tras 24 horas nos permitió calcular el consumo de glucosa de los adipocitos *in vitro*.

#### 9.2. Liberación de lactato.

En paralelo, se midió la concentración de lactato liberado al medio tras 24 horas. 30 µl del sobrenadante resultante de la centrifugación se mezclaron con 150 µl de la mezcla de reacción y 120 µl de agua. La mezcla de reacción estaba formada por 1 mg de NAD<sup>+</sup>, 6 µl de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) y 1 ml de tampón (0.5 M de glicina, 1 M de hidracina y 2 mM de EDTA).

El lactato presente en el medio se transformó en piruvato, en una reacción catalizada por LDH y donde el NAD<sup>+</sup> se redujo generando NADH. El NADH liberado se pudo cuantificar calculando su absorbancia a una longitud de onda de 340 nM en un espectrofotómetro (*Varioskan<sup>a</sup> Flash, Thermo*).

Así, tras añadir la enzima LDH, rápidamente se valoró la absorbancia de la mezcla a tiempo 0, y tras 4 horas, donde los niveles de NADH ya alcanzaron su máximo. Se calculó la diferencia de absorbancia entre los dos puntos (DAbs) y, aplicando la siguiente fórmula, se obtuvo la concentración de lactato en la muestra (µmol/ml):

### **10. Histología e inmunohistoquímica.**

Las muestras de tejido, tras ser fijadas en formol 4% (10% formalina) y mantenidas en frío en etanol al 70%, fueron procesadas por el Servicio de Patología Molecular Com-



parada, del Centro de Investigación del Cáncer (CIC, Salamanca): tallado, inclusión en parafina, y corte mediante microtomo (3-5  $\mu\text{m}$ ).

Para el estudio histológico, el mismo Servicio se encargó también de realizar la tinción de Hematoxilina & Eosina (H&E) y el montaje de los portaobjetos, quedando listos ya para su análisis en el microscopio (ver apartado 11 de 'Material y métodos').

El protocolo de inmunohistoquímica se realizó en el laboratorio, una vez el Servicio de Patología Molecular Comparada realizó los cortes y su montaje en el portaobjetos. El protocolo utilizado fue el siguiente: el desenmascaramiento antigénico tuvo lugar en tampón citrato (10 mM de citrato sódico, 0.05% de Tween-20, pH 6) hirviendo las muestras durante 10 minutos. Tras enfriar, las muestras se bloquearon durante 1 hora con 10% de suero de cabra y 0.05% de Tween-20 en PBS. Después, se incubaron con el anticuerpo primario correspondiente (**Tabla 2**), en la solución de bloqueo, durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente, las muestras se lavaron 3 veces (5 minutos cada lavado) con 1% de BSA y 0.05% de Tween-20 en PBS, y se incubaron con el anticuerpo secundario conjugado a fluorocromos (**Tabla 3**), también en la solución de bloqueo, durante 1 hora a temperatura ambiente. Por último, tras repetir los lavados y teñir con DAPI (0,5  $\mu\text{g/ml}$ ) para visualizar los núcleos, las preparaciones se montaron con *ProLong® Gold* (*Life Technologies*), colocando un cubreobjetos sobre la muestra.

### **11. Microscopía.**

#### 11.1. Microscopía óptica de campo claro.

Para la observación y toma de imágenes de los MEFs, preadipocitos o adipocitos en cultivo se utilizó un microscopio óptico de campo claro Leica DM IRB, acoplado a una cámara digital Nikon DS-Fi1. Para la adquisición de imágenes se utilizó el programa *NIS-Elements*.

En el análisis de las tinciones de H&E se utilizó un microscopio óptico Olympus BX51TF acoplado a una cámara digital Olympus DP70. Las imágenes se obtuvieron utilizando el *software MetaMorph®* (*Molecular Devices*), y su procesamiento y, en su caso, la cuantificación del área de los adipocitos mediante el programa *ImageJ*.

#### 11.2. Microscopía de fluorescencia.

Para la visualización y captura de imágenes de inmunohistoquímica se usó el microscopio de fluorescencia vertical Nikon Eclipse 90i, equipado con una cámara digital *Hamamatsu* modelo ORCA-ER. En cuanto a la captura de imágenes, el programa informático utilizado fue *MetaMorph®* (*Molecular Devices*) y el posterior procesamiento y análisis de las fotografías se realizó a través del *ImageJ*.

## ***-Material y métodos-***

### **12. Citometría de flujo.**

El análisis por citometría de flujo permitió cuantificar la expansión clonal, el potencial de membrana y la carga mitocondrial.

En el estudio de la expansión clonal (proliferación), las células fijadas con 4% de PFA se permeabilizaron 15 minutos con saponina, y tras su lavado, se procedió a revelar las células EdU+ utilizando el kit comercial *Click-iT*<sup>®</sup> EdU (*Molecular Probes*). La detección se basa en una reacción catalizada por cobre en la que se produce la unión covalente entre una azida acoplada a un fluorocromo (Alexa Fluor<sup>®</sup> 488) y el EdU incorporado al DNA. La preparación de las muestras se completó con la tinción del DNA con yoduro de propidio (10 µg/ml), añadiendo de manera simultánea RNasa (100 µg/ml) y manteniendo las muestras a 37°C durante 30 minutos protegidas de la luz. Finalmente, se pasaron las células por el citómetro de flujo.

Para examinar el potencial de membrana o el volumen mitocondrial, tras recoger las muestras (y fijarlas, en su caso), éstas se pasaron por el citómetro de flujo.

El citómetro utilizado fue un *FACSCalibur*<sup>™</sup> (BD) equipado con 4 canales de detección y asociado al programa informático *CellQuest*<sup>™</sup> Pro (BD). Se adquirieron, siempre que fue posible,  $1 \times 10^5$  eventos por muestra analizada. El análisis posterior de los datos se realizó con el programa informático *FlowJo*.

### **13. Mutagénesis dirigida.**

Partimos de un plásmido, adquirido en *OriGene Technologies*, que codifica la proteína UCP1 silvestre murina (presenta su caja D, de secuencia 'RIGL'). Por mutagénesis dirigida, se mutó la secuencia nucleotídica que codifica la caja D (la secuencia original 5'-AGGATTGGCCTC-3' se convirtió en 5'-GCCATTGGCGCC-3'), obteniendo un plásmido que codifica UCP1 con su caja D mutada, de secuencia 'AIGA', no funcional. La mutagénesis dirigida se llevó a cabo utilizando el kit *QuikChange Lightning Site-Directed Mutagenesis Kit* (*Agilent Technologies*), siguiendo las instrucciones del fabricante. Los oligonucleótidos que condujeron la mutación (**Tabla 4**), fueron sintetizados por la empresa *Biomers*.

El plásmido original (que llamaremos 'UCP1 RXXL') y el mutante ('UCP1 AXXA') fueron secuenciados por la empresa *GATC Biotech* (utilizando los oligonucleótidos de la **Tabla 5**) para comprobar que su secuencia era correcta. Con los plásmidos se transformaron células ultracompetentes DH5a, y se purificó el cDNA plasmídico de las colonias transformadas utilizando el kit *Qiafilter Plasmid Midi Kit* (*Qiagen*) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los cDNA resultantes se cuantificaron en el *NanoDrop* (*Thermo*), y se enviaron a secuenciar de nuevo (por la empresa *GATC Biotech*, utilizando los oligonucleótidos de la **Tabla 5**), para comprobar que las secuencias eran correctas y los plásmidos estaban listos para su uso.

**Tabla 4.** Oligonucleótidos utilizados para la mutagénesis dirigida. En rojo, secuencia codificante de la caja D mutada, señalizándose en azul los nucleótidos que generan la mutación.

| <b>Nucleótido</b>  | <b>Casa comercial</b> | <b>Secuencia</b>  |
|--------------------|-----------------------|---|
| <b>Mut-UCP1-Fw</b> | <i>Biomers</i>        | TACTCTTGGACTGAGTCGTAG <b>GCGCCAATGGC</b><br>GAGTGAGGCAAAGCTGATTTG |
| <b>Mut-UCP1-Rv</b> | <i>Biomers</i>        | CAAATCAGCTTTGCCTCACTC <b>GCCATTGGCGCC</b><br>TACGACTCAGTCCAAGAGTA |

**Tabla 5.** Oligonucleótidos utilizados para la secuenciación de UCP1.

| <b>Nucleótido</b>          | <b>Casa comercial</b> | <b>Secuencia</b>     |
|----------------------------|-----------------------|----------------------|
| <b>Sec-UCP1-Fw (VP1.5)</b> | <i>Origene</i>        | GGACTTTCCAAAATGTCTG  |
| <b>Sec-UCP1-Rv (XL39)</b>  | <i>Origene</i>        | ATTAGGACAAGGCTGGTGGG |
| <b>Sec-mutUCP1-Fw</b>      | <i>Sigma</i>          | GCCTACAGAGGTCGTGAAGG |
| <b>Sec-mutUCP1-Rv</b>      | <i>Sigma</i>          | AACTCTGTAAGCATTGTAGG |

## 14. Ensayos *in vivo*.

### 14.1. Peso y fotografías de los animales y tejidos.

En los experimentos *in vivo* se utilizaron solamente machos, de las edades indicadas. Los animales se sacrificaron y pesaron, en condiciones basales o tras los diferentes tratamientos, y se diseccionaron los tejidos (grasa blanca perigonadal o epididimal, 'WAT'; grasa blanca retroperitoneal, 'WAT retroperitoneal'; grasa blanca perirrenal, 'WAT perirrenal'; grasa blanca subcutánea inguinal, 'Subcut'; grasa marrón, 'BAT'; hígado), pesándolos en una balanza de precisión. El peso del tejido siempre se normalizó frente al peso del animal, calculando el porcentaje de peso que el tejido representaba en el peso corporal. Además, se tomaron fotografías, tanto de los animales como de los tejidos, utilizando una cámara réflex Cannon EOS 600D.

### 14.2. Procesamiento de los tejidos.

Para posteriores estudios de mRNA o proteína, los tejidos fueron congelados en N<sub>2</sub> líquido y mantenidos a -80°C. En cambio, si su destino era el análisis histológico o

## ***-Material y métodos-***

inmunohistoquímico, los tejidos se sumergieron en formol (4% de formalina) durante 24 horas, y fueron mantenidos luego en etanol al 70% a 4°C.

### 14.3. Dieta grasa.

Para inducir el desarrollo de la obesidad, los animales se alimentaron durante 8 semanas con una dieta rica en grasa (*Research Diets™*), siguiendo la evolución de su peso semanalmente.

### 14.4. Control de la ingesta.

Se siguió la cantidad de comida (en dieta grasa) ingerida durante 8 semanas, calculando semanalmente la diferencia de peso entre el pienso provisto inicialmente y el no ingerido.

### 14.5. Tolerancia al frío.

Durante 10 días, se mantuvo a los animales en una cámara fría a 4-6°C, manteniendo los ciclos de luz de 12 horas. A diferentes tiempos, se midió la temperatura media de la superficie de la piel en la zona interescapular, previamente depilada, mediante la obtención de termografías. La cámara termográfica (*FLIR E50*) fue amablemente cedida por la Oficina Verde de la Universidad de Salamanca, y las termografías (3 por animal) fueron analizadas mediante el programa asociado *FLIR<sup>o</sup>*. En paralelo, se midió la temperatura rectal mediante un termómetro BAT-12 (*Physitemp*), acoplado a una sonda rectal específica para ratones RET-3 (*Physitemp*).

### 14.6. Estimulación b-adrenérgica.

De forma diaria, y a lo largo de 7 días, se inyectó intraperitonealmente una solución estéril del agonista b-adrenérgico CL316243 (*Abcam*) disuelto en PBS. La dosis utilizada fue de 10 mg de compuesto por kg de animal.

### 14.7. Curva de tolerancia a la glucosa.

Después de un ayuno de 13-14 horas, se midió la glucosa basal sanguínea a partir de una gota de sangre de la cola, utilizando un glucómetro (*Accu-Chek<sup>a</sup>, Aviva*). Intraperitonealmente, se inyectó una solución estéril de glucosa en PBS (2 gramos de glucosa por kg de animal), y se evaluó de nuevo la glucosa sanguínea a distintos tiempos.

## **15. Técnicas de mRNA.**

### 15.1. Aislamiento de adipocitos maduros de WAT.

Se diseccionó la grasa blanca perigonadal y se trituró con ayuda de unas tijeras y una hoja de bisturí. El tejido se digirió incubándolo durante 1 hora a 37°C y en *agitación en el tampón de digestión* (2.5 mM de glucosa, 2% de FBS, 200 µM de adenosina (*Sigma*) y 1 mg/ml de colagenasa tipo A (*Roche*) en Krebs-Ringer HEPES). La com-

posición del tampón Krebs-Ringer HEPES fue la siguiente: 120 mM de NaCl, 4.7 mM de KCl, 2.2 mM de  $\text{CaCl}_2$ , 10 mM de HEPES, 1.2 mM de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  y 1.2 mM de  $\text{MgSO}_4$ . Tras la digestión, se añadió un volumen de tampón de lavado (2% de FBS y 200  $\mu\text{M}$  de adenosina en Krebs-Ringer HEPES), y la suspensión se pasó a través de un filtro de nylon de 300  $\mu\text{M}$  de poro (*pluriSelect*). El filtrado se centrifugó a 150 x g durante 8 minutos, dando lugar a la formación de una capa flotante de adipocitos. Éstos se transfirieron a un nuevo tubo, añadiendo 3-4 volúmenes de tampón de lavado, meciendo el tubo y resuspendiendo muy suavemente. Se volvió a repetir la misma centrifugación, y los adipocitos se traspasaron a un tubo nuevo. Inmediatamente se procedió a la purificación de su mRNA.

### 15.2. Purificación del mRNA.

En adipocitos aislados o tejidos grasos, la purificación de mRNA se realizó por columna utilizando el kit comercial *RNeasy Lipid Tissue Mini Kit* (Qiagen), siguiendo las instrucciones del fabricante. Para células en cultivo o tejidos no grasos, dicha purificación se llevó a cabo utilizando el kit comercial *RNeasy Mini Kit* (Qiagen), siguiendo también las instrucciones del fabricante. El mRNA purificado se cuantificó en el *Nano-Drop* (Thermo), se congeló en hielo seco y se conservó a  $-80^\circ\text{C}$ .

### 15.3. PCR cuantitativa a tiempo real (q-RT-PCR).

#### 15.3.1. Preparación de las reacciones.

Se llevó a cabo utilizando el mRNA purificado, la pareja de oligonucleótidos específica para cada gen diana (**Tabla 6**) y el kit comercial *SYBR® Green RNA-to-Ct™ 1-Step Kit* (Applied Biosystems™), que realiza la transcripción reversa del gen diana y su amplificación en un mismo paso.

#### 15.3.2. PCR cuantitativa a tiempo real.

Las reacciones se cargaron en una placa *twin.tec® 96 real-time PCR Plate* (Eppendorf), analizando cada una de las muestras por triplicado. La placa se selló con un plástico óptico adhesivo, y después de una breve centrifugación, se cargó en el equipo *Mastercycler® RealPlex<sup>2</sup>* (Eppendorf). Las condiciones de PCR fueron, en todos los casos, las indicadas en la **Tabla 7**.

#### 15.3.3. Cuantificación de la expresión génica.

De todos los valores analizados por el programa, nos quedamos con los valores umbral del ciclo (valores  $C_T$ , *threshold cycle*). Éstos se determinan identificando el ciclo en el cual la emisión de la intensidad del marcador fluorescente atraviesa el punto umbral, por encima del ruido de fondo en la fase exponencial de la reacción, y son los valores que se utilizaron para calcular la expresión génica relativa.

El método seleccionado para determinar la expresión relativa de los distintos genes diana fue el denominado delta-delta  $C_T$  ( $\text{DDC}_T$ ) o  $2^{-\Delta\Delta C_T}$ , desarrollado por Applied Biosystems™ (Pfaffl, 2004). Su objetivo no es determinar de forma absoluta el nivel

## -Material y métodos-

**Tabla 6.** Oligonucleótidos utilizados en la PCR cuantitativa.

| Nucleótido       | Casa comercial | Secuencia               |
|------------------|----------------|-------------------------|
| <b>Actina-Fw</b> | <i>Sigma</i>   | GGCTGTATTCCCCTCCATCG    |
| <b>Actina-Rv</b> | <i>Sigma</i>   | CCAGTTGGTAACAATGCCATGT  |
| <b>Cdh1-Fw</b>   | <i>Thermo</i>  | GTTTCAGAGATGCGGAGAACC   |
| <b>Cdh1-Rv</b>   | <i>Thermo</i>  | CAGGCCGTCTTTGCCATTG     |
| <b>UCP1-Fw</b>   | <i>Sigma</i>   | GGCCCTTGTAACAACAAAATAC  |
| <b>UCP1-Rv</b>   | <i>Sigma</i>   | GGCAACAAGAGCTGACAGTAAAT |

**Tabla 7.** Condiciones de la PCR cuantitativa a tiempo real (q-RT-PCR).

(1) Depende de la T<sub>m</sub> de los oligonucleótidos. En nuestro caso, para todos ellos utilizamos las mismas condiciones.

(2) Es opcional, y sirve para detectar amplificaciones inespecíficas.

| Etapa                   | Paso  | Temp. | Tiempo      |
|-------------------------|---|-------|-------------|
| <b> Holding </b>        | Transcripción reversa   | 48°C  | 30 minutos  |
| <b> Holding </b>        | Activación de <i>AmpliTaq Gold® DNA polymerase Ultra Pure</i> | 95°C  | 10 minutos  |
| <b> 40 ciclos </b>      | Desnaturalización   | 95°C  | 15 segundos |
|                         | Anillamiento y extensión(1)                                   | 60°C  | 1 minuto    |
| <b> Melt curve (2) </b> | Desnaturalización   | 95°C  | 15 segundos |
|                         | Anillamiento  | 60°C  | 15 segundos |
|                         | Desnaturalización   | 95°C  | 15 segundos |

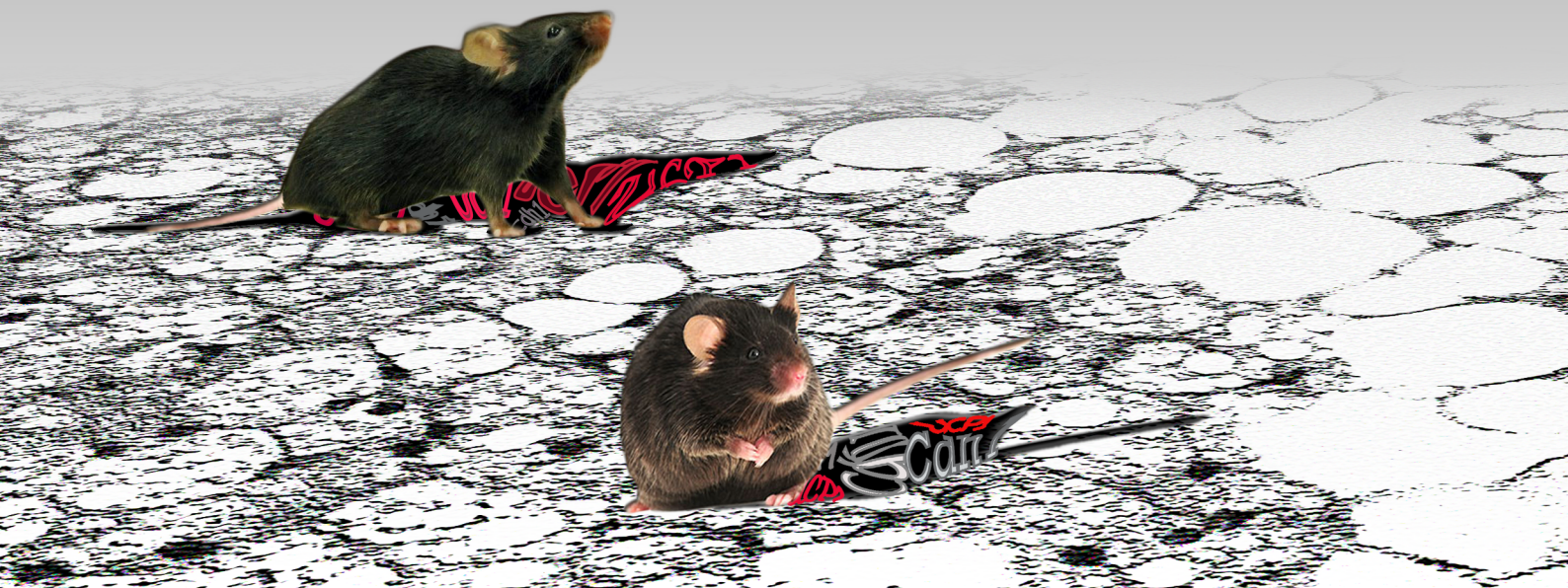
de mRNA, sino detectar diferencias cuantitativas en la expresión del gen diana en distintas células o condiciones. Además, la expresión del gen diana en cada condición se normaliza frente a uno o más genes de referencia (comúnmente denominados *housekeeping genes*), genes endógenos escogidos porque su expresión es constante en todas las condiciones y actúan como control interno. Como gen de referencia endógeno se utilizó la  $\beta$ -actina.

### **16. Tratamiento de datos y análisis estadísticos.**

Para el procesamiento, obtención de gráficas y análisis estadístico de los datos obtenidos se utilizó el paquete estadístico *Prism 6 (GraphPad)*. Se procuró contar con, al menos, 3 réplicas biológicas independientes para los experimentos *in vitro*. En prácticamente todos los experimentos *in vivo*, realizados siempre en machos, se analizó un número mínimo de 6 animales para cada genotipo y condición.

Ya que todos los valores analizados se ajustaron a una distribución normal, el análisis estadístico aplicado fue la 't de Student'. Se consideraron diferencias estadísticamente significativas cuando el p-valor fue menor de 0,05 [\* ( $p < 0,05$ ); \*\* ( $p < 0,01$ ); \*\*\* ( $p < 0,001$ ); \*\*\*\* ( $p < 0,0001$ )].

# Resultados







## **-Resultados-**

### **1. Papel de Cdh1 en adipogénesis.**

No existe en la bibliografía ninguna evidencia sobre el posible papel de Cdh1 en adipogénesis. Para intentar esclarecer esta cuestión y averiguar si Cdh1 juega algún rol pro- o antiadipogénico, establecimos dos tipos de cultivos celulares deficientes en Cdh1 sobre los cuales se indujo la adipogénesis:

- Cultivos primarios de fibroblastos embrionarios murinos (MEFs) a partir de embriones control [WT; **Cdh1(+/lox)**] y embriones deficientes en Cdh1 o Cdh1KO (Cdh1(-/lox); Sox2-Cre), a los que llamamos para simplificar **Cdh1(-Δ)**.
- Cultivos primarios de preadipocitos aislados a partir de la grasa subcutánea inguinal de animales de 2-3 meses de edad, de los genotipos previamente descritos para MEFs [**Cdh1(+/lox)** y **Cdh1(-Δ)**].

En ambos tipos celulares se indujo la adipogénesis *in vitro* mediante el tratamiento hormonal con el *cocktail* DMI (ver 'Material y métodos'), y se mantuvo la diferenciación durante un período variable, de entre 8-14 días, hasta obtener adipocitos maduros.

#### 1.1. La ausencia de Cdh1 incrementa la adipogénesis *in vitro*.

La visualización al microscopio óptico de MEFs (células fusiformes) sometidos a la estimulación adipogénica durante 12 días mostró una mayor generación de adipocitos (células esféricas con multitud de gotas lipídicas en su interior) en ausencia de Cdh1 (**Figura 8A**). Al finalizar la diferenciación, estos mismos cultivos se fijaron y tiñeron con Oil Red-O (ORO), un colorante lipídico de color rojo que tiñe diferencialmente los adipocitos. Así, se consiguieron cultivos en placa con multitud de puntos rojos (**Figura 8B**), y el incremento de adipogénesis en ausencia de Cdh1 se tradujo en una mayor tinción con ORO. Finalmente, el colorante se extrajo y valoró espectrofotométricamente, lo que permitió cuantificar la presencia de adipocitos en los distintos cultivos. Como muestra la **Figura 8C**, la diferenciación adipogénica resultó significativamente mayor tanto en MEFs como en preadipocitos primarios carentes de Cdh1.

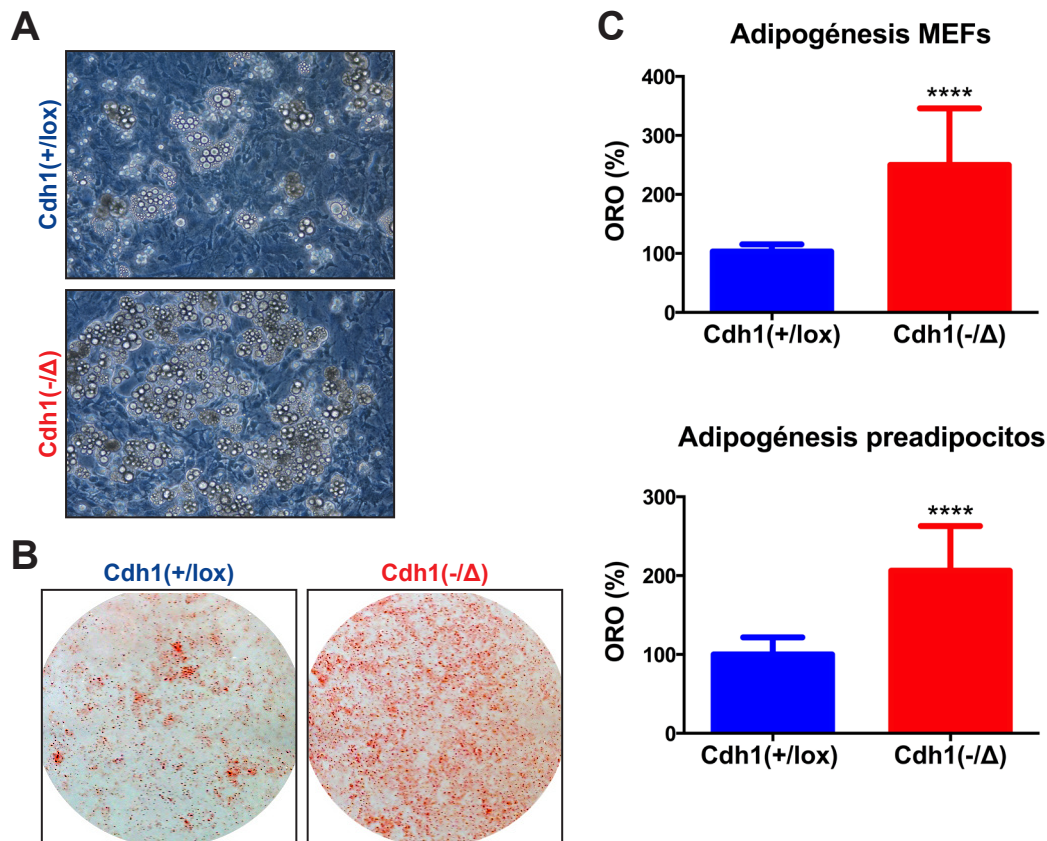
El análisis bioquímico de la adipogénesis en MEFs WT y Cdh1KO confirmó estos resultados, ya que en ausencia de Cdh1 aumentaron los niveles proteicos de los factores de transcripción CEBPa y PPARg, principales efectores de la ruta adipogénica (**Figura 12**).

**En conjunto, estos resultados evidencian un papel antiadipogénico de Cdh1.**

#### 1.2. La adipogénesis en ausencia de Cdh1 cursa con una mayor expansión clonal.

Un proceso esencial en la adipogénesis murina es la expansión clonal, un pequeño período proliferativo consistente en 1-2 ciclos de división celular que tiene lugar durante los primeros días tras la estimulación hormonal. Finalizada la expansión clonal, las células vuelven a salir de ciclo para su diferenciación terminal.

Para valorar la expansión clonal analizamos la proliferación de los cultivos durante los



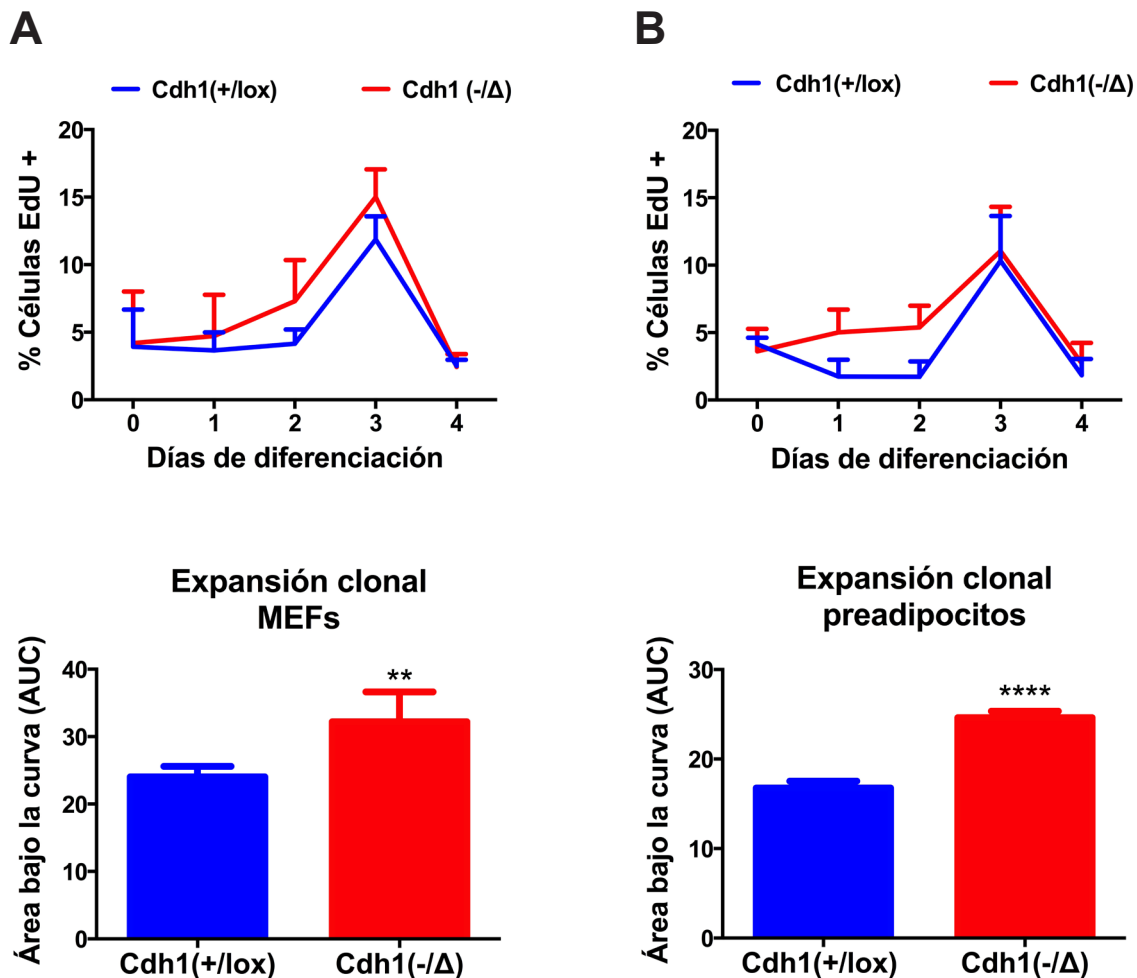
**Figura 8. Aumento de la adipogénesis *in vitro* en ausencia de Cdh1, en MEFs y preadipocitos primarios.** **A.** Se muestran imágenes representativas de microscopía óptica de MEFs primarios Cdh1(+/-lox) y Cdh1(-/-Δ) diferenciados a adipocitos durante 12 días. **B.** Escaneo de placas con cultivos de MEFs primarios de los genotipos indicados diferenciados a adipocitos durante 12 días, fijados y teñidos con Oil Red-O (ORO). **C.** Cuantificación de la adipogénesis en cultivos de MEFs (panel superior, n=20) o preadipocitos primarios (panel inferior, n=12) de los genotipos indicados (control y deficientes en Cdh1). La cuantificación se realizó extrayendo y valorando el ORO espectrofotométricamente, y considerando como 100% los valores obtenidos en los cultivos control. \*\*\*\*p<0,0001

4 primeros días de la adipogénesis. Para ello, se marcaron las células durante 1 hora con EdU, un análogo de timidina que sólo incorporan las células que están replicando su DNA, es decir, aquellas que se encuentran en fase S. Tras el marcaje, se cuantificó por citometría de flujo el porcentaje de células positivas para EdU.

Tomando como día 0 el inicio de la estimulación adipogénica, los perfiles de proliferación en MEFs (**Figura 9A**) y preadipocitos primarios (**Figura 9B**) mostraron que la expansión clonal tiene su pico máximo a día 3 y finaliza a día 4. En ambos casos, las células carentes de Cdh1 presentaron mayor proliferación a lo largo del proceso adipogénico, como demuestra la cuantificación del área bajo la curva (AUC) de dichos perfiles (**Figura 9**).

El incremento de la expansión clonal en la adipogénesis de células Cdh1KO también se evidenció bioquímicamente. En ausencia de Cdh1, los niveles de fosfo-Rb (pRb) aparecieron incrementados durante los primeros días de la diferenciación (**Figura 12**). La hiperfosforilación de Rb (forma inactiva) desencadena la activación de E2F y la entrada en fase S, por lo que este resultado apoya una **mayor proliferación durante la diferenciación adipogénica de las células carentes de Cdh1**.

## -Resultados-



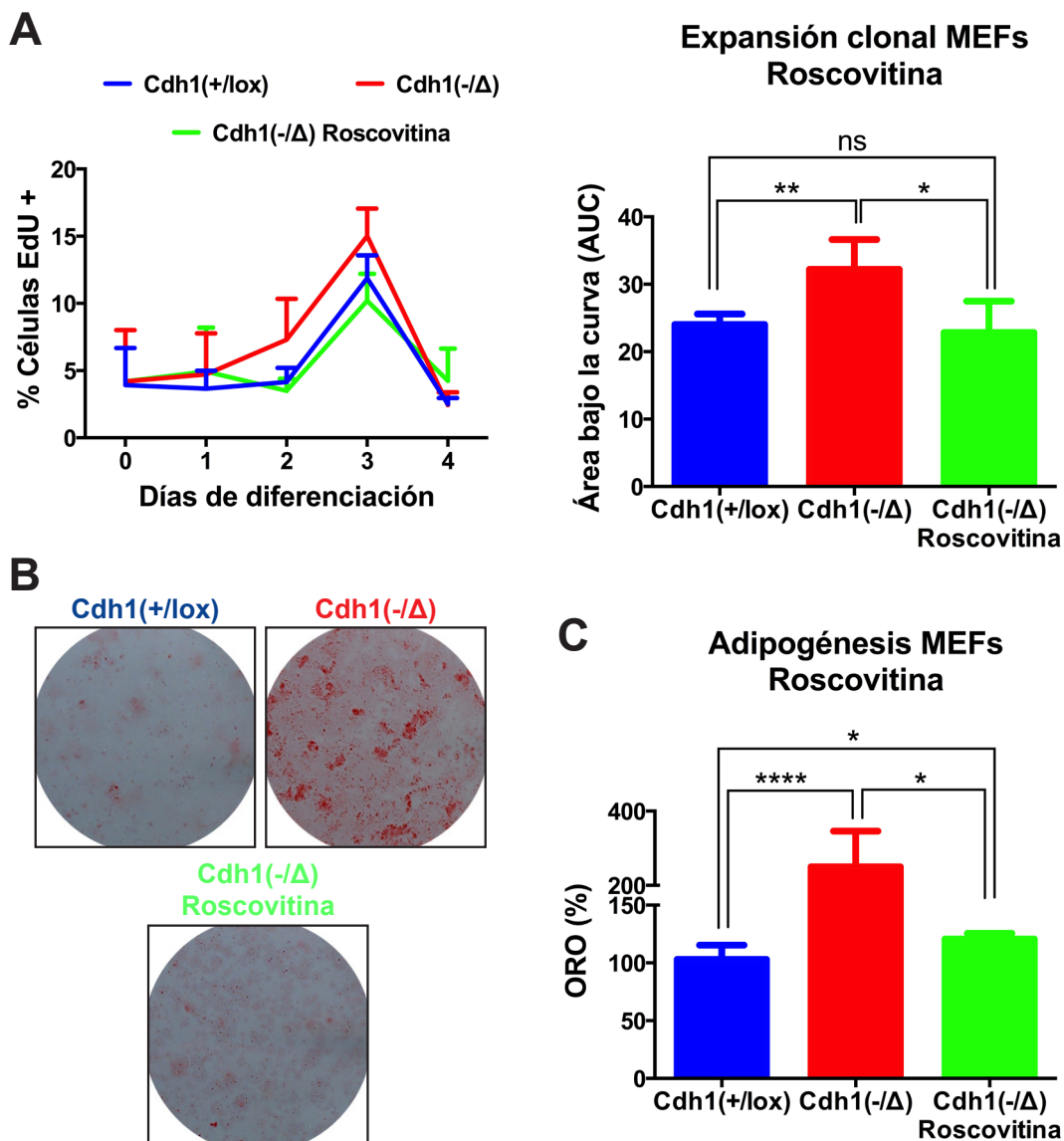
**Figura 9.** La adipogénesis de MEFs y preadipocitos primarios carentes de Cdh1 cursa con una expansión clonal incrementada. Cuantificación, por citometría de flujo, del porcentaje de células positivas para EdU durante los 4 primeros días de la diferenciación adipogénica (paneles superiores), en MEFs (**A**, n=7) y preadipocitos primarios (**B**, n=3) Cdh1(+/-lox) y Cdh1(-/-Δ). A partir de estos perfiles se calculó el área bajo la curva (AUC, paneles inferiores). \*\*p<0,01; \*\*\*\*p<0,0001

### 1.3. El exceso de expansión clonal es responsable, pero sólo parcialmente, del incremento de adipogénesis en ausencia de Cdh1.

Al comprobar que la adipogénesis de las células Cdh1KO cursa con un aumento en la expansión clonal, nos preguntamos si éste era el único mecanismo responsable de su potenciación adipogénica. Es decir, si el incremento de la adipogénesis en ausencia de Cdh1 se debía únicamente al aumento en la expansión clonal. Para resolver esta cuestión, se normalizaron los niveles de proliferación durante la expansión clonal adipogénica de los MEFs carentes de Cdh1. Aplicamos para ello el tratamiento con roscovitina, un inhibidor de la actividad Cdk, durante la expansión clonal (4 primeros días tras la inducción adipogénica). Así, comprobamos que el tratamiento con roscovitina durante la expansión clonal en MEFs Cdh1KO reduce la proliferación en estas células hasta niveles similares a los observados en MEFs WT (**Figura 10A**).

A continuación, se evaluó si la normalización de la expansión clonal revertía el exceso

adipogénico en ausencia de Cdh1. Para ello, se cuantificó la adipogénesis, tras 12 días de diferenciación, de MEFs WT, MEFs Cdh1KO y MEFs Cdh1KO tratados con roscovitina durante la expansión clonal. Como muestra la **Figura 10B**, el tratamiento resultó en una importante reducción de la adipogénesis en MEFs carentes de Cdh1, que, sin embargo, siguió siendo superior a la de los MEFs control. Es decir, la normalización de la expansión clonal no revirtió completamente el incremento adipogénico en ausencia de Cdh1.



**Figura 10. El exceso de expansión clonal es responsable, pero sólo en parte, del incremento adipogénico en ausencia de Cdh1.** **A.** Cuantificación (panel izquierdo), por citometría de flujo, del porcentaje de células positivas para EdU en MEFs primarios Cdh1(+/-lox), Cdh1(-/-Δ) y Cdh1(-/-Δ) tratados con 18 μM de roscovitina durante los 4 primeros días de la adipogénesis. A partir de estos perfiles se calculó el AUC (panel derecho, n=3). **B.** Se muestra el escaneo de placas donde se han mantenido cultivos, teñidos con ORO, de MEFs primarios de los genotipos y tratamiento indicados diferenciados a adipocitos durante 12 días. **(C)** Cuantificación de la adipogénesis en los mismos cultivos, considerando como 100% los valores obtenidos en los cultivos control [Cdh1(+/-lox)]. \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*\*p<0,0001

## **-Resultados-**

**Estos resultados indican que Cdh1 inhibe la adipogénesis actuando negativamente sobre la expansión clonal, y sugieren la existencia de otras actividades antiadipogénicas de Cdh1 independientes de este exceso proliferativo.**

1.4. La depleción de Cdh1 sólo durante la diferenciación terminal también incrementa la adipogénesis *in vitro*.

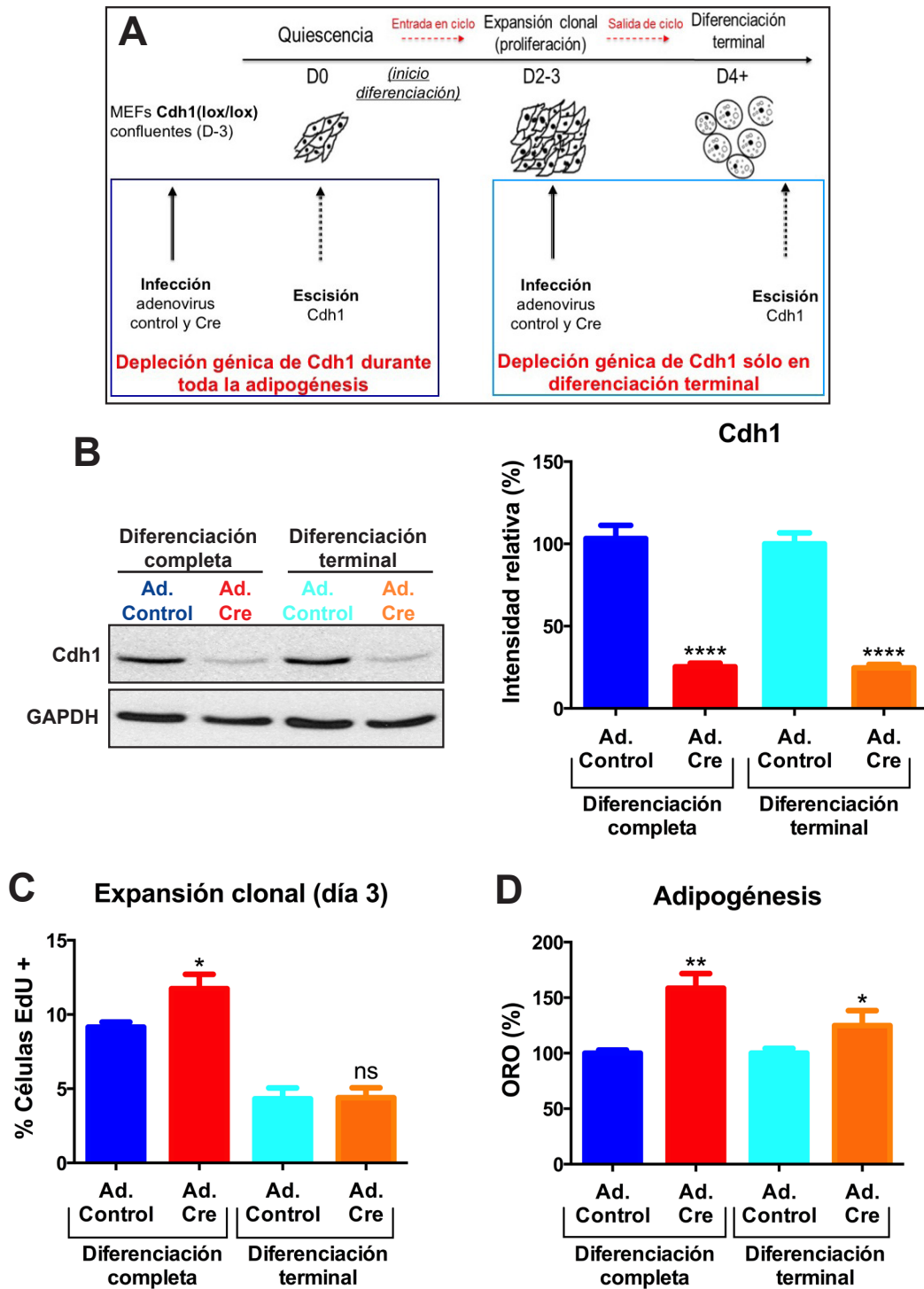
Tras la expansión clonal, las células salen de ciclo y continúan el proceso adipogénico en lo que se denomina 'diferenciación terminal'. Para comprobar si Cdh1 no sólo juega un papel en expansión clonal, sino también en diferenciación terminal, indujimos la depleción aguda y regulada temporalmente de Cdh1 durante la adipogénesis.

Para ello, se utilizaron MEFs condicionales Cdh1(lox/lox), que nos permitieron provocar la depleción aguda de Cdh1 mediante la infección con adenovirus portadores de la recombinasa Cre ('Ad. Cre'). Como control de la infección, utilizamos adenovirus vacíos ('Ad. Control'). Teniendo en cuenta que este sistema produce una depleción máxima y consistente de Cdh1 pasados tres días de la infección con los adenovirus, realizamos el siguiente diseño experimental (**Figura 11A**):

- Infectamos MEFs primarios Cdh1(lox/lox) con adenovirus control y Cre tres días antes de la inducción de la adipogénesis, para analizar el efecto de la depleción de Cdh1 durante todo el proceso adipogénico.
- Indujimos la diferenciación adipogénica de MEFs primarios Cdh1(lox/lox), y pasados dos días, las células se infectaron con adenovirus control y Cre. Así, se provocó la depleción génica de Cdh1 una vez finalizada ya la expansión clonal, es decir, sólo durante la diferenciación terminal.

Confirmamos que ambas infecciones reducen marcadamente la expresión de Cdh1 (**Figura 11B**). Comprobamos también que sólo la depleción inicial de Cdh1 provocó un aumento en la expansión clonal (**Figura 11C**), lo que validó la estrategia experimental. Finalmente, tras 12 días de diferenciación, cuantificamos la adipogénesis de los distintos MEFs infectados. Como era esperable, la depleción inicial de Cdh1 estimuló la adipogénesis, pero también lo hace, aunque en un grado menor, la depleción restringida a la diferenciación terminal (**Figura 11D**).

**Estos resultados sugieren fuertemente que Cdh1 inhibe la adipogénesis en sus dos etapas principales, frenando tanto la expansión clonal como la diferenciación terminal.**

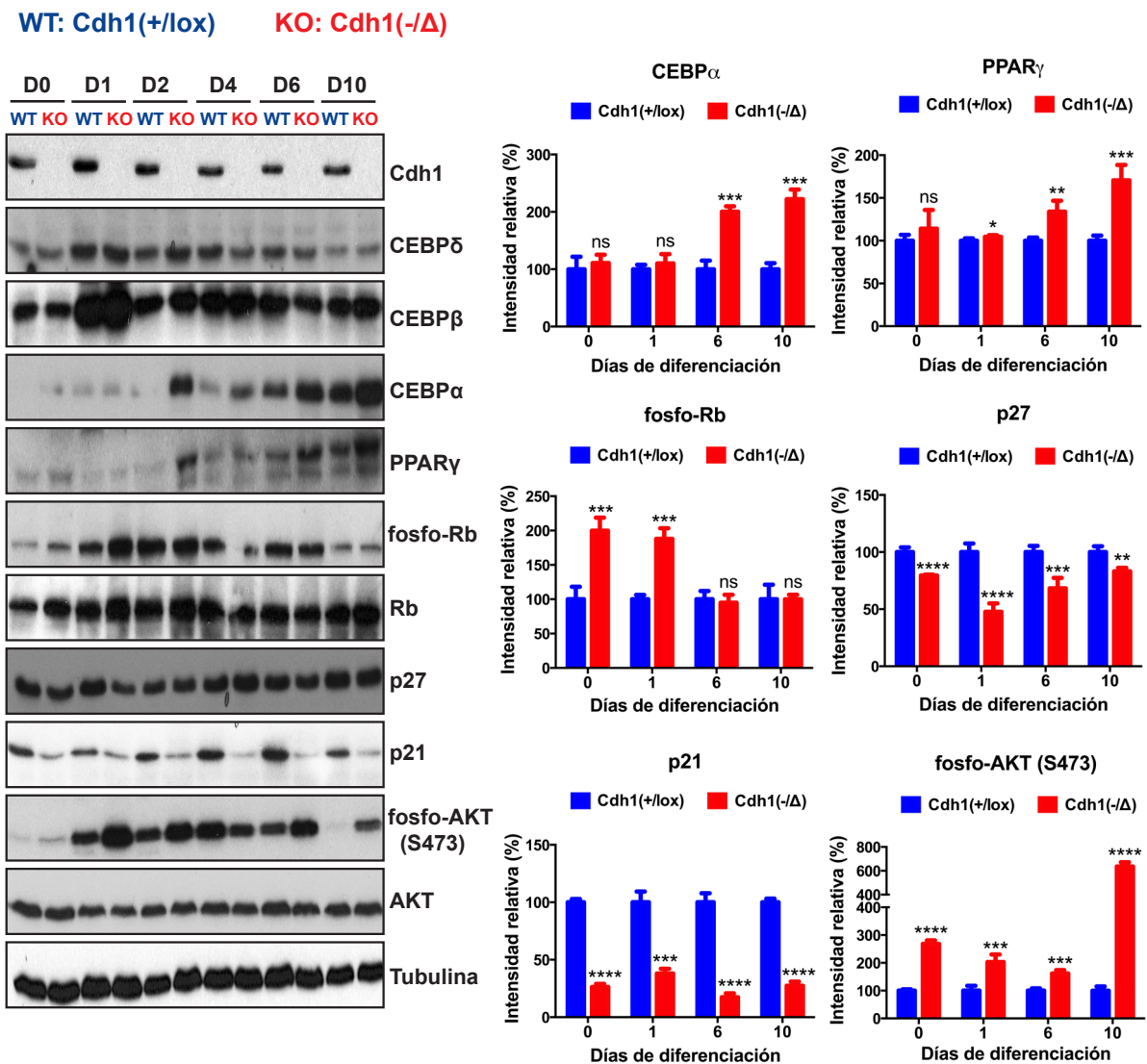


**Figura 11.** La ausencia de Cdh1 no sólo promueve la expansión clonal, sino que también da lugar a un aumento de la adipogénesis durante la diferenciación terminal. **A.** Representación esquemática de la estrategia experimental adoptada, basada en la infección con adenovirus de MEFs Cdh1(lox/lox), para estudiar el papel de Cdh1 durante la adipogénesis ('diferenciación completa'), o sólo en diferenciación terminal. **B.** Análisis, por *Western blot*, de los niveles proteicos de Cdh1 en lisados de células recogidas 3 días después de las distintas infecciones (izquierda), y cuantificación de la intensidad de las bandas, normalizando frente al control de carga y frente a las muestras de las infecciones control (derecha, n=3). **C.** Cuantificación, por citometría de flujo, del porcentaje de células positivas para EdU tras las distintas infecciones, en el tercer día de la adipogénesis (n=3). **D.** Cuantificación de la adipogénesis en estos mismos cultivos tras 12 días de diferenciación adipogénica, considerando como 100% los valores obtenidos en los cultivos infectados con adenovirus control (n=3). ns= no significativo; \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*\*p<0,0001

## -Resultados-

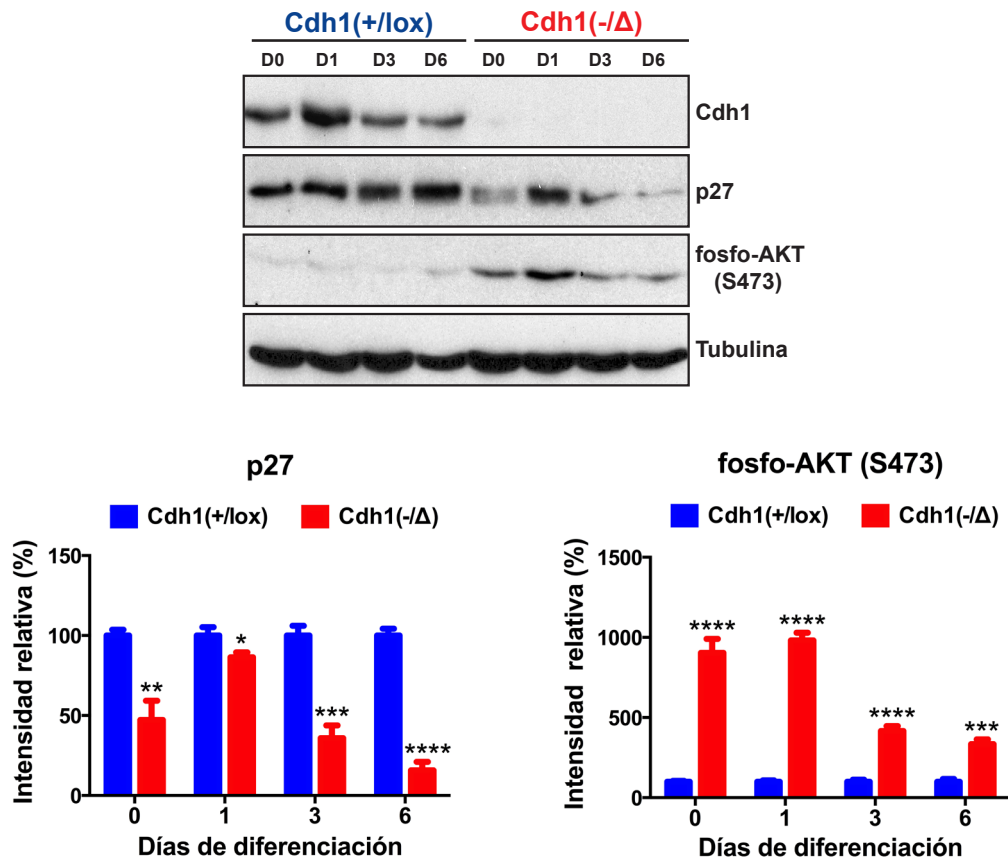
### 1.5. La adipogénesis en ausencia de Cdh1 cursa con niveles disminuidos de p21 y p27, e incrementados de fosfo-AKT (pAKT).

Una vez determinado que Cdh1 inhibe tanto la expansión clonal como la diferenciación terminal en adipogénesis, nos propusimos profundizar en los mecanismos moleculares de dicha inhibición. Para ello, llevamos a cabo un exhaustivo análisis bioquímico en MEFs (**Figura 12**) y preadipocitos primarios (**Figura 13**) WT y Cdh1KO, valorando distintos factores implicados en la adipogénesis.



**Figura 12. Proteínas desreguladas durante la adipogénesis en ausencia de Cdh1.** Inmunodetección, por *Western blot*, de las proteínas indicadas y a distintos días durante el proceso adipogénico, en MEFs primarios control y deficientes en Cdh1 (izquierda). A la derecha se muestra la cuantificación relativa de la intensidad de las correspondientes bandas proteicas normalizando frente al control de carga y frente a las muestras de las células control. ns= no significativo; \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001; \*\*\*\*p<0,0001





**Figura 13. Proteínas desreguladas durante la adipogénesis en ausencia de Cdh1, en preadipocitos primarios.** Inmunodetección, por *Western blot*, de las proteínas indicadas durante distintos días del proceso adipogénico, en preadipocitos primarios purificados de la grasa subcutánea inguinal de animales Cdh1(+lox) y Cdh1(-Δ) (arriba). Abajo, se muestra la cuantificación relativa de la intensidad de las correspondientes bandas proteicas normalizando frente al control de carga y frente a las muestras de las células control [Cdh1(+lox)]. \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001; \*\*\*\*p<0,0001

Este análisis mostró que:

- La primera oleada de factores de transcripción adipogénicos (CEBPβ y CEBPα), cuya transcripción se induce por la ruta glucocorticoide (Wu et al., 1996), no están desregulados en ausencia de Cdh1.
- Las proteínas p27 y p21, inhibidores de la actividad Cdk (CKIs), se encuentran disminuidos durante la adipogénesis en ausencia de Cdh1. Como ya se ha comentado en la introducción, ambas proteínas se estabilizan por APC/C-Cdh1 durante el ciclo celular, y se ha demostrado su papel antiadipogénico *in vitro* e *in vivo*, al inhibir la expansión clonal. Estos resultados muestran por primera vez que Cdh1 es necesario para la estabilización de p27 y p21 también en adipogénesis, y sugieren que, Cdh1 podría inhibir la expansión clonal mediante la estabilización de estos CKIs.
- La ruta de la insulina (o ruta PI3K/AKT) parece estar más activa en ausencia de Cdh1, ya que se observan niveles incrementados de AKT fosforilado en su residuo S473, el principal marcador de activación de esta ruta.

## **-Resultados-**

### 1.6. La hiperactivación de la ruta PI3K/AKT contribuye decisivamente al aumento de adipogénesis en ausencia de Cdh1.

Para confirmar la hiperactivación de la ruta de la insulina en ausencia de Cdh1, y su posible influencia en la adipogénesis, diferenciamos MEFs WT, MEFs Cdh1KO, y MEFs Cdh1KO tratados durante toda la adipogénesis con LY294002, un inhibidor específico de PI3K. En estos experimentos, añadimos troglitazona al *cocktail* adipogénico para potenciar la ruta PI3K/AKT, ya que las tiazolidinedionas (como rosiglitazona y troglitazona), son potentes sensibilizadores a insulina (Yau et al., 2013).

El análisis bioquímico (**Figura 14A**) corroboró un incremento en la fosforilación de AKT (forma activa, principal signo de la activación de la ruta), en sus residuos S473 y T308, durante la adipogénesis de MEFs Cdh1KO. El tratamiento con LY294002 normalizó, con respecto a las células control, los niveles de AKT fosforilado (**Figura 14A**) y redujo dramáticamente la adipogénesis en ausencia de Cdh1, si bien ésta seguía siendo moderadamente superior a la de las células WT (**Figura 14B**). Además, el análisis bioquímico de la **Figura 14A** reveló que los niveles de PTEN, la fosfatasa que actúa sobre PIP3 y se opone a la actividad de PI3K, están reducidos en MEFs deficientes en Cdh1 diferenciados a adipocitos, sugiriendo que la disminución en PTEN podría ser responsable de la hiperactivación de la ruta de la insulina en estas células.

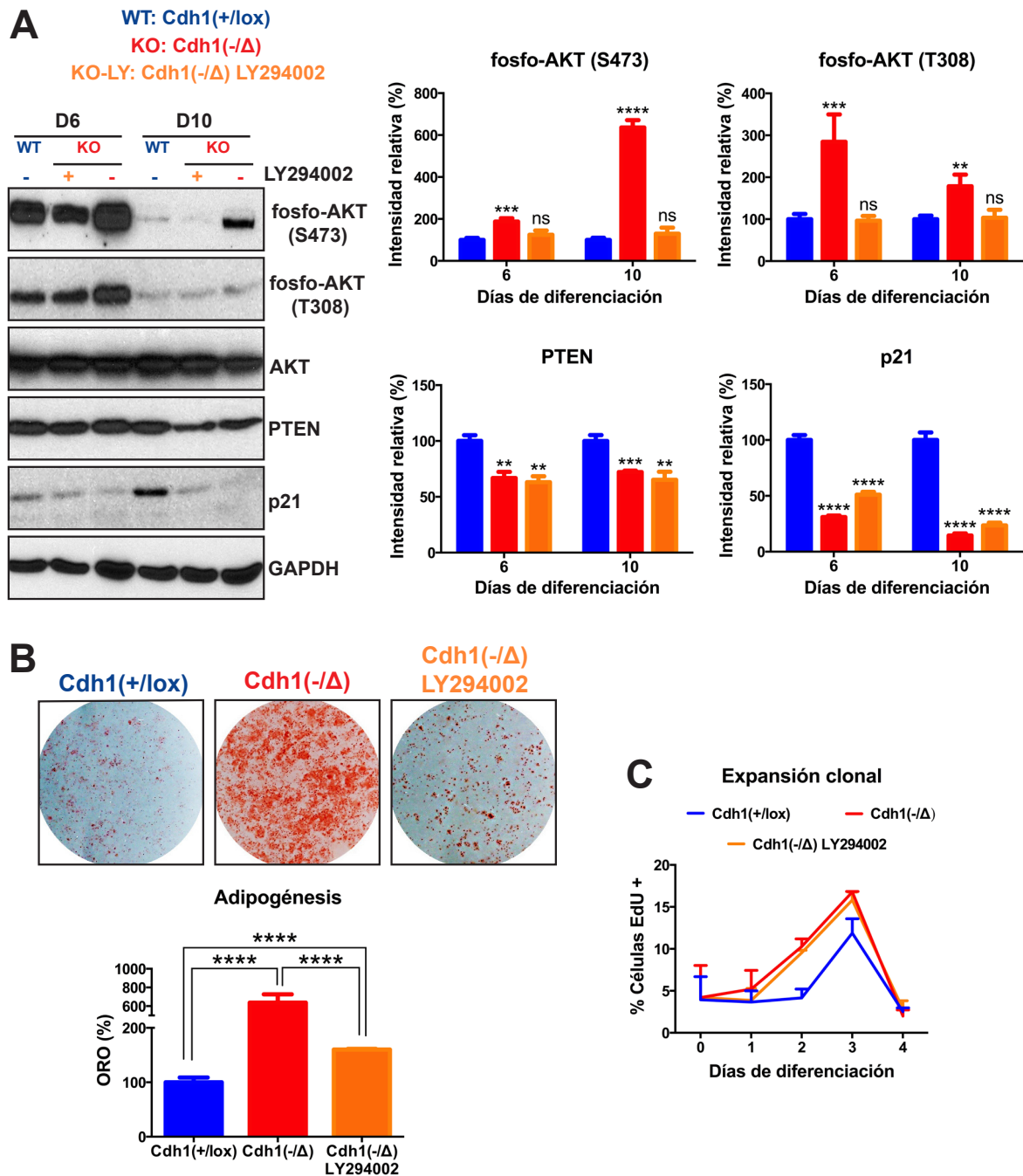
Por tanto, concluimos que la hiperactivación de AKT contribuye decisivamente al exceso adipogénico en ausencia de Cdh1. Para profundizar un poco más en este aspecto, analizamos la expansión clonal en las mismas condiciones. Comprobamos que el tratamiento con LY294002 no normalizó los niveles proteicos de p21 (**Figura 7A**), ni tampoco el incremento proliferativo observado en la adipogénesis de MEFs Cdh1KO (**Figura 14C**). Es decir, la hiperestimulación de AKT no es responsable del exceso de expansión clonal en la adipogénesis de células deficientes en Cdh1.

**En conjunto, estos resultados sugieren que la hiperactivación de la ruta PI3K/AKT, debida posiblemente a los niveles reducidos de PTEN, es responsable del incremento adipogénico en diferenciación terminal en ausencia de Cdh1.**

### 1.7. La inactivación de APC/C no conduce a la hiperactivación de la ruta PI3K/AKT.

Un estudio reciente (Liu et al., 2016) demostró que, al menos en líneas celulares tumorales, los niveles de PTEN están controlados por Cdh1, que se une e inhibe a WWP2, una E3 ubiquitina-ligasa que dirige la degradación de esta fosfatasa. Además, según los autores, esa actividad de Cdh1 es independiente de APC/C.

Dado que durante la adipogénesis en ausencia de Cdh1 se produce un incremento en la actividad de la ruta de la insulina acompañado de una disminución en los niveles de PTEN, quisimos comprobar si este efecto era dependiente o no de la actividad del complejo APC/C. Para ello, indujimos la adipogénesis de MEFs silvestres Cdh1(+/+) en presencia de proTAME, un inhibidor de la actividad APC/C. En estos experimentos añadimos troglitazona al *cocktail* adipogénico para potenciar la ruta PI3K/AKT, y utilizamos el tratamiento con proTAME durante dos periodos distintos:



**Figura 14.** El aumento de la adipogénesis en ausencia de Cdh1 se debe, en parte, a la hiperactivación de la ruta PI3K/AKT, asociada a una disminución de los niveles proteicos de PTEN, que no es responsable del aumento en la expansión clonal. **A.** Inmunodetección, por *Western blot*, de las proteínas indicadas y a distintos días durante el proceso adipogénico, en MEFs primarios Cdh1(+/lox), Cdh1(-/-), y Cdh1(-/-) tratados con LY294002 (10  $\mu$ M), un inhibidor específico de PI3K (izquierda). A la derecha se muestra la cuantificación de la intensidad de las bandas, normalizando frente al control de carga y frente a las muestras de las células control [Cdh1(+/lox)] (n=3-4). **B.** Escaneo, tras la tinción con ORO, de placas con cultivos de MEFs primarios de los genotipos y tratamiento indicados diferenciados a adipocitos durante 12 días (arriba), y cuantificación de la adipogénesis en los mismos, mediante la extracción y valoración del ORO, considerando como 100% los valores obtenidos en los cultivos WT [Cdh1(+/lox)] (n=4). **C.** Cuantificación, por citometría de flujo, del porcentaje de células positivas para EdU durante los 4 primeros días de la adipogénesis de estos mismos cultivos (n=3). Los experimentos realizados en esta figura se llevaron a cabo en presencia de troglitazona (10  $\mu$ M) para potenciar la actividad de la ruta PI3K/AKT. ns= no significativo; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001; \*\*\*\*p<0,0001

## **-Resultados-**

- Durante todo el proceso adipogénico.
- Sólo durante la diferenciación terminal, es decir, a partir del cuarto día tras la inducción adipogénica, y hasta el final de la misma.

Como era previsible, la inhibición de la actividad APC/C condujo a una desestabilización de p21, ya que la estabilidad de los CKIs depende de la actividad APC/C-Cdh1 (ver 'Introducción'). En cambio, en ninguna etapa de la adipogénesis la inhibición de APC/C (APC/C-Cdc20 y APC/C-Cdh1) produjo cambios en los niveles proteicos de pAKT o PTEN, evidenciando que la actividad de Cdh1 sobre esta vía es independiente de APC/C (**Figura 15A**). Evaluamos también el efecto de la inhibición de APC/C en adipogénesis. Como queda reflejado en la **Figura 15B**, el tratamiento con proTAME durante todo el proceso adipogénico indujo un aumento en la adipogénesis, mientras que su utilización restringida durante la diferenciación terminal no produjo ninguna variación. Además, el incremento adipogénico producido gracias al tratamiento con proTAME fue equivalente al observado tras la normalización de la actividad PI3K/AKT en los MEFS Cdh1KO (comparar **Figuras 15B** y **14B**), apoyando que la inhibición de APC/C efectivamente no conduce a una hiperactivación de la ruta de la insulina. Por último, el hecho de que en diferenciación terminal la depleción génica de Cdh1 produjera un aumento en la adipogénesis que no se observa tras el tratamiento con proTAME (comparar **Figuras 11D** y **15B**), confirma que en esta etapa Cdh1 media su actividad a través de la hiperactivación de AKT.

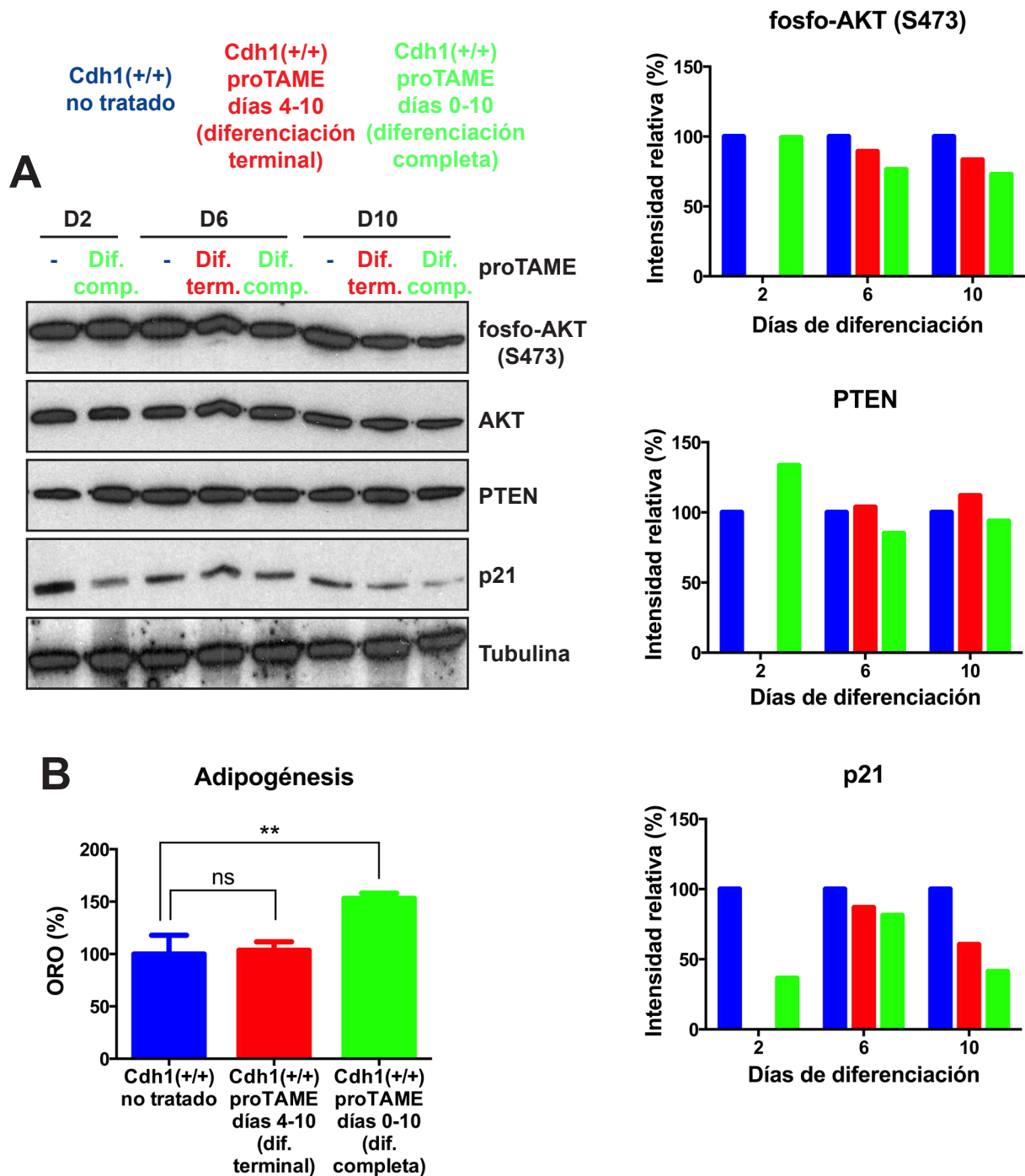
**Estos resultados apuntan a que el efecto inhibitorio de Cdh1 sobre la diferenciación terminal adipogénica es posiblemente independiente de APC/C, e implica la estabilización de PTEN y la consecuente modulación negativa de la ruta PI3K/AKT.**

---

*En resumen, los resultados in vitro evidencian que Cdh1 inhibe la adipogénesis en sus dos etapas principales: expansión clonal y diferenciación terminal. APC/C-Cdh1 reduce la expansión clonal posiblemente mediante la estabilización de los CKIs p21 y p27. Además, Cdh1, en una actividad independiente de APC/C, se opone a la diferenciación terminal adipogénica (sin afectar a la expansión clonal) promoviendo la estabilización de PTEN y modulando negativamente la ruta PI3K/AKT.*

---

## -Resultados-



**Figura 15.** La inhibición de la actividad APC/C en la ruta adipogénica no induce la hiperactivación de la ruta PI3K/AKT ni la estimulación de la adipogénesis en diferenciación terminal; pero sí un aumento de la adipogénesis total y la desestabilización de inhibidores de la actividad Cdk. **A.** Inmunodetección, por *Western blot*, de las proteínas indicadas y a distintos días durante el proceso adipogénico, en MEFs primarios Cdh1(+/-) en 3 condiciones distintas: sin tratar, tratados con proTAME (20  $\mu$ M) sólo durante la diferenciación terminal, y tratados con proTAME (20  $\mu$ M) durante toda la adipogénesis ('diferenciación completa') (izquierda). A la derecha, se muestra la cuantificación de la intensidad de las bandas, normalizando frente al control de carga y frente a las muestras de las células no tratadas. **B.** Cuantificación de la adipogénesis de estos cultivos tras 10 días de diferenciación, considerando como 100% los valores obtenidos en las células no tratadas (n=3). Los experimentos realizados en esta figura se llevaron a cabo en presencia de troglitazona (10  $\mu$ M) para potenciar la actividad de la ruta PI3K/AKT. ns=no significativo; \*\*p<0,01

## ***-Resultados-***

### **2. Papel de Cdh1 en los adipocitos maduros.**

Al igual que para la función adipogénica, hasta el momento no se ha descrito nada sobre el posible papel de Cdh1 en la fisiología del adipocito maduro. Nuestros resultados demuestran que, durante la adipogénesis Cdh1KO se produce un aumento en los niveles proteicos de fosfo Rb (pRb), la forma inactiva de Rb (**Figura 12**). Rb no sólo inhibe la adipogénesis en diferentes etapas, sino que también se opone a la aparición de características de grasa marrón en los adipocitos maduros (Hansen et al., 2004; Dali-Youcef et al., 2007; Calo et al., 2010). Dado que se produce un incremento en la inactivación de Rb durante la adipogénesis Cdh1KO, y que en el ciclo celular se ha descrito una interacción positiva entre Cdh1 y Rb (Thwaites et al., 2017), nos preguntamos si los adipocitos carentes de Cdh1 también podrían tener características de carácter marrón.

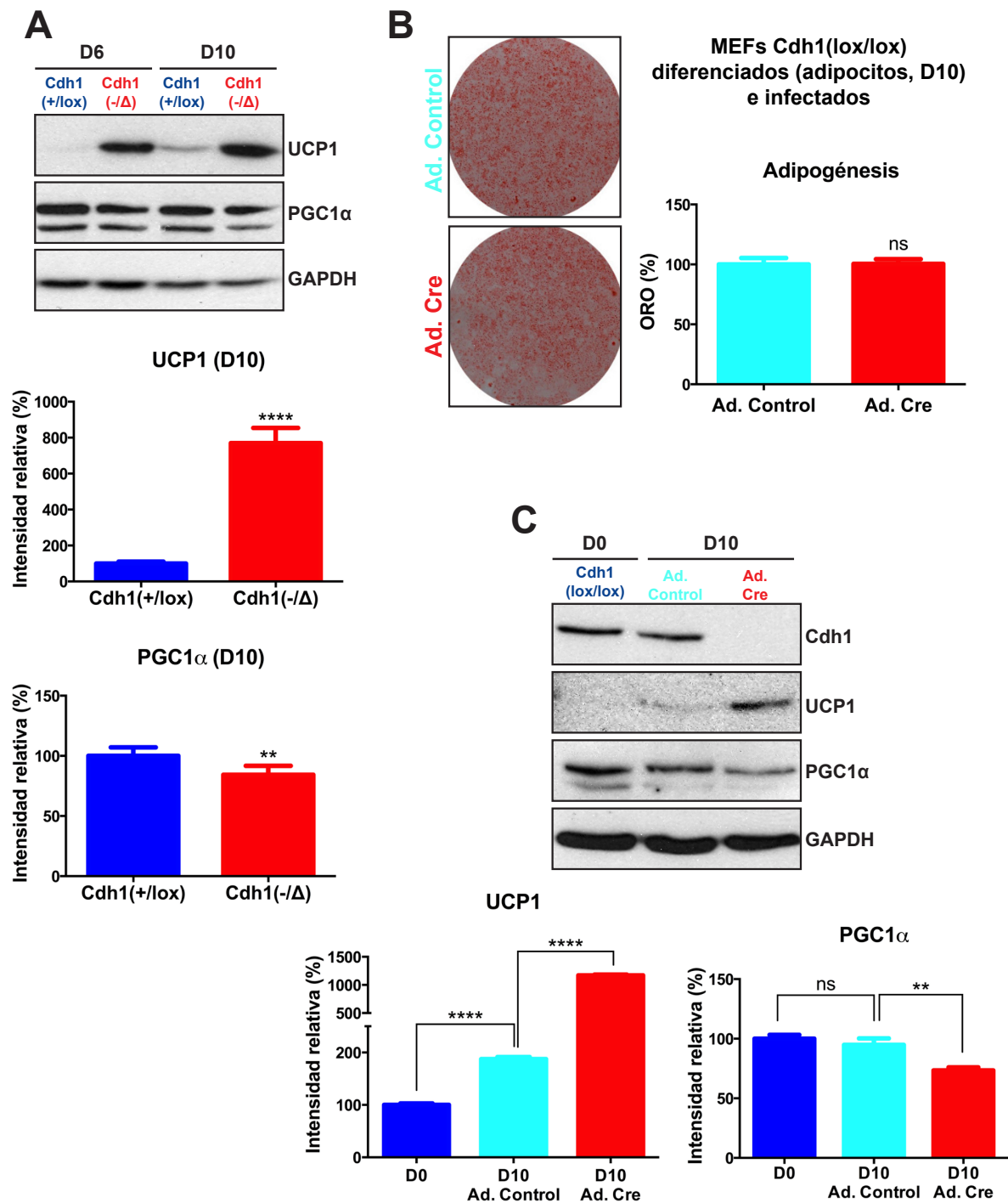
#### **2.1. Los adipocitos carentes de Cdh1 presentan niveles proteicos de UCP1 incrementados.**

UCP1, o termogenina, es la proteína responsable de la termogénesis no-temblorosa (ver 'Introducción'), y determina la especificidad fisiológica y funcional de los adipocitos de tipo marrón. Por ello, nos decantamos por su estudio para intentar determinar si la ausencia de Cdh1 conduce a la aparición de un fenotipo marrón en los adipocitos.

La adipogénesis de MEFs es de carácter blanco, pero la utilización de rosiglitazona en la diferenciación permite una ligera expresión de UCP1. Así, analizamos los niveles de esta proteína en adipocitos obtenidos a partir de la adipogénesis de MEFs primarios WT y Cdh1KO. Como se observa en la **Figura 16A**, se detectaron niveles muy incrementados de UCP1 en ausencia de Cdh1.

UCP1 es una proteína específica de adipocitos maduros, por lo que para su valoración hay que tener en cuenta el número de adipocitos generados en cada condición. La adipogénesis de células Cdh1KO, como ya se ha demostrado anteriormente, es 2-3 veces mayor que la adipogénesis control, por lo que podría esperarse un incremento equivalente en cuanto a UCP1. Sin embargo, el incremento en los niveles proteicos de UCP1 fue 8 veces mayor en ausencia de Cdh1.

Debido al problema experimental que suponía tener que comparar niveles de UCP1 en cultivos con diferente proporción de adipocitos maduros, decidimos abordar los análisis relativos a la termogenina empleando otra estrategia: la depleción aguda de Cdh1 con Adeno-Cre en adipocitos maduros. Para ello, indujimos la adipogénesis de MEFs primarios Cdh1(lox/lox), y una vez generados los adipocitos maduros, éstos se infectaron con adenovirus portadores de la recombinasa Cre y adenovirus control (vacíos). De este modo es posible analizar el efecto de la pérdida de Cdh1 en adipocitos maduros sobre cultivos con los mismos niveles de diferenciación (**Figura 16B**). Como se observa en la **Figura 16C**, esta estrategia nos permitió confirmar que **la depleción aguda de Cdh1 en adipocitos maduros conduce a un aumento muy significativo en los niveles proteicos de UCP1.**



**Figura 16. Los adipocitos carentes o deplecionados de Cdh1 muestran niveles proteicos de UCP1 anormalmente elevados. A.** Inmunodetección, por *Western blot*, de UCP1 y PGC1α a distintos días durante el proceso adipogénico, en MEFs primarios Cdh1(+/-lox) y Cdh1(-/Δ) (arriba). Abajo, se muestra la cuantificación de la intensidad de las bandas, normalizando frente al control de carga y frente a las muestras de las células control. **B.** Escaneo de placas con cultivos, teñidos con ORO, de MEFs primarios Cdh1(lox/lox) diferenciados a adipocitos durante 10 días y posteriormente infectados con adenovirus control y Cre (izquierda). Cuantificación de la adipogénesis de estos MEFs, mediante la extracción y valoración del ORO, considerando como 100% los valores obtenidos en los cultivos infectados con adenovirus control (derecha, n=3). **C.** Análisis, por *Western blot*, de las proteínas indicadas en MEFs primarios Cdh1(lox/lox) sin diferenciar (D0), o diferenciados (D10) e infectados con adenovirus control y Cre (arriba). Abajo, se muestra la cuantificación de la intensidad de las bandas, normalizando frente al control de carga y frente a las muestras de los MEFs no diferenciados. ns= no significativo; \*\*p<0,01; \*\*\*\*p<0,0001

## **-Resultados-**

2.2. Los adipocitos Cdh1KO poseen menores niveles de PGC1a, y una menor inducción transcripcional de UCP1.

El mecanismo de regulación de UCP1 más conocido es su modulación transcripcional, mediado por multitud de factores que promueven o inhiben su transcripción (ver 'Introducción'). Así, el principal inductor transcripcional de UCP1 es PGC1a, cuya transcripción y/o actividad se estimula principalmente por la ruta b-adrenérgica (Puigserver & Spiegelman, 2003). Para intentar explicar el mecanismo por el cual aumentan los niveles proteicos de UCP1 en los adipocitos Cdh1KO, se evaluó en paralelo los niveles de PGC1a. Sorprendentemente, no sólo no encontramos niveles incrementados de PGC1a, sino que incluso detectamos menor presencia de este factor de transcripción (**Figuras 16A y 16C**). ¿Por qué en los adipocitos deplecionados de Cdh1 se produce una disminución en los niveles proteicos de PGC1a? Podría deberse, como se detalla en la 'Discusión', a la hiperactivación de la ruta PI3K/AKT observada en los adipocitos Cdh1KO. El exceso de actividad de la ruta de la insulina podría desencadenar una menor activación b-adrenérgica, ya que en los adipocitos estas vías se inhiben mutuamente en numerosos puntos (ver 'Introducción').

A raíz de este resultado tan inesperado, decidimos profundizar aún más en estas observaciones. Cuantificamos los niveles de mRNA de UCP1 en cultivos de MEFs control y Cdh1KO diferenciados a adipocitos (**Figura 17A**) y observamos un ligero incremento en los cultivos mutantes. De nuevo, este resultado es difícil de interpretar porque UCP1 se expresa mucho en adipocitos pero muy poco en MEFs, y comparamos cultivos con distintos niveles de diferenciación. En todo caso, es importante destacar que en la adipogénesis de MEFs Cdh1KO el exceso, con respecto a las células WT, en los niveles proteicos de UCP1 es sustancialmente mayor que el incremento de mRNA (comparar **Figuras 16A y 17A**), sugiriendo una regulación adicional post-transcripcional.

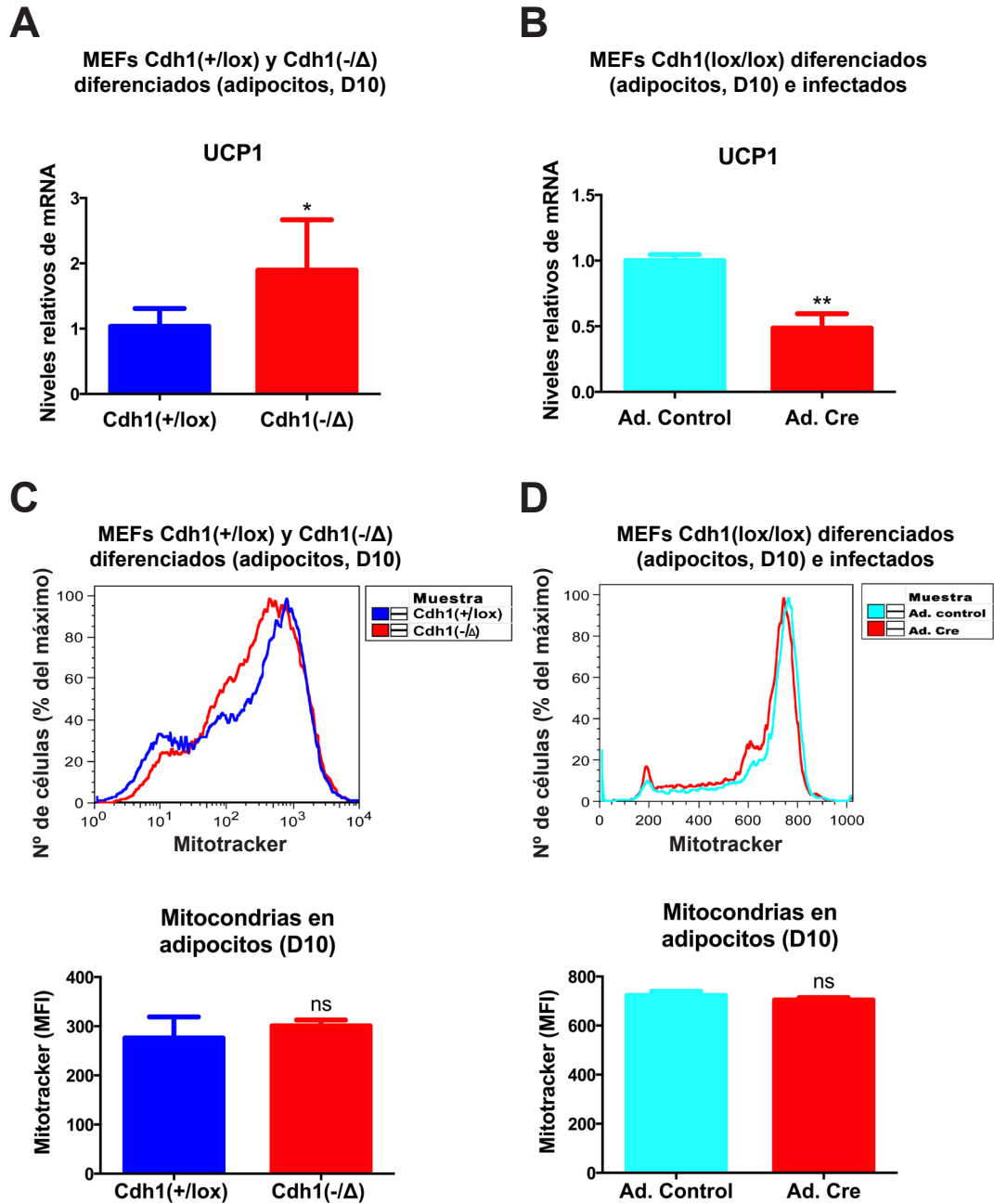
Para poder comparar la influencia de Cdh1 sobre la transcripción de UCP1 en cultivos con los mismos niveles de diferenciación adipogénica, empleamos una vez más la depleción aguda de Cdh1 mediante infecciones con adenovirus (Adeno-Cre) en adipocitos maduros, y comprobamos que la expresión génica de UCP1 no sólo no aumenta, sino que disminuye en adipocitos deficientes en Cdh1 (**Figura 17B**). Este fenotipo también podría deberse a la hiperactivación de la ruta PI3K/AKT en los adipocitos mutantes, ya que se ha descrito que esta vía inhibe la vía b-adrenérgica y limita la expresión de UCP1 al fosforilar a FoxO1 (ver 'Discusión').

**Estos resultados indican que los adipocitos carentes de Cdh1 presentan niveles proteicos incrementados de UCP1, a pesar de contar con menores niveles de su mRNA.**

2.3. La ausencia de Cdh1 no modifica la carga mitocondrial en adipocitos maduros.

Si los adipocitos Cdh1KO tienen una activación b-adrenérgica deficiente, ¿por qué muestran incrementos proteicos en UCP1?





**Figura 17.** Los adipocitos carentes o deplecionados de Cdh1 presentan menores niveles de mRNA de UCP1. En cambio, la carga mitocondrial no varía en ausencia de Cdh1. Cuantificación de los niveles relativos de mRNA de UCP1, por q-RT-PCR, en (A) MEFs primarios Cdh1(+/-lox) y Cdh1(-/-Δ) diferenciados a adipocitos durante 10 días (D10; n=3), y en (B) MEFs primarios Cdh1(lox/lox) diferenciados a adipocitos durante 10 días (D10; n=3) y posteriormente infectados con adenovirus control y Cre. C y D. Arriba, se muestran los histogramas superpuestos de detección del marcaje con Mitotracker (sonda mitocondrial, 100 nM, 30 minutos) por citometría de flujo, para (C) cultivos de MEFs primarios control y deficientes en Cdh1 diferenciados a adipocitos durante 10 días, y (D) adipocitos Cdh1(lox/lox) (generados a partir de la diferenciación de MEFs primarios) infectados con adenovirus control y Cre. A partir de los histogramas, se calculó la intensidad media de fluorescencia (MFI) de la sonda en los cultivos, valorando la carga mitocondrial de los mismos (abajo, n=3). ns= no significativo; \*p<0,05; \*\*p<0,01

## **-Resultados-**

UCP1 es una proteína de la membrana mitocondrial interna, por lo que nos preguntamos si el incremento en los niveles proteicos de UCP1 en los adipocitos Cdh1KO se podía deber a un aumento en el número de mitocondrias. Para resolver esta cuestión realizamos un marcaje con Mitotracker, una sonda que marca específicamente mitocondrias, y la cuantificamos por citometría de flujo. Los resultados indican que ni la diferenciación de MEFs Cdh1KO (**Figura 17C**), ni la depleción de Cdh1 en adipocitos maduros (**Figura 17D**) generó una mayor intensidad de marcaje y, por tanto, un mayor número de mitocondrias.

Aunque consideramos necesario (ver 'Discusión') confirmar este resultado utilizando otro tipo de análisis (cuantificación del número mitocondrial mediante inmunohistoquímica, valoración del DNA mitocondrial...), los datos sugieren que **los niveles proteicos incrementados de UCP1 en los adipocitos carentes de Cdh1 no parecen deberse a un aumento en la carga mitocondrial.**

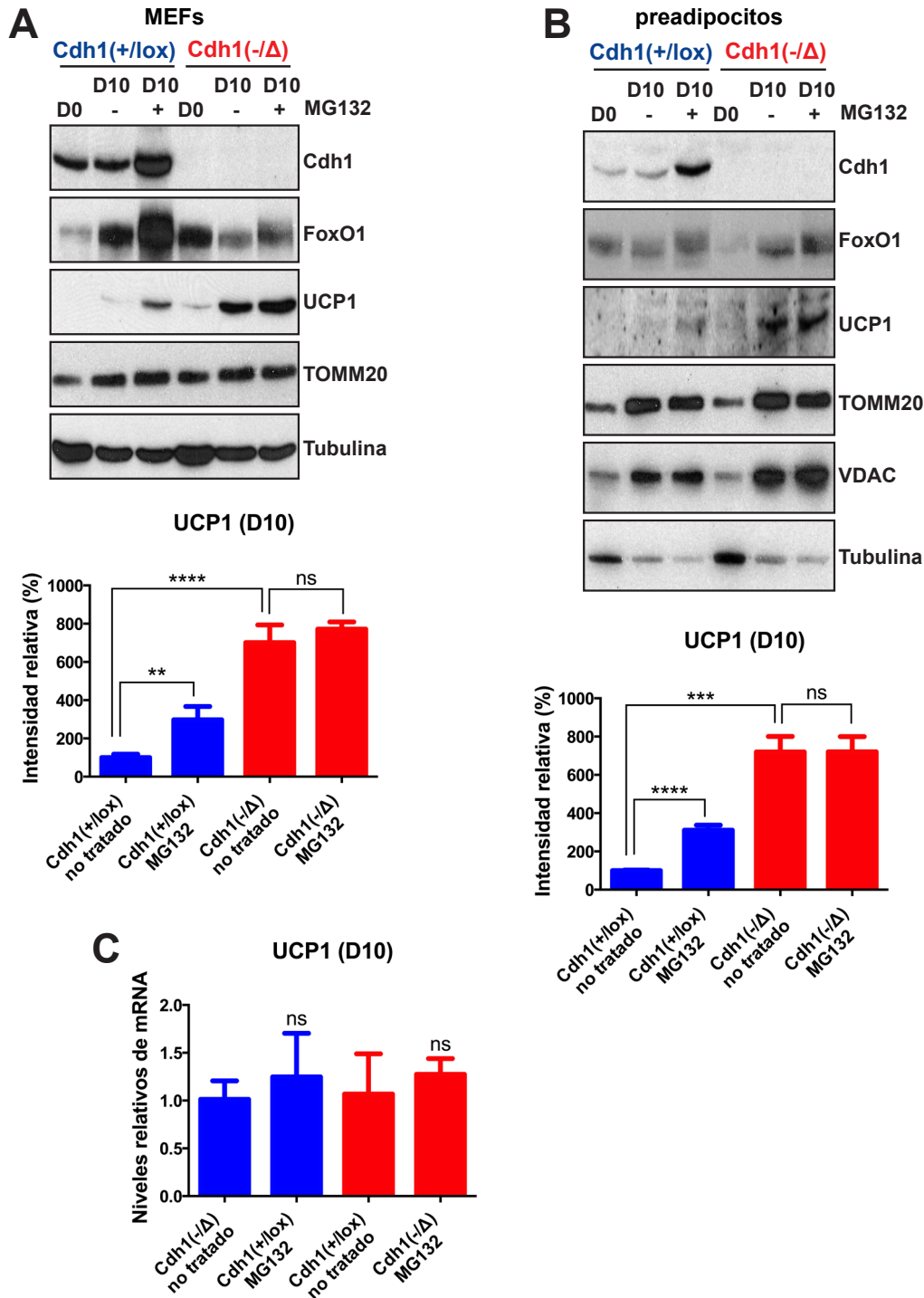
### 2.4. UCP1 se degrada de forma dependiente del proteasoma y de Cdh1.

El siguiente camino que decidimos tomar, teniendo en cuenta que APC/C-Cdh1 es una E3 ubiquitina-ligasa que dirige la degradación de múltiples proteínas (ver 'Introducción'), fue analizar si la estabilidad de UCP1 se veía afectada por la presencia/ausencia de Cdh1.

Poco se conoce acerca de los mecanismos de degradación de UCP1, pero diferentes estudios muestran que UCP1 y otros miembros de la familia UCPs se degradan por la vía del sistema ubiquitina-proteasoma (UPS). Sin embargo, se desconoce completamente cómo y dónde ocurre esta degradación, y cuál es la E3 ubiquitina-ligasa implicada en el sistema (ver 'Introducción').

Analizamos esta cuestión en adipocitos generados tanto a partir de MEFs como de preadipocitos primarios WT y Cdh1KO. Una vez obtenidos los adipocitos maduros, se trataron durante 24 horas con MG132, un inhibidor específico del proteasoma, y se valoraron los niveles proteicos y transcripcionales de UCP1.

En primer lugar, para validar las condiciones del tratamiento (dosis y tiempo), examinamos los niveles de Cdh1 y FoxO1. Como ya se ha comentado en la 'Introducción', Cdh1 se degrada al final de la fase G<sub>1</sub>, en un proceso mediado por APC/C y SCF. En cuanto a FoxO1, su degradación mediada por el proteasoma requiere tanto de su fosforilación como de su translocación al citoplasma. Como se observa en las **Figuras 18A y 18B**, el tratamiento con MG132 estabilizó tanto a Cdh1 como a FoxO1, e indujo la acumulación de la forma fosforilada de FoxO1, indicando una inhibición efectiva del proteasoma. En cuanto a UCP1, comprobamos que el tratamiento con MG132 incrementó sus niveles proteicos en los adipocitos control, pero no lo hizo en los adipocitos carentes de Cdh1 (**Figura 18A y Figura 18B**). Descartamos que los resultados observados fueran debidos a cambios en la dinámica mitocondrial provocados por la inhibición del proteasoma, ya que los niveles de proteínas mitocondriales como TOMM20 (**Figura 18A y Figura 18B**) o VDAC (**Figura 18B**) no variaron en las células tratadas. También descartamos que MG132 produjera cambios diferenciales entre los adipocitos WT y Cdh1KO en cuanto a la expresión de UCP1 (**Figura 18C**).



**Figura 18. La estabilidad de UCP1 depende del proteasoma y de Cdh1.** Análisis bioquímico, por *Western blot*, del efecto de la inhibición específica del proteasoma (mediante el tratamiento con 10  $\mu$ M de MG132 durante 24 horas) sobre los niveles proteicos de las proteínas indicadas en MEFs (A) y preadipocitos primarios (B) Cdh1(+lox) y Cdh1(-Δ) diferenciados a adipocitos durante 10 días (arriba). Se muestra la cuantificación de la intensidad de las bandas para UCP1, normalizando frente al control de carga y frente a las muestras de las células control [Cdh1(+lox)] no tratadas (abajo). C. Cuantificación de la expresión relativa de UCP1, por q-RT-PCR, en los adipocitos WT y mutantes [generados a partir de la diferenciación de preadipocitos primarios Cdh1(+lox) y Cdh1(-Δ)] sin tratar o tratados con MG132 (n=3). ns = no significativo; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001; \*\*\*\*p<0,0001

## -Resultados-

Concluimos por tanto que UCP1 se estabiliza en adipocitos diferenciados al inhibir el proteasoma, y que dicha estabilización parece depender de la presencia de Cdh1. Es decir, que UCP1 podría degradarse de forma dependiente del proteasoma y de Cdh1.

### 2.5. UCP1 se estabiliza en ausencia de Cdh1 en adipocitos maduros.

Para estudiar en detalle la estabilidad de UCP1, llevamos a cabo el análisis de su vida media en adipocitos maduros WT y Cdh1KO. De nuevo, empleamos la depleción aguda de Cdh1 mediante la infección con adenovirus (Adeno-Cre) en adipocitos maduros generados a partir de MEFs Cdh1(lox/lox). Tras esto, los adipocitos se trataron con cicloheximida (CHX) para inhibir la síntesis proteica y analizar el nivel de UCP1 a distintos tiempos de tratamiento en presencia o ausencia de Cdh1. Como controles positivos examinamos de nuevo a Cdh1 y FoxO1 (Figura 19). Cdh1 se degradó en las

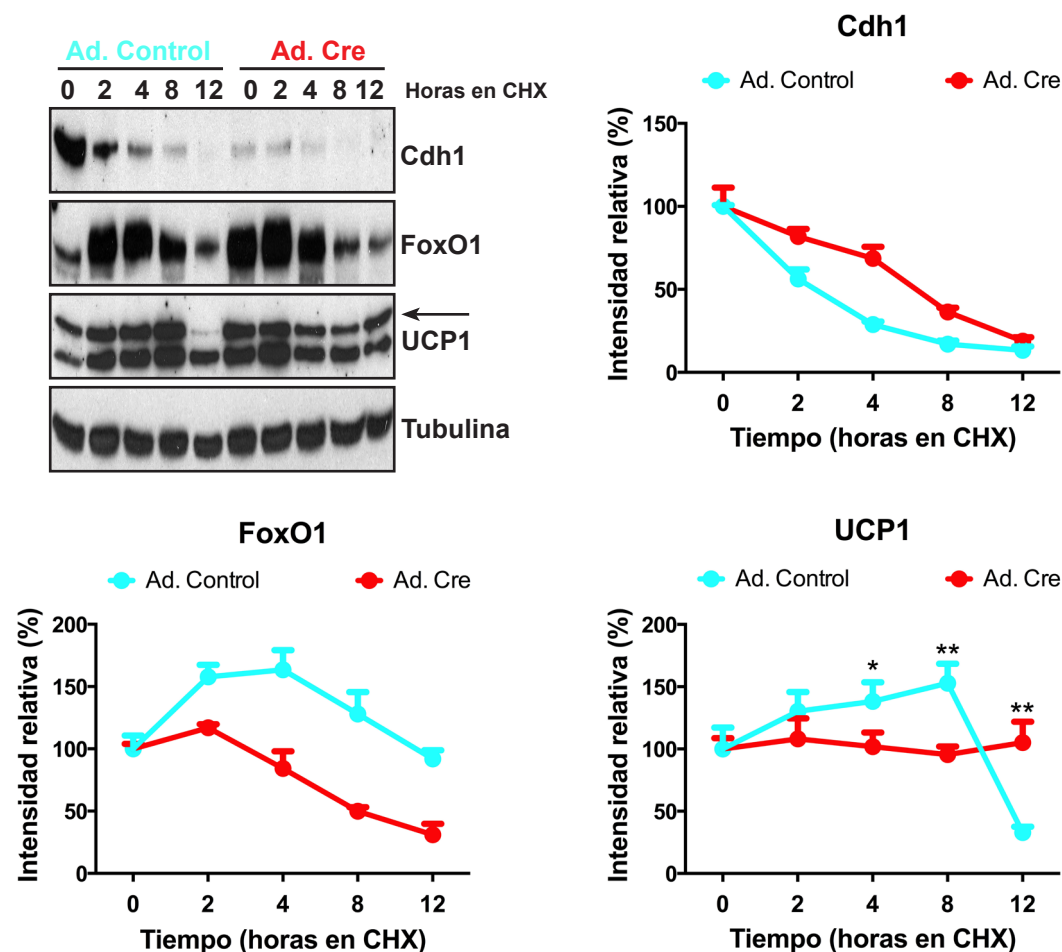


Figura 19. La depleción de Cdh1 incrementa la estabilidad proteica de UCP1 en adipocitos. Estudio de la vida media de las proteínas indicadas en adipocitos control y deplecionados de Cdh1 generados a partir de la diferenciación e infección con adenovirus control y Cre de MEFs Cdh1(lox/lox). Para ello, se trataron las células con cicloheximida (CHX, 10 µg/ml), inhibiendo la síntesis proteica, y se analizó bioquímicamente, mediante *Western blot*, la evolución de los niveles proteicos tras distintas horas de tratamiento. Se representa la intensidad de las bandas, normalizando frente al control de carga y frente a las muestras recogidas a tiempo cero. \*p<0,05; \*\*p<0,01

**Tabla 8.** Secuencia aminoacídica de las proteínas humanas y murinas UCP1, UCP2 y UCP3. La caja D se resalta en color amarillo.

| Proteína | Especie | Secuencia   |
|----------|---------|---|
| UCP1     | Humana  | MGGLTASDVHPTLGVQLFSAGIAACLADVITFPLDTAKVRL<br>QVQGECP TSSVIRYKGVLTITAVVKTEGRMKLYSGLPAG<br>LQRQISSASL <b>RIGLY</b> DTVQEFLTAGKETAPSLGSKILAGLTT<br>GGVAVFIGQPTEVVKVRLQAQSHLHGKIPRYTGTYNAYRII<br>ATTEGLTGLWKGTTPNLMRSVIINCTELVYDLMKEAFVK<br>NNILADDVPCHLVSALIAGFCATAMSSPVDVVKTRFINSP<br>GQYKSVPCAMKVF TNEGPTAFFKGLVPSFLRLGSWNVI<br>MFVCFEQLKRELSKSRQTMDCAT      |
| UCP1     | Ratón   | MVNPTTSEVQPTMGVKIFSAGVSAACLADIITFPLDTAKVRL<br>QIQGEGQASSTIRYKGVLTITTLAKTEGLPKLYSGLPAGI<br>QRQISFASL <b>RIGLY</b> DSVQEYFSSGRETPASLGNKISAGLMT<br>GGVAVFIGQPTEVVKVVMQAQSHLHGKIPRYTGTYNAYR<br>VIATTESLSTLWKGTTPNLMRNVIIINCTELVYDLMKCALV<br>NNKILADDVPCHLLSALVAGFCTLLASPVVVKTRFINSL<br>PGQYPSVPSCAMSMYTKEGPTAFFKGFVASFLRLGSWNV<br>IMFVCFEQLKELMKSRQTVDCCT       |
| UCP2     | Humana  | MVGFKATDVPPTATVKFLGAGTAACIADLITFPLDTAKVRL<br>QIQGESQGPVRATASAQYRGVMGILTMRTEGPRSLYN<br>GLVAGLQRQMSFASV <b>RIGLY</b> DSVKQFYTKGSEHASIGSRL<br>LAGSTTGALAVAVAQPTDVKVRFQAQARAGGGRRYQST<br>VNAYKTIAREEGFRGLWKGTSPNVARNAINVCAELVYDILI<br>KDALLKANLMTDDLPCHFSAFGAGFCTTVIASPVDVVK<br>RYMNSALGQYSSAGHCAL TMLQKEGPRAF YKGFMP SFL<br>RLGSWNVVMFVTYEQLKRALMAACTSREAPF    |
| UCP2     | Ratón   | MVGFKATDVPPTATVKFLGAGTAACIADLITFPLDTAKVRL<br>QIQGESQGLVRTAASAQYRGVLTILTMVRTEGPRSLYNG<br>LVAGLQRQMSFASV <b>RIGLY</b> DSVKQFYTKGSEHAGIGSRLL<br>AGSTTGALAVAVAQPTDVKVRFQAQARAGGGRRYQST<br>VEAYKTIAREEGIRGLWKGTSPNVARNAINVCAELVYDILI<br>KDTLLKANLMTDDLPCHFSAFGAGFCTTVIASPVDVVK<br>RYMNSALGQYHSAGHCAL TMLRKEGPRAF YKGFMP SFL<br>RLGSWNVVMFVTYEQLKRALMAAAYSREAPF   |
| UCP3     | Humana  | MVGLKPSDVPPTMAVKFLGAGTAACFADLVTFPLDTAKVR<br>LQIQGENQAVQTARLVQYRGVLTILTMVRTEGPCSPYN<br>GLVAGLQRQMSFASV <b>RIGLY</b> DSVKQVYTPKGADNSSLTTRI<br>LAGCTTGAMAVTCAQPTDVKVRFQASIHGSPSRDRKY<br>SGTMDAYRTIAREEGVRLWKGTLPNIMRNAIVNCAEVVT<br>YDILKEKLLDYHLLTDNFPCHFVSAFGAGFCATVVASPVDV<br>VKTRYMNSPPGQYFSP LDCMIKMVAQEGPTAFYKGF TFS<br>FLRLGSWNVVMFVTYEQLKRALMKVQMLRESPF |
| UCP3     | Ratón   | MVGLQPSEVPPTTVVKFLGAGTAACFADLLTFPLDTAKVR<br>LQIQGENPGAQSVQYRGVLTILTMVRTEGPRSPYSGLVA<br>GLHRQMSFASV <b>RIGLY</b> DSVKQFYTPKGADHSSVAIRILAGC<br>TTGAMAVTCAQPTDVKVRFQAMIRLGTGGERKYRGTMD<br>AYRTIAREEGVRLWKGTWPNITRNAIVNCAEMVYDIKE<br>KLESHLFTDNFPCHFVSAFGAGFCATVVASPVDVVKTRY<br>MNAPLGRYRSPLHCMLKMVAQEGPTAFYKGFVPSFLRLG<br>AWNVMFVTYEQLKRALMKVQVLRSPF           |

## **-Resultados-**

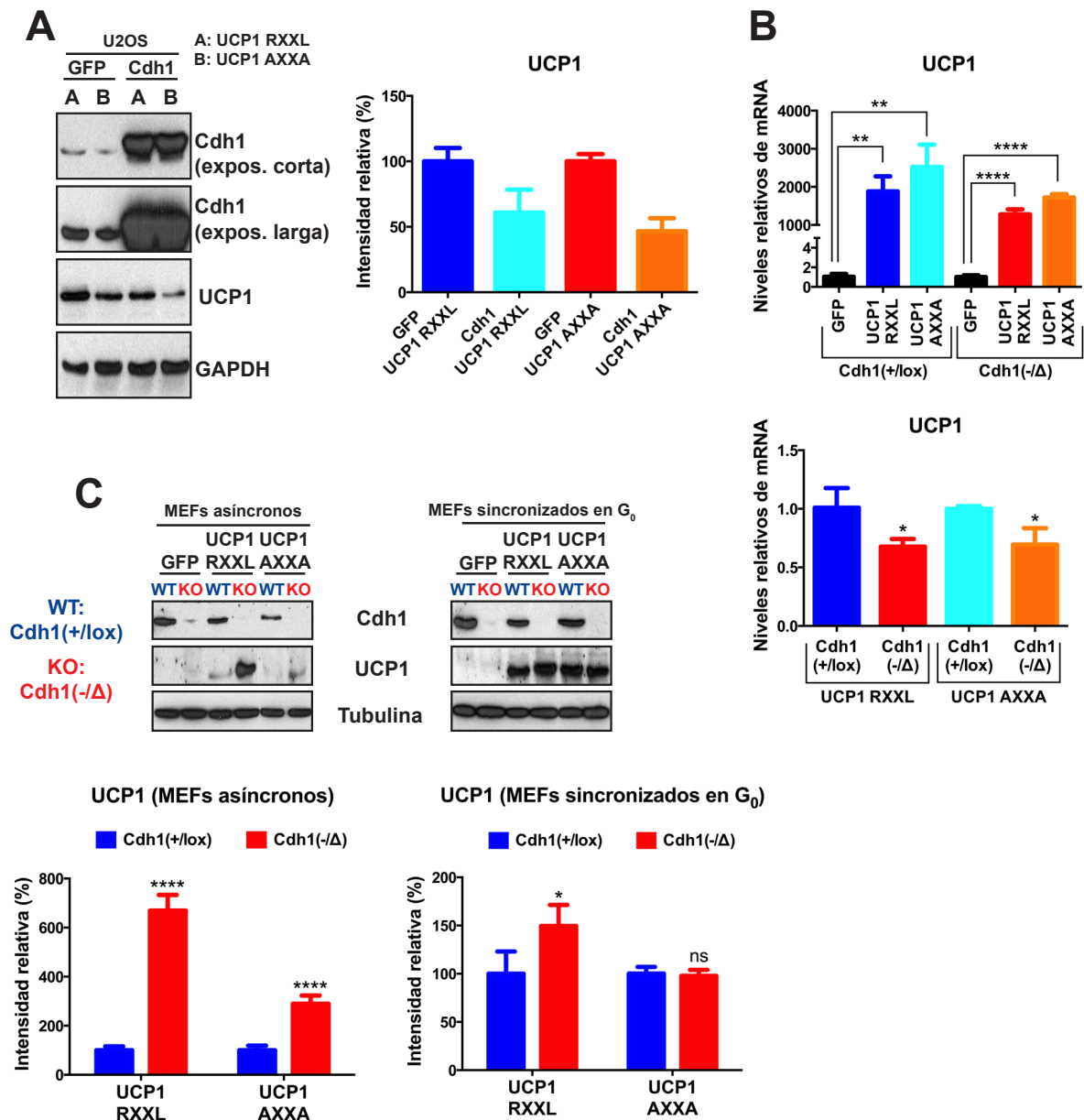
primeras horas de tratamiento con CHX, mientras que FoxO1 primero se fosforiló, y para finalmente irse degradando. Parecería que se incrementan los niveles de FoxO1 en las primeras horas tras el tratamiento con CHX, pero consideramos que es un simple artefacto debido, probablemente, a que el anticuerpo anti-FoxO1 detecta mejor la forma fosforilada. En cuanto a UCP1, se degradó (de forma tardía, tras 12 horas de tratamiento con CHX) en los adipocitos WT, pero no lo hizo en ausencia de Cdh1 (**Figura 19**). La gran estabilidad de UCP1 en adipocitos mutantes, y la imposibilidad de hacer tratamientos con CHX más largos por problemas de citotoxicidad, nos impidió estimar y comparar la vida de media de UCP1 en presencia o ausencia de Cdh1. Sin embargo, y aunque no podemos descartar que las diferencias observadas se deban a una citotoxicidad diferencial en las células control, **estos resultados sugieren que UCP1 se degrada en adipocitos y es más estable en ausencia de Cdh1.**

2.6. La degradación de UCP1 es dependiente de Cdh1 y, al menos en células quiescentes, de su caja D.

La degradación de UCP1 parece ser dependiente del proteasoma y de Cdh1, pero... ¿cuál es el mecanismo responsable? Existen dos posibilidades: que algún sustrato de APC/C-Cdh1 regule la degradación de UCP1, o que UCP1 sea sustrato directo de APC/C-Cdh1. No hay que olvidar que UCP1 (y otros miembros de la familia UCPs) se degrada por la vía del proteasoma citosólico, y que se desconoce la E3 ubiquitin-ligasa responsable. ¿Y si ésta fuera APC/C-Cdh1? Cdh1 se ubica principalmente en el citoplasma y/o en el núcleo, pero también se encontró en subcompartimentos celulares (Zhou et al., 2003), así que no se puede descartar su localización mitocondrial, aunque hasta el momento no se haya descrito. Además, uno de sus sustratos (Drp1) es una proteína mitocondrial (Horn et al., 2011), así que parece admisible plantearse si UCP1 podría ser o no sustrato directo de APC/C-Cdh1. Para resolver esta cuestión, primero buscamos si la secuencia de esta proteína contenía alguno de los motivos consenso reconocidos por APC/C (ver 'Introducción'). Efectivamente, UCP1, y otros miembros de la familia UCPs, como UCP2 y UCP3, presentan una caja D (secuencia 'RIGL'), altamente conservada filogenéticamente (**Tabla 8**). Si UCP1 fuera sustrato de APC/C-Cdh1, la mutación de esta secuencia conllevaría su estabilización en adipocitos WT, pero no un mayor incremento en adipocitos Cdh1KO. Decidimos por tanto mutagenizar el cDNA de UCP1 murino para introducir dos mutaciones en la caja D (ver 'Material y métodos'), obteniendo así una versión de UCP1 con la caja D no funcional (de secuencia 'AIGA'). Los plásmidos UCP1 WT (que llamamos 'UCP1 RXXL') y UCP1 mutado en su caja D (llamado 'UCP1 AXXA'), se transfectaron en células U2OS y MEFs.

Antes de analizar los resultados es importante comentar que la versión mutada de UCP1 parece ser menos estable que la versión silvestre, puesto que ambas formas se transcriben a niveles comparables pero recurrentemente detectamos niveles proteicos inferiores de la versión mutada. Esto no nos permite comparar las diferencias entre UCP1 WT y UCP1 mutante, sino únicamente los niveles proteicos de cada una de las 2 versiones de UCP1 en MEFs WT y MEFs Cdh1KO. ¿A qué se debe este problema? Es posible que se deba a un plegamiento aberrante de la versión mutada que aumentaría su inestabilidad. Otra opción es que el anticuerpo reconozca peor esta versión.

En primer lugar, estudiamos si la sobreexpresión de Cdh1 inducía la degradación de UCP1, de forma dependiente o no de su caja D. Para ello, cotransfectamos los plásmidos 'UCP1 RXXL' y 'UCP1 AXXA' con Cdh1 (o GFP, como control) en la línea celular U2OS. Utilizamos estas células porque presentan una alta eficiencia de transfección, y porque no expresan UCP1 de forma endógena. Los resultados muestran que, al menos en este tipo celular, la sobreexpresión de Cdh1 promovió la degradación de UCP1 de forma independiente de su caja D (**Figura 20A**).



## **-Resultados-**

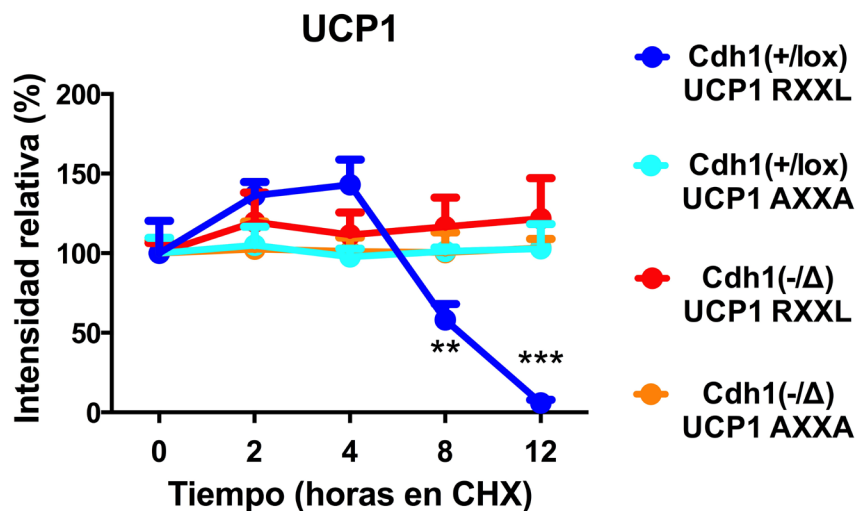
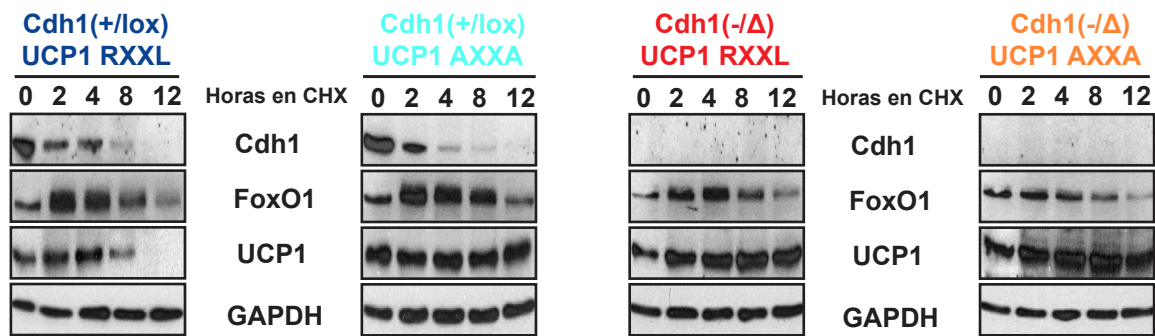
**Figura 20. La degradación de UCP1 es dependiente de Cdh1 y, al menos en células sincronizadas en G<sub>0</sub>, de su caja D.** **A.** Análisis, por *Western blot*, del efecto de la sobreexpresión ectópica de Cdh1 sobre los niveles proteicos de dos versiones de UCP1 (silvestre, o 'UCP1 RXXL'; y mutada en su caja D (no funcional), o 'UCP1 AXXA') transfectadas en células U2OS (izquierda). Se representa la intensidad de las bandas, normalizando frente al control de carga y frente a las muestras control (células U2OS transfectadas con cada una de las versiones de UCP1, pero donde no se sobreexpresa Cdh1) (abajo). **B.** Cuantificación de la expresión relativa de UCP1, por q-RT-PCR, tras la transfección de los plásmidos 'UCP1 RXXL' y 'UCP1 AXXA' en MEFs primarios Cdh1(+/-lox) y Cdh1(-/-Δ), normalizando frente a la transfección control ('GFP') (arriba) o frente a la transfección en células control [(Cdh1(+/-lox))] (abajo). **C.** Inmunodetección de Cdh1 y UCP1 en MEFs primarios Cdh1(+/-lox) y Cdh1(-/-Δ) [previamente transfectados con 'GFP' (como control), UCP1 silvestre ('UCP1 RXXL') o UCP1 mutante en su caja D ('UCP1 AXXA')] tanto en cultivos asíncronos (arriba-izquierda) como en cultivos sincronizados en G<sub>0</sub>-G<sub>1</sub> (arriba-derecha). Se muestra la cuantificación de la intensidad de las bandas para UCP1, normalizando frente al control de carga y frente a las muestras de las células control [Cdh1(+/-lox)] (abajo). ns= no significativo; \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*\*p<0,0001

Como ya se ha comentado anteriormente, UCP1 es una proteína específica de los adipocitos de tipo marrón, muy distintos a las células tumorales U2OS. Una característica importante de los adipocitos maduros es que son células quiescentes. Dada la dificultad para transfectar adipocitos marrones, se realizaron los experimentos en MEFs WT y Cdh1KO, que podemos sincronizar en G<sub>0</sub>-G<sub>1</sub> (quiescentes) mediante la privación de suero. Transfectamos los plásmidos GFP (como control), 'UCP1 RXXL' y 'UCP1 AXXA' en MEFs WT y Cdh1KO, y 2 días después eliminamos el suero del medio para sincronizar los cultivos en G<sub>0</sub>-G<sub>1</sub>. Comprobamos, en primer lugar, que los niveles transcripcionales de UCP1 WT y mutante aumentaron dramáticamente tras la transfección, aunque en menor medida en los MEFs Cdh1KO (**Figura 20B**). A pesar de ello, se detectaron niveles proteicos de UCP1 superiores en los MEFs carentes de Cdh1, siendo este incremento dependiente de la caja D en MEFs sincronizados en G<sub>0</sub>-G<sub>1</sub>, pero no en MEFs asíncronos (**Figura 20C**).

Estos resultados apuntan a que, en células proliferativas, Cdh1 regularía negativa y fuertemente los niveles de UCP1 de forma independiente de la caja D. Por tanto, en estas condiciones Cdh1 modularía los niveles proteicos de UCP1, pero no directamente a través de APC/C sino de manera indirecta. Como se desarrollará más adelante en la 'Discusión', una posibilidad sería que la estabilidad de UCP1 dependiera de otra E3 ubiquitina-ligasa activada por Cdh1.

Como se observa en la **Figura 20C**, la salida del ciclo celular incrementó los niveles proteicos de UCP1. Aun así, en las células quiescentes se sigue observando la estabilización de UCP1 en ausencia de Cdh1 (aunque en menor medida), estabilización que esta vez sí parece depender de la caja D. Esto sugiere que, al menos en células postmitóticas (como son los adipocitos), UCP1 podría ser sustrato directo de APC/C-Cdh1. Una evidencia adicional que apoya esta posibilidad es el resultado del análisis de la vida media de 'UCP1 RXXL' y 'UCP1 AXXA' en MEFs WT y Cdh1KO. Una vez transfectadas y sincronizadas en G<sub>0</sub>, las células se trataron con CHX y se valoraron los niveles proteicos de UCP1 durante las siguientes horas, tomando como 100% el valor inicial. Los resultados incluidos en la **Figura 21** muestran cómo únicamente se degradó la versión silvestre de UCP1, y sólo en presencia de Cdh1, lo que refuerza la idea de que, al menos **en células quiescentes (como son los adipocitos), UCP1 podría ser sustrato de APC/C-Cdh1.**





**Figura 21. UCP1 podría ser sustrato directo de APC/C-Cdh1.** Estudio de la vida media de las proteínas indicadas en MEFs primarios Cdh1(+/lox) y Cdh1(-/Δ), transfectados con UCP1 silvestre ('UCP1 RXXL') o UCP1 con la caja D mutada ('UCP1 AXXA'), y sincronizados en G<sub>0</sub>-G<sub>1</sub> (arriba). Tras el tratamiento de las células con cicloheximida (CHX, 10 μg/ml) para inhibir la síntesis proteica, se analizó bioquímicamente, mediante *Western blot*, la evolución de los niveles proteicos tras distintas horas de tratamiento. Se representa la intensidad de las bandas para UCP1, normalizando frente al control de carga y frente a las muestras recogidas a tiempo cero (abajo). \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001

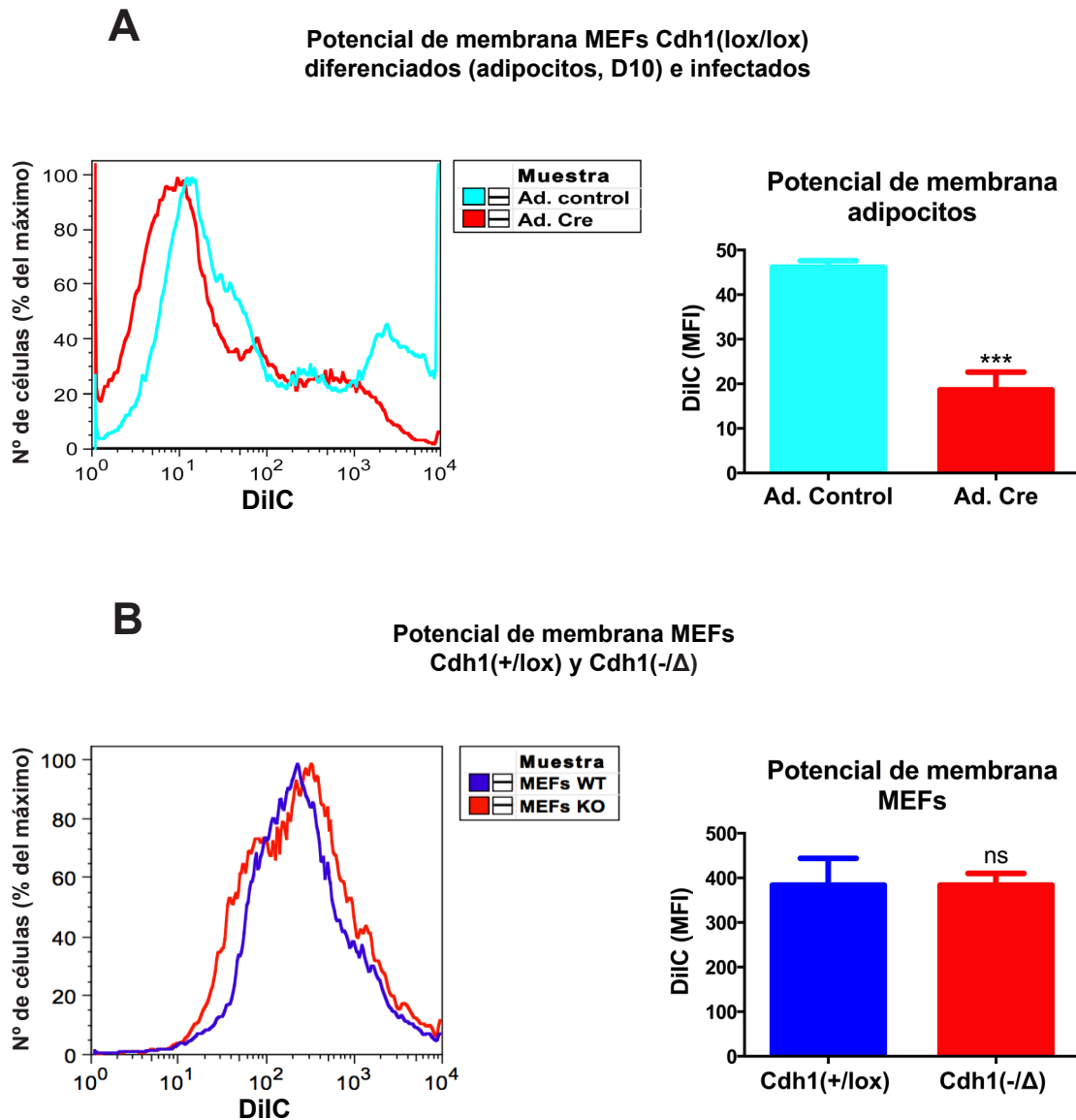
2.7. El incremento de UCP1 en los adipocitos Cdh1KO es funcional, y tiene importantes consecuencias metabólicas.

La depleción aguda de Cdh1 en adipocitos maduros incrementa los niveles proteicos de UCP1. Pero, ¿ese exceso de UCP1 es activo? ¿Tiene alguna consecuencia metabólica en los adipocitos? Mediante una serie de experimentos *in vitro*, demostramos la respuesta afirmativa a ambas preguntas. Generamos adipocitos maduros WT y Cdh1KO a partir de la adipogénesis y posterior infección con adenovirus de MEFs Cdh1(lox/lox), y analizamos su potencial de membrana, el consumo de oxígeno y su capacidad glucolítica.

UCP1 es una proteína mitocondrial desacoplante, de forma que el primer impacto de su actividad en la célula es la disipación del potencial de membrana mitocondrial. Para

## -Resultados-

estudiar el potencial de membrana, se marcaron los adipocitos con la sonda DiIC, que se acumula en la mitocondria a favor del potencial de membrana, y la cuantificamos por citometría de flujo. Así, la intensidad de fluorescencia de la sonda correlacionó directamente con el potencial de membrana mitocondrial. La depleción de Cdh1 condujo a una disminución del potencial de membrana en adipocitos (**Figura 22A**), pero no en MEFs (**Figura 22B**), indicando que el exceso de UCP1 en las células Cdh1KO era funcional.



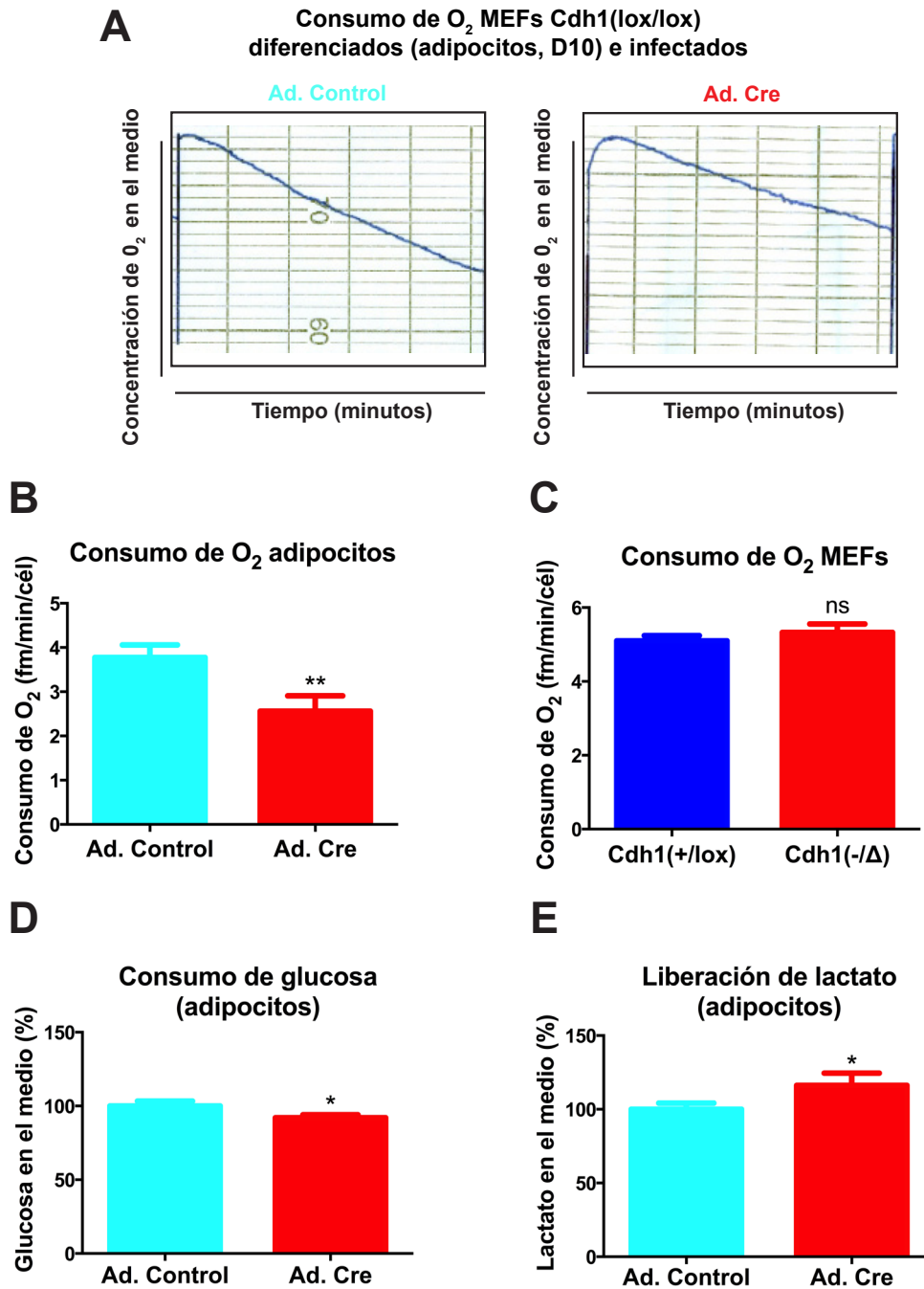
**Figura 22. Los adipocitos deplecionados de Cdh1 presentan un menor potencial de membrana mitocondrial.** Se presentan histogramas superpuestos de detección del marcaje con DiIC (sonda que penetra en la mitocondria a favor del potencial de membrana, 10  $\mu$ M, 15 minutos) por citometría de flujo, para (**A**, izquierda) adipocitos Cdh1(lox/lox) (generados a partir de la diferenciación de MEFs primarios) infectados con adenovirus control y Cre, y (**B**, izquierda) cultivos de MEFs primarios control y deficientes en Cdh1. A partir de los histogramas, se calculó la intensidad media de fluorescencia (MFI) de la sonda en los cultivos, valorando el potencial de membrana de los mismos (abajo, n=3). ns= no significativo; \*\*\*p<0,001

La consecuencia directa de la disipación del potencial de membrana mitocondrial es una menor eficiencia de la cadena respiratoria y de la síntesis de ATP aerobia, que puede acompañarse de cambios en el consumo de oxígeno. La activación de UCP1 resulta en una menor eficiencia de la cadena respiratoria, ya que se disipa el gradiente electroquímico que ésta genera (es decir, disminuye el potencial de membrana) y se produce menos ATP por respiración aerobia (ver 'Introducción'). Los adipocitos marrones *in vivo* compensan la pérdida de eficiencia de la cadena respiratoria incrementando su actividad. Aumentan tanto la glucólisis como la b-oxidación de los ácidos grasos, y el poder reductor generado se utiliza en la cadena respiratoria, hiperactivándola y compensando así el déficit energético de la respiración aerobia (Nicholls & Locke, 1984). El último aceptor de electrones en la cadena respiratoria es el oxígeno (de ahí que sea un proceso aerobio), por lo que su hiperactivación en los adipocitos marrones conduce a un incremento en el consumo de oxígeno (Vijgen et al., 2013). Sin embargo, los adipocitos que generamos *in vitro*, aunque expresen UCP1 (gracias al tratamiento con rosiglitazona) proceden a partir de MEFs y de una adipogénesis de carácter blanco. Es decir, posiblemente no muestren las mismas capacidades fisiológicas que los adipocitos marrones per sé. De hecho, la sobreexpresión de UCP1 en tipos celulares distintos a los adipocitos marrones sí aumenta la fuga de protones, pero sin estimular la termogénesis (Hoerter et al., 2004). Para indagar en esta cuestión, decidimos valorar la tasa de consumo de oxígeno de los adipocitos WT y Cdh1KO, midiendo de manera continua los niveles de oxígeno en su medio de cultivo (nutricionalmente rico) a lo largo de 10 minutos (**Figura 23A**). Los adipocitos Cdh1KO (**Figura 23A** y **Figura 23B**), pero no los MEFs mutantes sin diferenciar (**Figura 16C**), mostraron un menor consumo de oxígeno que las células control. Esto sugiere que, al menos *in vitro*, la ausencia de Cdh1 genera un incremento en el consumo de oxígeno, pero sólo en células positivas para UCP1.

Los adipocitos Cdh1KO parecen presentar una menor eficiencia de la cadena respiratoria, que no intentan compensar incrementando su actividad. La presumible reducción en la síntesis de ATP por respiración aerobia podrían compensarla incrementando las rutas catabólicas anaerobias. Por ello, analizamos cuán activa está la fermentación láctica en los adipocitos WT y Cdh1KO, evaluando dos medidas indirectas: el consumo de glucosa (sustrato de la glucólisis) y la liberación de lactato (subproducto de la fermentación anaerobia) al medio. Los resultados apuntan a un mayor consumo de glucosa (**Figura 23D**) y liberación de lactato (**Figura 23E**) en los adipocitos deplecionados de Cdh1, sugiriendo un incremento de la fermentación láctica en estas células. Aunque fisiológicamente no sean extrapolables *in vivo*, estos resultados indican que, en los adipocitos Cdh1KO generados *in vitro*, el incremento de UCP1 tiene actividad y deriva en consecuencias metabólicas.

**En conjunto, estos resultados indican que el incremento de UCP1 en los adipocitos Cdh1KO es funcional, y deriva *in vitro* en una disminución del potencial de membrana mitocondrial, menor consumo de oxígeno e incremento en la generación anaerobia de energía.**

## -Resultados-



**Figura 23.** Los adipocitos deplecionados de Cdh1 muestran un menor consumo de oxígeno, y un mayor incremento de glucosa y liberación de lactato. **A.** Se utilizó un oxígrado para evaluar la concentración de oxígeno en el medio de cultivo de forma continua durante 10 minutos, obteniendo así una tasa (pendiente) de consumo de oxígeno de **(B)** adipocitos Cdh1(lox/lox) (generados a partir de la diferenciación de MEFs primarios) infectados con adenovirus control y Cre, y **(C)** MEFs primarios Cdh1(+/lox) y Cdh1(-/-) no diferenciados (n=3). **D.** Se valoró el consumo de glucosa en los adipocitos Cdh1(lox/lox) infectados con adenovirus control y Cre, midiendo la glucosa (utilizando un glucómetro) en el medio de cultivo a tiempo cero y tras 24 horas de cultivo. **(E)** En paralelo, y en los mismos cultivos, se cuantificó espectrofotométricamente el lactato liberado al medio durante esas 24 horas. En **D** y **E**, se consideraron como 100% los valores obtenidos en los cultivos infectados con adenovirus control (n=3). \*p<0,05; \*\*p<0,01

---

*En resumen, los adipocitos carentes de Cdh1 presentan una menor activación b-adrenérgica, probablemente debido a la hiperactivación de la ruta PI3K/AKT. A pesar de ello, muestran mayor cantidad UCP1, funcional *in vitro*, debido a un incremento en su estabilidad. Además, UCP1 podría ser un sustrato directo de APC/C-Cdh1, al menos en células quiescentes.*

---

### 3. Consecuencias fisiológicas *in vivo* de la depleción específica de Cdh1 durante la adipogénesis y/o en adipocitos maduros.

Hasta ahora, hemos demostrado el papel de Cdh1 en la adipogénesis y en la fisiología del adipocito maduro *in vitro*, pero desconocemos si esta actividad tiene consecuencias en la fisiología del tejido adiposo *in vivo*.

Para explorar esta cuestión, generamos dos modelos de deleción génica de Cdh1 específica de tejido adiposo. Ambos se basan en la deleción mediada por la recombinasa Cre, cuya expresión, bajo el control de promotores específicos de tejido adiposo (ver 'Introducción'), asegura que la deleción de Cdh1 sólo ocurra en tejido adiposo:

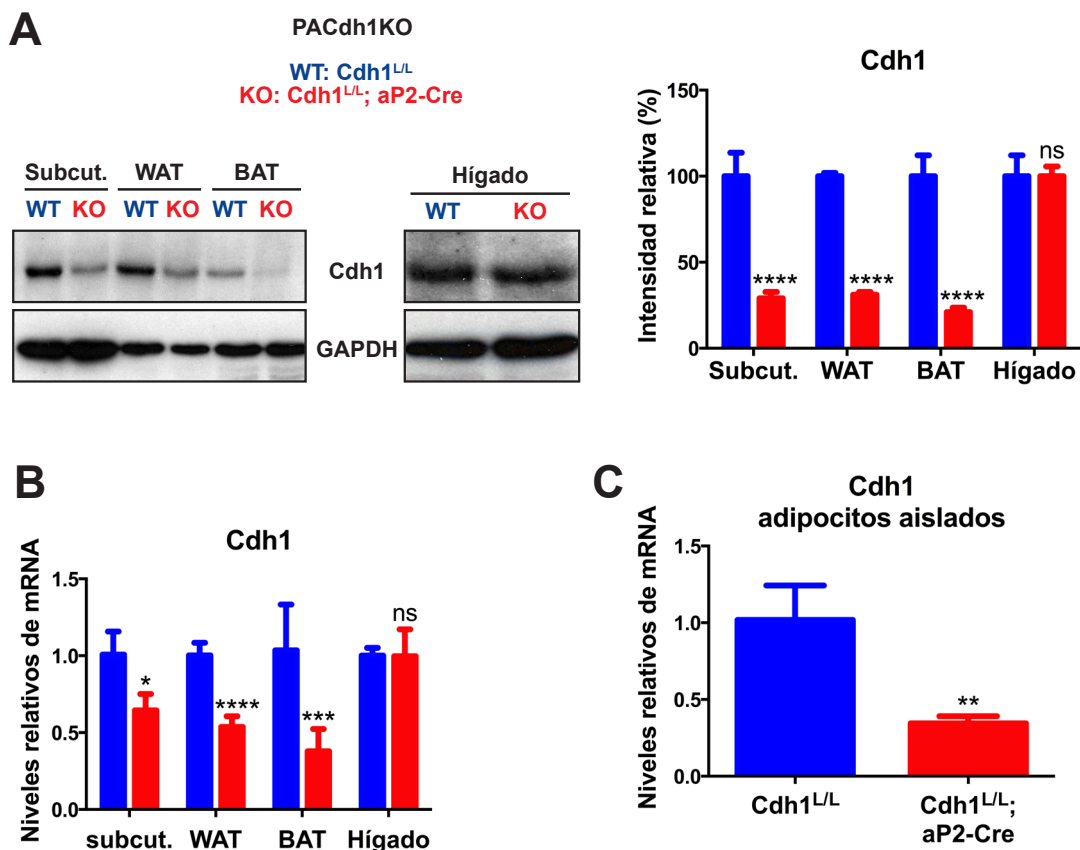
- **Modelo PACdh1KO**, o deleción de Cdh1 en preadipocitos. En esta línea la escisión de Cdh1 está mediada por el transgén aP2-Cre, el más utilizado durante años en la generación de modelos *knockout* (KO) específicos de tejido adiposo. Los ratones WT presentan el genotipo Cdh1(lox/lox) [**Cdh1<sup>L/L</sup>**], mientras que los ratones mutantes (que llamamos PACdh1KO) son Cdh1(lox/lox); aP2-Cre [**Cdh1<sup>L/L</sup>; aP2-Cre**]. aP2 (también conocido como FABP4) es una proteína que se expresa específicamente durante la adipogénesis, desde preadipocitos hasta adipocitos maduros, por lo que este modelo permite estudiar las consecuencias *in vivo* de la carencia de Cdh1 durante la diferenciación adipogénica y en el adipocito maduro.
- **Modelo MACdh1KO**, o deleción de Cdh1 en adipocitos maduros. En este caso la escisión de Cdh1 está mediada por el transgén adipoQ-Cre, actualmente el más empleado en la generación de modelos KO específicos de tejido adiposo. Los ratones WT son Cdh1(lox/lox) [**Cdh1<sup>L/L</sup>**], mientras que los ratones mutantes (que llamamos MACdh1KO) son Cdh1(lox/lox); adipoQ-Cre [**Cdh1<sup>L/L</sup>; adipoQ-Cre**]. AdipoQ (adiponectina) es una proteína específica de adipocitos maduros, por lo que este modelo permite estudiar *in vivo* la función específica de Cdh1 en adipocitos diferenciados.

Además, algunos de los fenotipos observados se confirmaron en ratones constitutivamente deficientes para Cdh1. En este caso, los ratones WT son **Cdh1(+/lox)**, mientras que los ratones Cdh1KO son Cdh1(-/lox); Sox2-Cre, a los que llamaremos para simplificar **Cdh1(-/Δ)**.

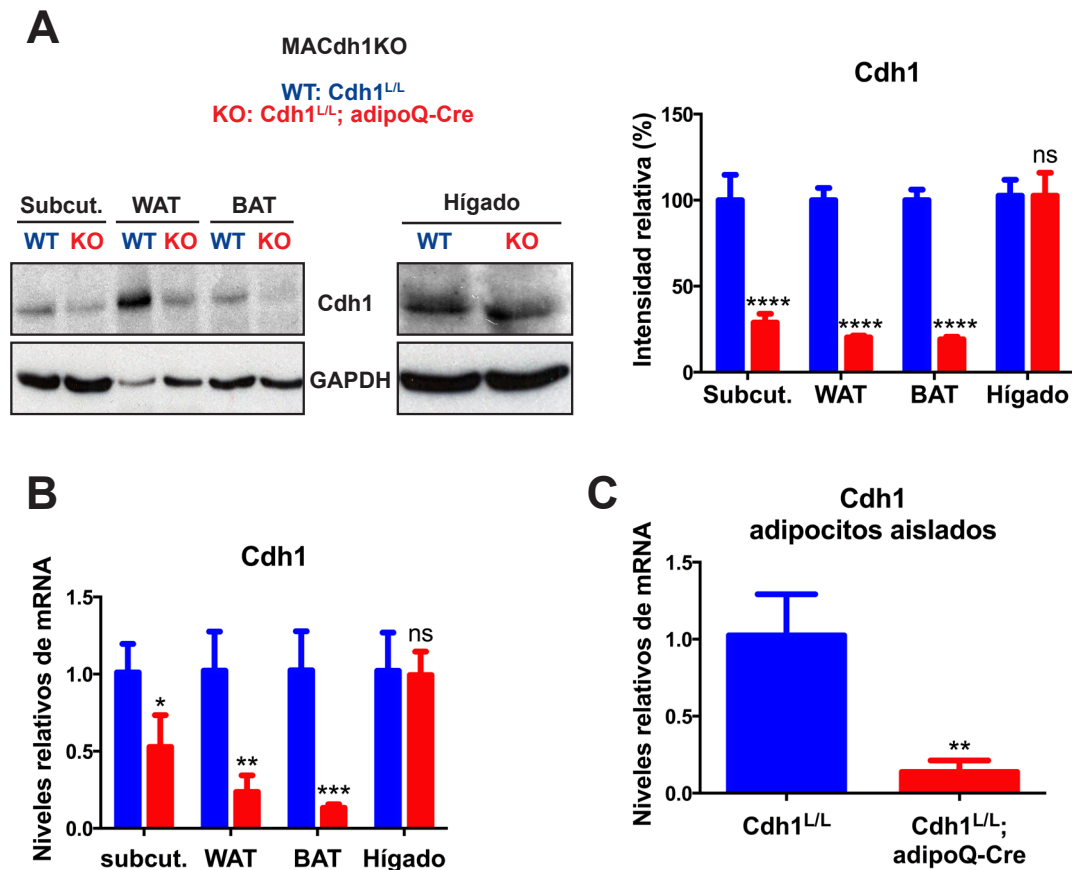
## -Resultados-

### 3.1. Deleción de Cdh1 mediada por el transgén aP2-Cre o adipoQ-Cre.

En primer lugar, se validó el correcto funcionamiento de nuestras líneas de ratón Cdh1KO específicas de tejido adiposo. Para ello, se analizaron los niveles proteicos y de mRNA de Cdh1 en tejidos grasos [en grasa blanca subcutánea inguinal ('subcut. '), en grasa blanca perigonadal ('WAT'), y en grasa marrón ('BAT')] y en hígado, como tejido control no adiposo. Estos experimentos pueden subestimar la depleción de Cdh1 en adipocitos, ya que utilizamos los tejidos grasos completos, que no sólo poseen células de la línea adipogénica sino también otros tipos celulares (endoteliales, eritrocitos, macrófagos...) donde no se espera la escisión de Cdh1. Además, los adipocitos poseen niveles de Cdh1 muy bajos en comparación con otros tipos celulares. Solucionamos este problema cuantificando también la depleción de Cdh1 en adipocitos maduros aislados de grasa blanca perigonadal. En los ratones PACdh1KO, los niveles de proteína (**Figura 24A**) y de mRNA (**Figura 24B**) de Cdh1 se redujeron eficientemente en los tejidos adiposos analizados (grasa blanca subcutánea inguinal, WAT y BAT) y en adipocitos aislados, con una depleción de Cdh1 del 70% en los animales mutantes (**Figura 24C**). En los mutantes del modelo MACdh1KO también se produjo una depleción significativa de Cdh1 en los mismos depósitos grasos (**Figura 25A** y **Figura 25B**) y en adipocitos aislados de grasa perigonadal, con una depleción de Cdh1 cercana al 90% en los animales mutantes (**Figura 25C**).



**Figura 24. Depleción específica de Cdh1 en tejido adiposo en el modelo PACdh1KO.** Por *Western blot* (A) y q-RT-PCR (B) se analizó la escisión de *Cdh1* mediada por el transgén aP2-Cre en animales del modelo PACdh1KO (WT: *Cdh1*<sup>L/L</sup>, y KO: *Cdh1*<sup>L/L</sup>; aP2-Cre), en lisados de tejidos completos (subcut: grasa blanca subcutánea inguinal; WAT: grasa blanca perigonadal; BAT: grasa marrón), y considerando como 100% los valores de las muestras control (n=3-6). C. Se realizó el mismo estudio, por q-RT-PCR, en adipocitos maduros aislados de la grasa perigonadal de animales de los genotipos indicados (n=3). ns= no significativo; \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001; \*\*\*\*p<0,0001



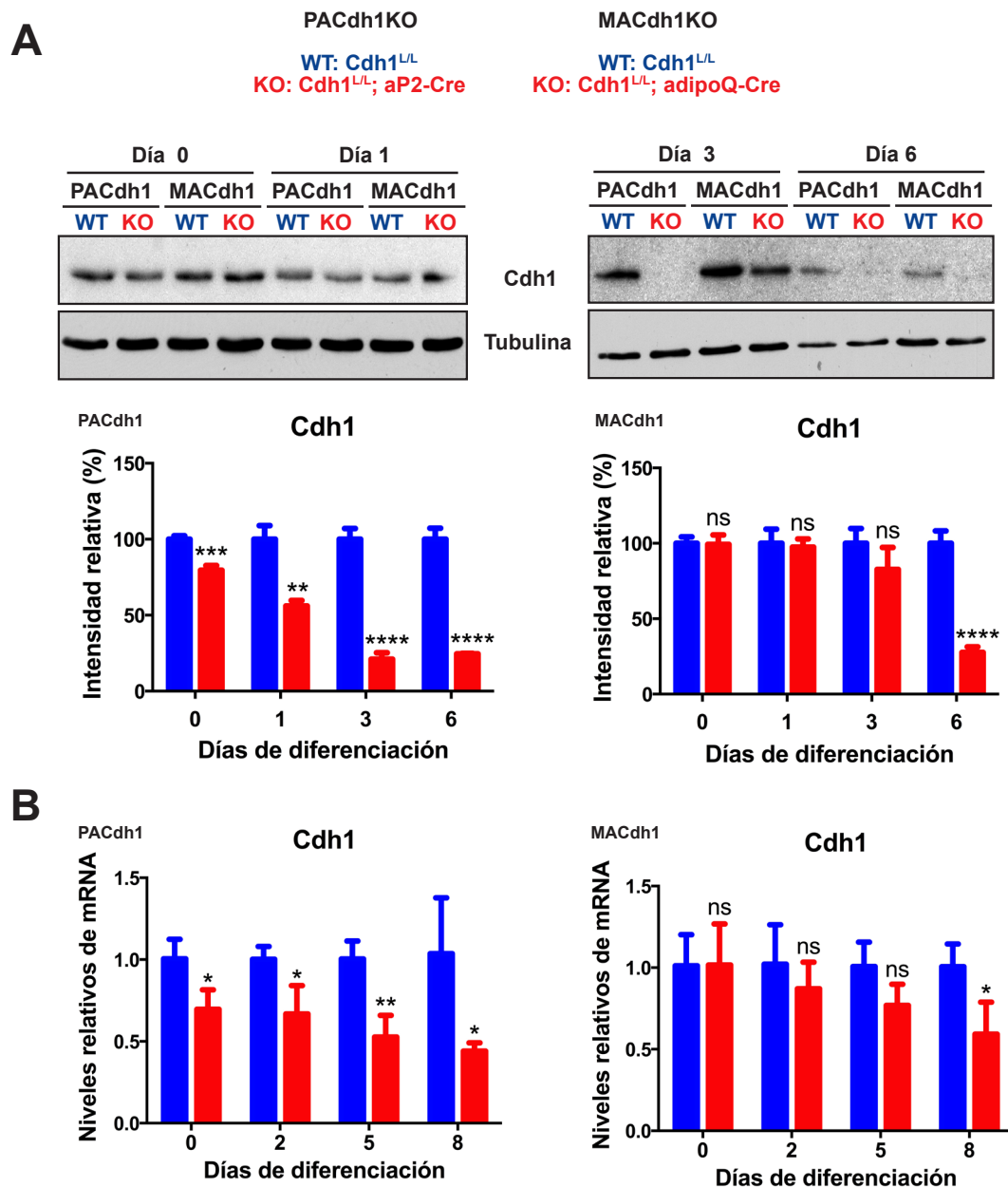
**Figura 25. Depleción específica de Cdh1 en tejido adiposo en el modelo MACdh1KO.** Por *Western blot* (A) y q-RT-PCR (B) se analizó la escisión de *Cdh1* mediada por el transgén adipoQ-Cre en animales del modelo MACdh1KO (WT: *Cdh1*<sup>L/L</sup>, y KO: *Cdh1*<sup>L/L</sup>; adipoQ-Cre), en lisados de tejidos completos (subcut: grasa blanca subcutánea inguinal; WAT: grasa blanca perigonadal; BAT: grasa marrón) y considerando como 100% los valores de las muestras control (n=3-6). C. Se realizó el mismo estudio, por q-RT-PCR, en adipocitos maduros aislados de la grasa perigonadal de animales de los genotipos indicados (n=3). ns= no significativo; \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001; \*\*\*\*p<0,0001

Habiendo confirmado que la delección de *Cdh1* era específica de tejido adiposo, también quisimos determinar cuándo se producía temporalmente esa escisión durante la adipogénesis. Para ello, aislamos preadipocitos primarios procedentes de la grasa subcutánea inguinal de animales WT y *Cdh1*KO de ambos modelos, e indujimos su diferenciación *in vitro* analizando los niveles de *Cdh1* a distintos tiempos tras la inducción.

Los animales PACdh1KO experimentaron una pérdida de *Cdh1* muy temprana en la

## -Resultados-

adipogénesis, que resultó significativa incluso ya en preadipocitos (**Figura 26A**). En cambio, en el modelo MACdh1KO la depleción de Cdh1 en los ratones mutantes sólo fue significativa en los adipocitos maduros (**Figura 26A**). Además, como se observa en la **Figura 26B**, estos resultados se corroboraron en ambos modelos al analizar el nivel de mRNA de Cdh1.



**Figura 26. Escisión de Cdh1 mediada por el transgén aP2-Cre (en el modelo PACdh1KO) y adipoQ-Cre (en el modelo MACdh1KO) en adipogénesis. A.** Inmunodetección, por *Western blot*, de Cdh1 a distintos días del proceso adipogénico de preadipocitos primarios, purificados de la grasa subcutánea inguinal de animales de los genotipos indicados (arriba). Abajo, se muestra la cuantificación de la intensidad de las bandas, normalizando en cada punto frente al control de carga y frente a las muestras de las células control (n=3-4). **B.** En estas mismas muestras se cuantificó la expresión relativa de Cdh1, mediante q-RT-PCR, en la diferenciación de preadipocitos control y deplecionados de Cdh1 de ambos modelos (n=3). ns= no significativo; \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001; \*\*\*\*p<0,0001

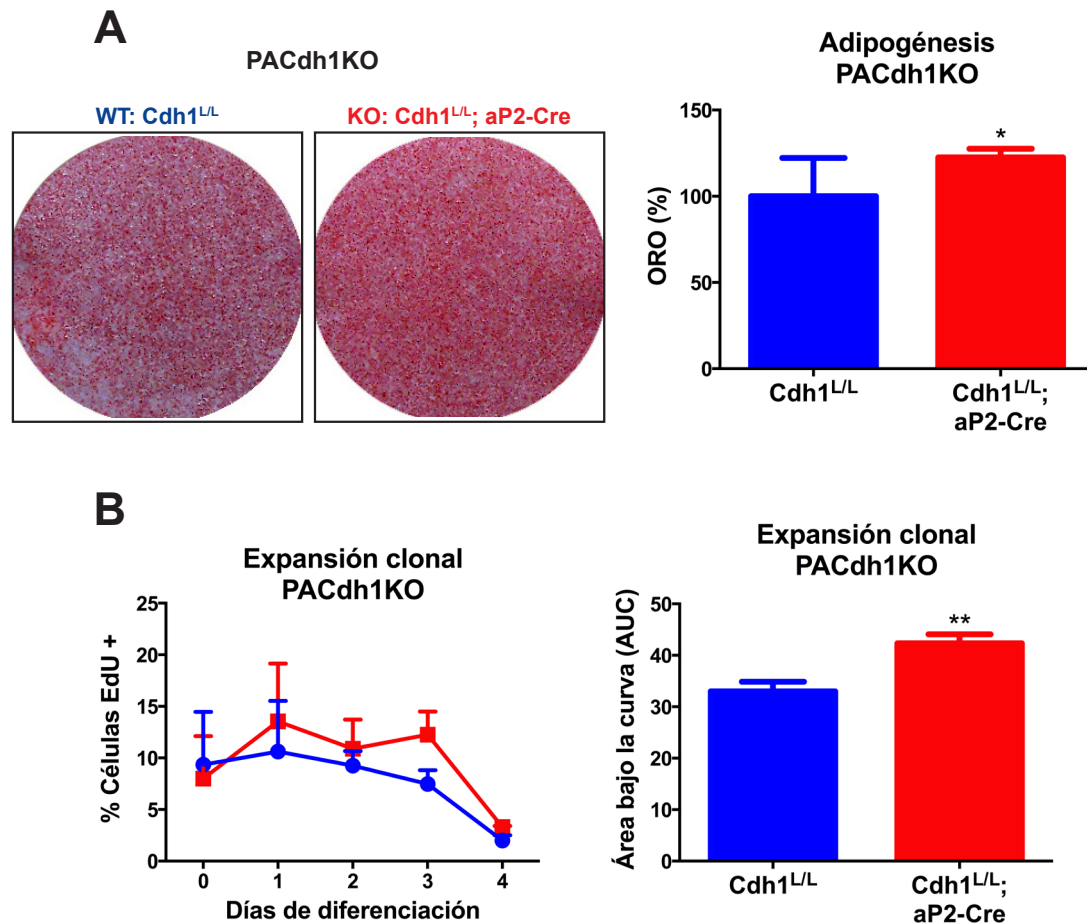


3.2. Efecto en la adipogénesis y en la expansión clonal de la depleción mediada por el transgén aP2-Cre (modelo PACdh1KO) o adipoQ-Cre (modelo MACdh1KO).

Seguidamente, evaluamos si la pérdida de Cdh1 mediada por ambos transgenes derivaba en cambios cuantitativos en la adipogénesis y en la expansión clonal en ensayos de diferenciación *in vitro* con preadipocitos primarios.

Los preadipocitos PACdh1KO presentaron, con respecto a los preadipocitos control, un modesto pero reproducible y significativo aumento en la adipogénesis (**Figura 27A**) y en la expansión clonal (**Figura 27B**). El exceso adipogénico de estos preadipocitos mutantes es muy ligero si lo comparamos con el que presentan los preadipocitos Cdh1(-/Δ) (**Figura 1C**). Sin embargo, hay que tener en cuenta que la depleción de Cdh1 en este modelo es parcial, por lo que es lógico que el fenotipo observado sea menos intenso.

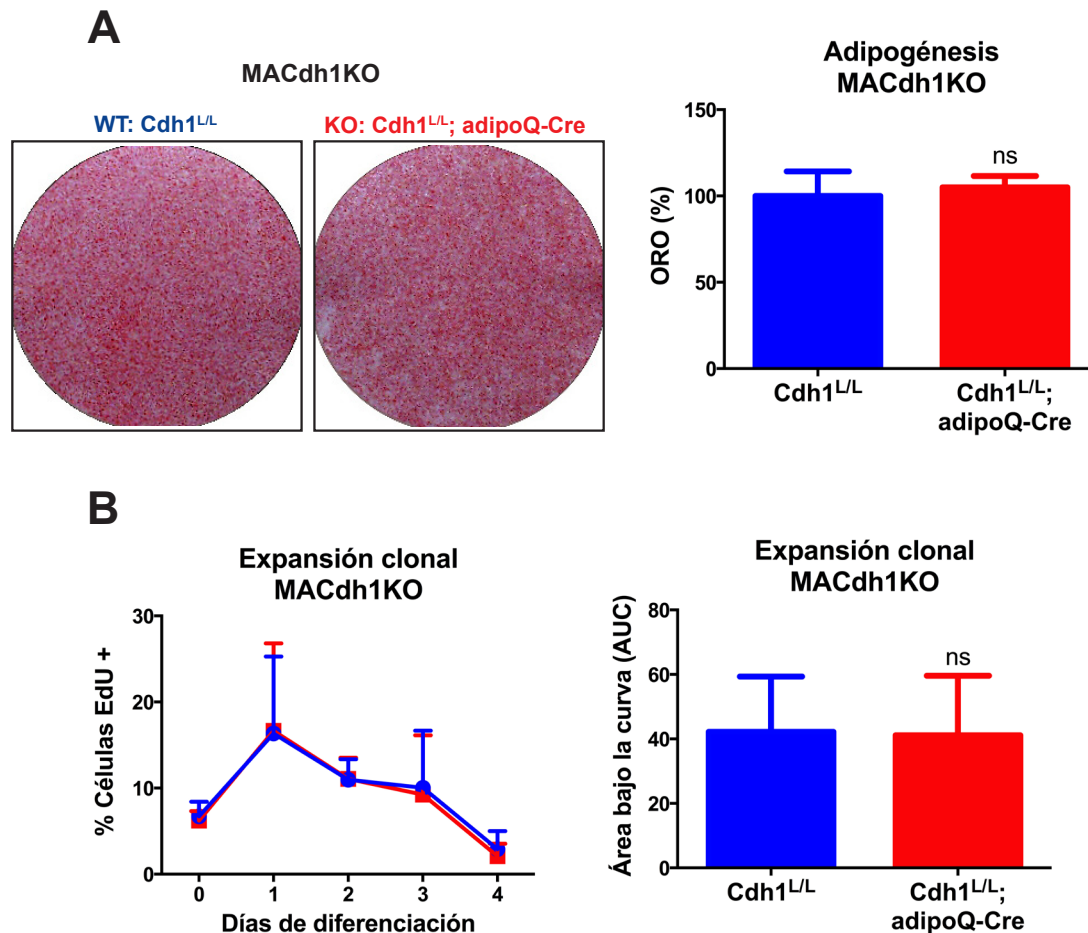
En cambio, como cabría esperar, la depleción de Cdh1 en adipocitos maduros (mo-



**Figura 27.** La adipogénesis y la expansión clonal aumentan cuando se escinde *Cdh1* en los preadipocitos primarios (PACdh1KO). **A.** Escaneo de placas con cultivos, teñidos con ORO, de preadipocitos primarios purificados de la grasa subcutánea inguinal de animales del modelo PACdh1KO (WT: Cdh1<sup>L/L</sup>, y KO: Cdh1<sup>L/L</sup>; aP2-Cre) diferenciados *in vitro* durante 6 días (izquierda). Se muestra la cuantificación de la adipogénesis de estos preadipocitos, mediante la extracción y valoración del ORO, considerando como 100% los valores obtenidos en los cultivos control (derecha, n=6). **B.** En estos mismos preadipocitos se realizó la cuantificación, por citometría de flujo, del porcentaje de células positivas para EdU durante los 4 primeros días de la diferenciación adipogénica (izquierda). A partir de estos perfiles se calculó el área bajo la curva (AUC, derecha) (n=6). \*p<0,05; \*\*p<0,01

## -Resultados-

delo MACdh1KO) no conllevó cambios ni en la adipogénesis (**Figura 28A**) ni en la expansión clonal (**Figura 28B**).

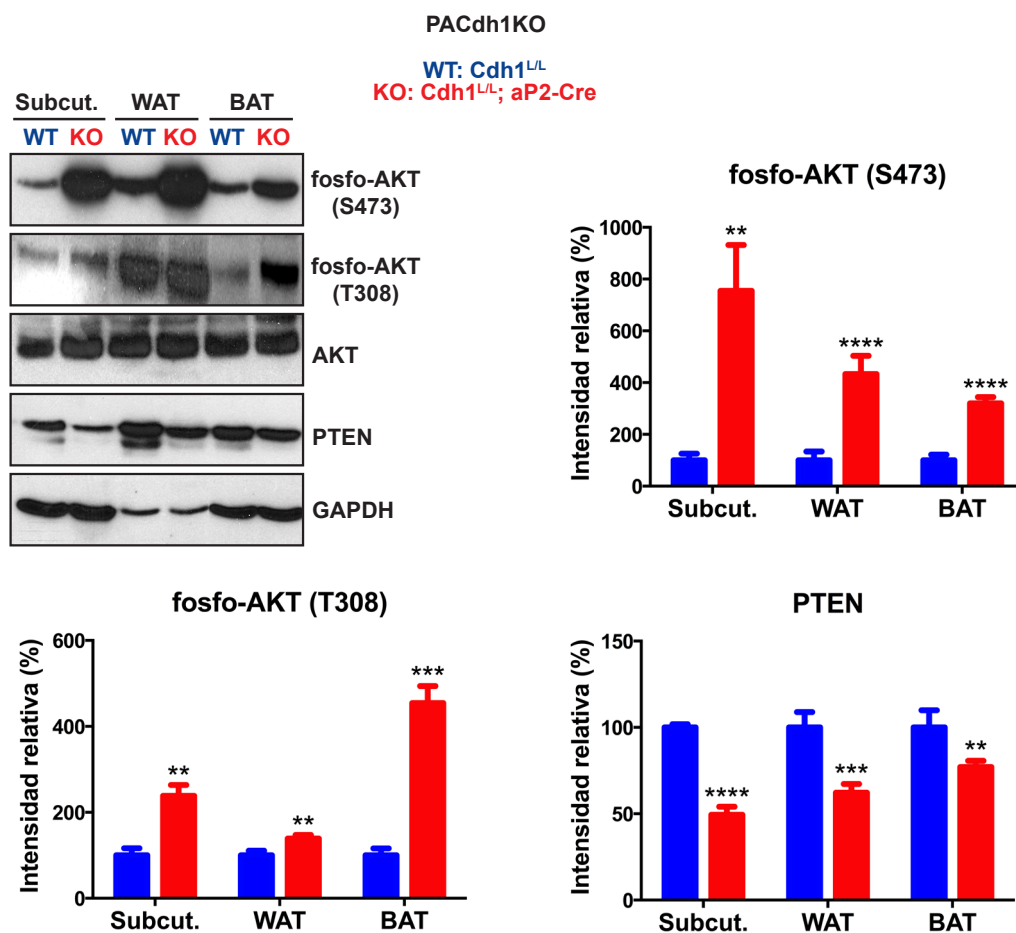


**Figura 28.** La adipogénesis y la expansión clonal no se ven afectadas cuando se escinde *Cdh1* en adipocitos maduros (MACdh1KO). **A.** Escaneo de placas con cultivos, teñidos con ORO, de preadipocitos primarios purificados de la grasa subcutánea inguinal de animales del modelo MACdh1KO (WT: Cdh1<sup>L/L</sup>, y KO: Cdh1<sup>L/L</sup>; adipoQ-Cre) diferenciados *in vitro* durante 6 días (izquierda). Se muestra la cuantificación de la adipogénesis de estos preadipocitos, mediante la extracción y valoración del ORO, considerando como 100% los valores obtenidos en los cultivos control (derecha, n=6). **B.** En estos mismos preadipocitos se realizó la cuantificación, por citometría de flujo, del porcentaje de células positivas para EdU durante los 4 primeros días de la diferenciación adipogénica (izquierda). A partir de estos perfiles se calculó el área bajo la curva (AUC, derecha) (n=6). \*p<0,05; \*\*p<0,01

### 3.3. Hiperactivación de la ruta PI3K/AKT y estabilización de UCP1, tras la depleción de Cdh1 en tejido adiposo, *in vivo*.

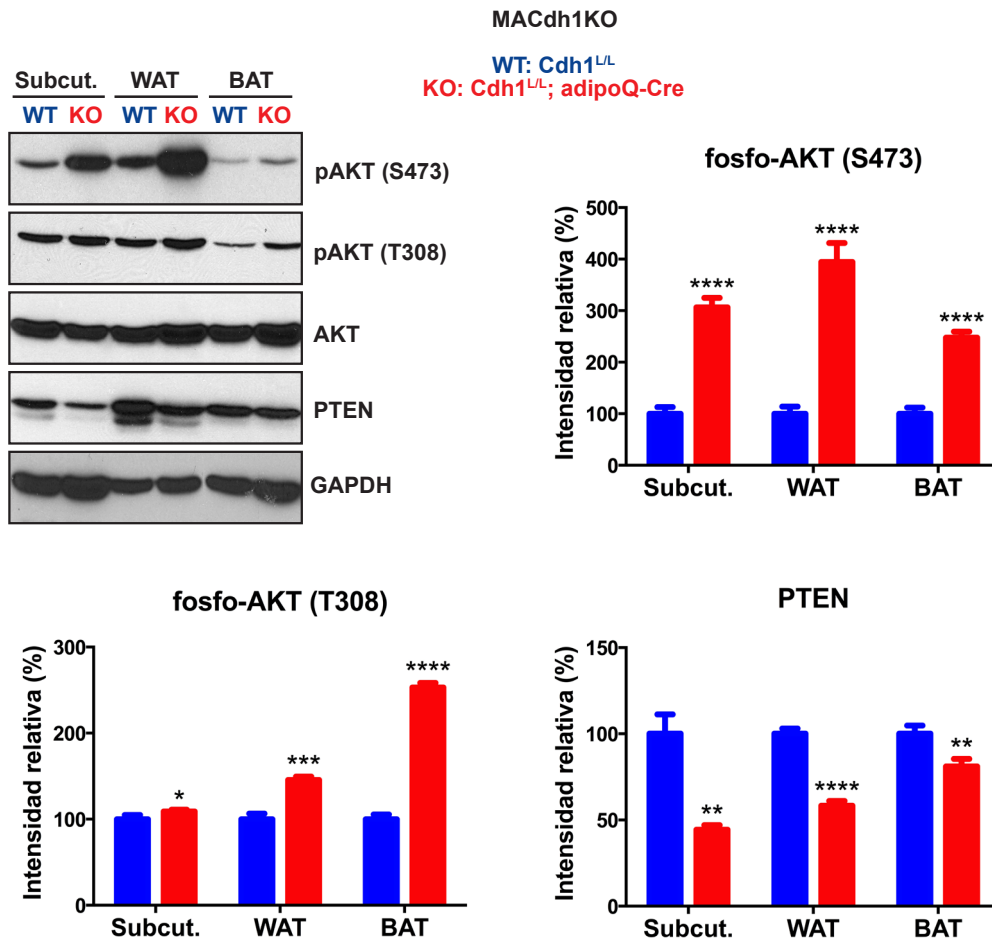
Una vez demostrado que ambos modelos inducen la depleción de Cdh1 bien desde el inicio de la adipogénesis (modelo PACdh1KO) o bien sólo en adipocitos maduros (modelo MACdh1KO), nos preguntamos si esa depleción conducía, como sucedía *in vitro*, a la hiperactivación de la ruta PI3K/AKT y a la estabilización de UCP1.

El análisis bioquímico de extractos de los distintos depósitos grasos confirmó un incremento en la fosforilación de AKT tanto en las muestras procedentes de animales PACdh1KO (Figura 29) como en las de ratones MACdh1KO (Figura 30). Es decir, la ruta PI3K/AKT también está hiperactiva *in vivo* en los tejidos deplecionados de Cdh1. Además, al igual que ocurría *in vitro*, los niveles proteicos de PTEN aparecen reducidos.



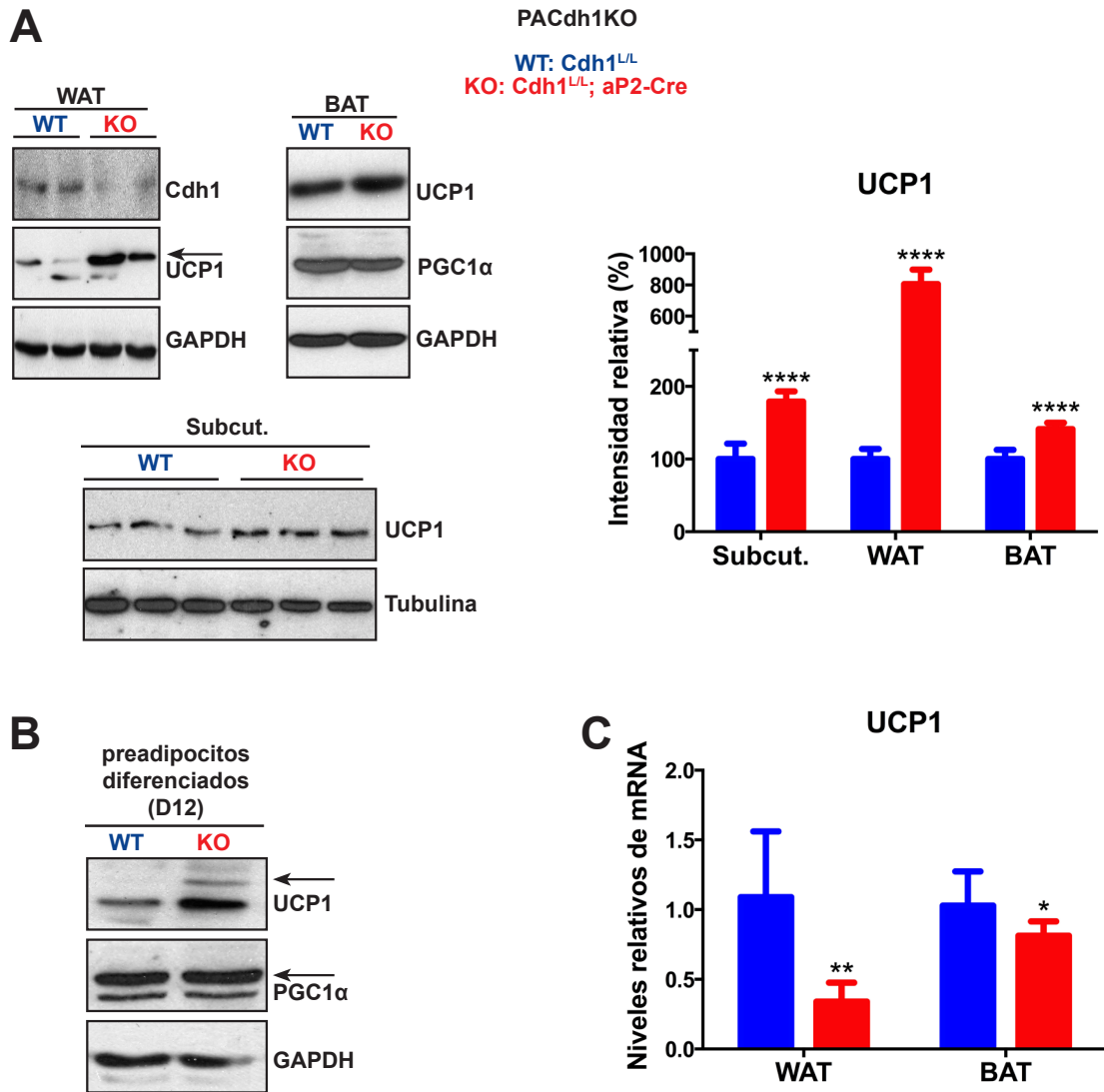
**Figura 29.** *In vivo*, la depleción temprana de Cdh1 durante la adipogénesis genera tejidos grasos con la ruta PI3K/AKT hiperactiva. En animales del modelo PACdh1KO (WT: Cdh1<sup>L/L</sup>, y KO: Cdh1<sup>L/L</sup>; aP2-Cre), tras un ayuno de 13-14 horas, se recogieron distintos tejidos grasos (subcut: grasa blanca subcutánea inguinal; WAT: grasa blanca perigonadal; BAT: grasa marrón), y se analizó en ellos, por *Western blot*, los niveles de distintas proteínas de la ruta PI3K/AKT (arriba a la izquierda). Se muestra la cuantificación de la intensidad de las bandas, normalizando frente al control de carga y frente a las muestras de los animales control (n=3-6). \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001; \*\*\*\*p<0,0001

## -Resultados-



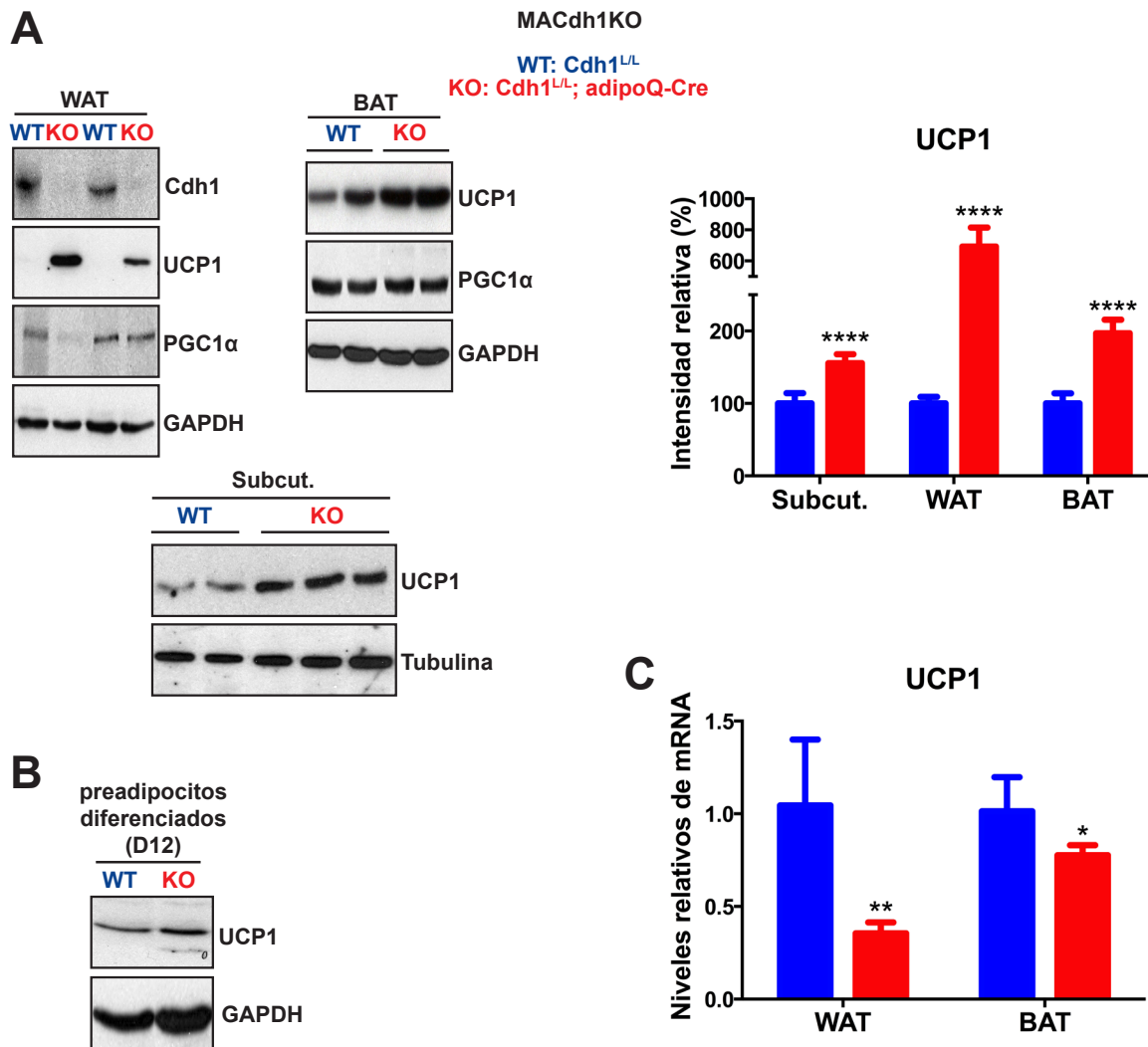
**Figura 30.** *In vivo*, la depleción de *Cdh1* en adipocitos maduros genera tejidos grasos con la ruta PI3K/AKT hiperactiva. En animales del modelo MACdh1KO (WT:  $Cdh1^{L/L}$ , y KO:  $Cdh1^{L/L}; adipoQ-Cre$ ), tras un ayuno de 13-14 horas, se recogieron distintos tejidos grasos (subcut: grasa blanca subcutánea inguinal; WAT: grasa blanca perigonadal; BAT: grasa marrón), y se analizó en ellos, por *Western blot*, los niveles de distintas proteínas de la ruta PI3K/AKT (arriba a la izquierda). Se muestra la cuantificación de la intensidad de las bandas, normalizando frente al control de carga y frente a las muestras de los animales control (n=3-4). \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$

Como evidencian las **Figuras 31A** y **32A**, en ambos modelos la depleción de *Cdh1* *in vivo* indujo un aumento en los niveles proteicos de UCP1 en los distintos depósitos grasos (en BAT, grasa subcutánea e, incluso en mayor medida, en WAT). Incluso, *in vitro*, la diferenciación de preadipocitos de ambos modelos produjo adipocitos con niveles proteicos de UCP1 incrementados (**Figura 31B** y **Figura 32B**). Sorprendentemente, y al igual que sucede *in vitro*, los tejidos grasos de los ratones mutantes mostraron menores niveles de mRNA de UCP1 que los de los ratones control (**Figura 31C** y **Figura 32C**).



**Figura 31. *In vivo*, la depleción temprana de Cdh1 durante la adipogénesis genera tejidos grasos con niveles proteicos aumentados de UCP1. A.** Inmunodetección, por *Western blot*, de las proteínas indicadas en lisados de tejidos completos (subcut: grasa blanca subcutánea inguinal; WAT: grasa blanca perigonadal; BAT: grasa marrón) de animales del modelo PACdh1KO (WT: Cdh1<sup>L/L</sup>, y KO: Cdh1<sup>L/L</sup>; aP2-Cre) (izquierda). A la derecha se muestra la cuantificación de la intensidad de las bandas para UCP1, normalizando frente al control de carga y frente a las muestras de los animales control (n=3-8). **B.** Se realizó el mismo análisis, por *Western blot*, en los preadipocitos primarios purificados de grasa blanca subcutánea de animales de los genotipos indicados, diferenciados durante 12 días (n=3). **C.** En estos mismos animales, se realizó la cuantificación de los niveles relativos de mRNA de UCP1, por q-RT-PCR, en grasa blanca perigonadal (WAT) y grasa marrón (BAT) (n=8). \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*\*p<0,0001

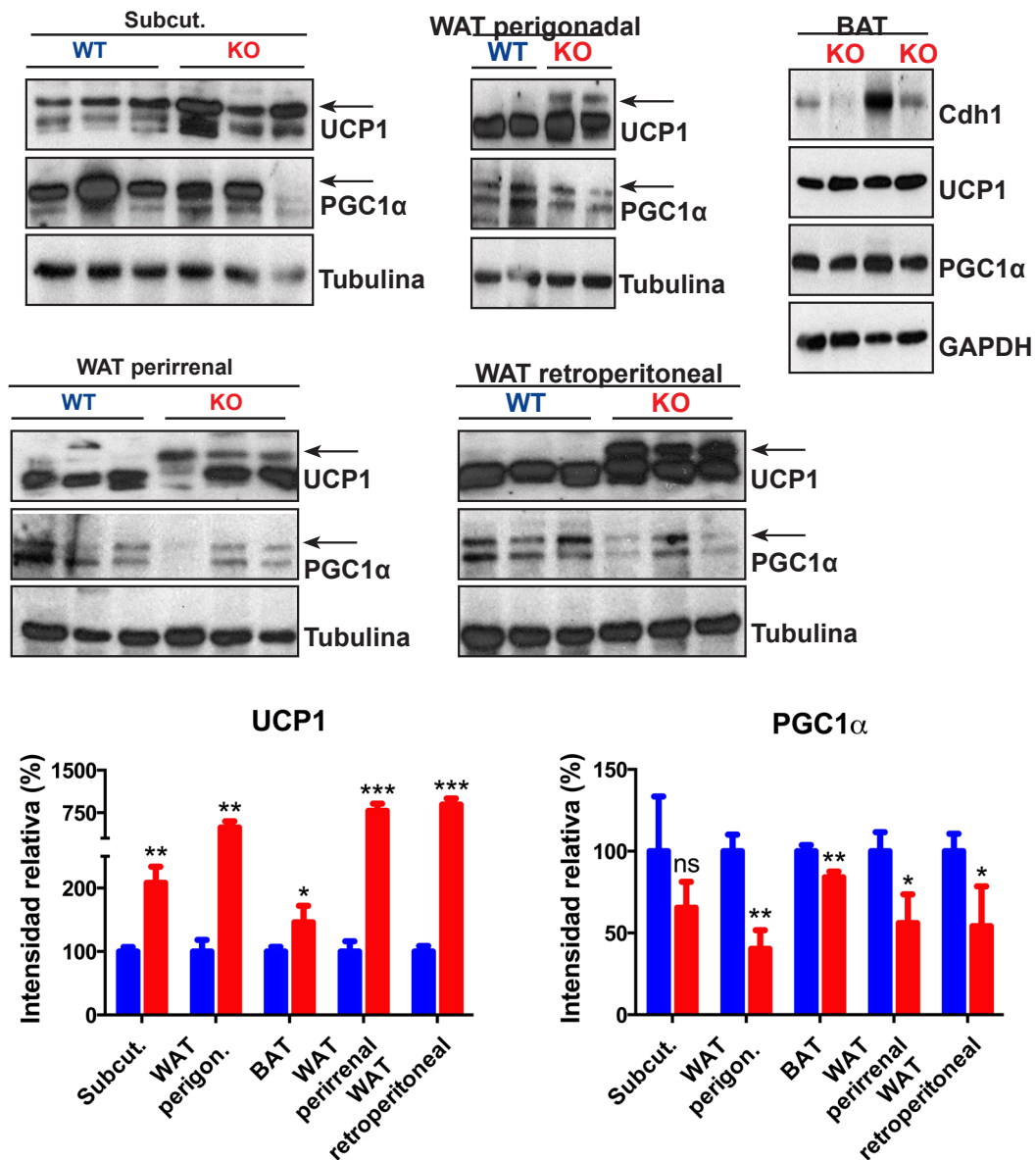
## -Resultados-



**Figura 32.** *In vivo*, la depleción de Cdh1 en adipocitos maduros genera tejidos grasos con niveles proteicos aumentados de UCP1. **A.** Inmunodetección, por *Western blot*, de las proteínas indicadas en lisados de tejidos completos (subcut: grasa blanca subcutánea inguinal; WAT: grasa blanca perigonadal; BAT: grasa marrón) de animales del modelo MACdh1KO (WT: Cdh1<sup>L/L</sup>, y KO: Cdh1<sup>L/L</sup>; adipoQ-Cre) (izquierda). A la derecha se muestra la cuantificación de la intensidad de las bandas para UCP1, normalizando frente al control de carga y frente a las muestras de los animales control (n=3-8). **B.** Se realizó el mismo análisis, por *Western blot*, en los preadipocitos primarios purificados de grasa blanca subcutánea de animales de los genotipos indicados, diferenciados durante 12 días (n=3). **C.** En estos mismos animales, se realizó la cuantificación de los niveles relativos de mRNA de UCP1, por q-RT-PCR, en grasa blanca perigonadal (WAT) y grasa marrón (BAT) (n=5). \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*\*p<0,0001

Dada la importancia de esta observación, confirmamos el incremento de UCP1 en los distintos depósitos grasos de los ratones constitutivamente deficientes en Cdh1 (**Figura 33**). Los animales Cdh1KO presentan, en todos los tejidos adiposos analizados, mayores niveles proteicos de UCP1, más acusados cuánto más carácter 'blanco' tiene el tejido. Así, las mayores diferencias se observan en grasa perigonadal, grasa perirrenal y grasa retroperitoneal, todas ellas con una capacidad de *browning* baja, y donde la regulación transcripcional de UCP1 es menos importante. De nuevo, los niveles de PGC1a fueron significativamente menores en los tejidos carentes de Cdh1, con respecto a los depósitos procedentes de animales control. Estas evidencias apoyan la hipótesis de que Cdh1 promueve la degradación de UCP1.

WT: *Cdh1*(+/lox)    KO: *Cdh1*(-/-)



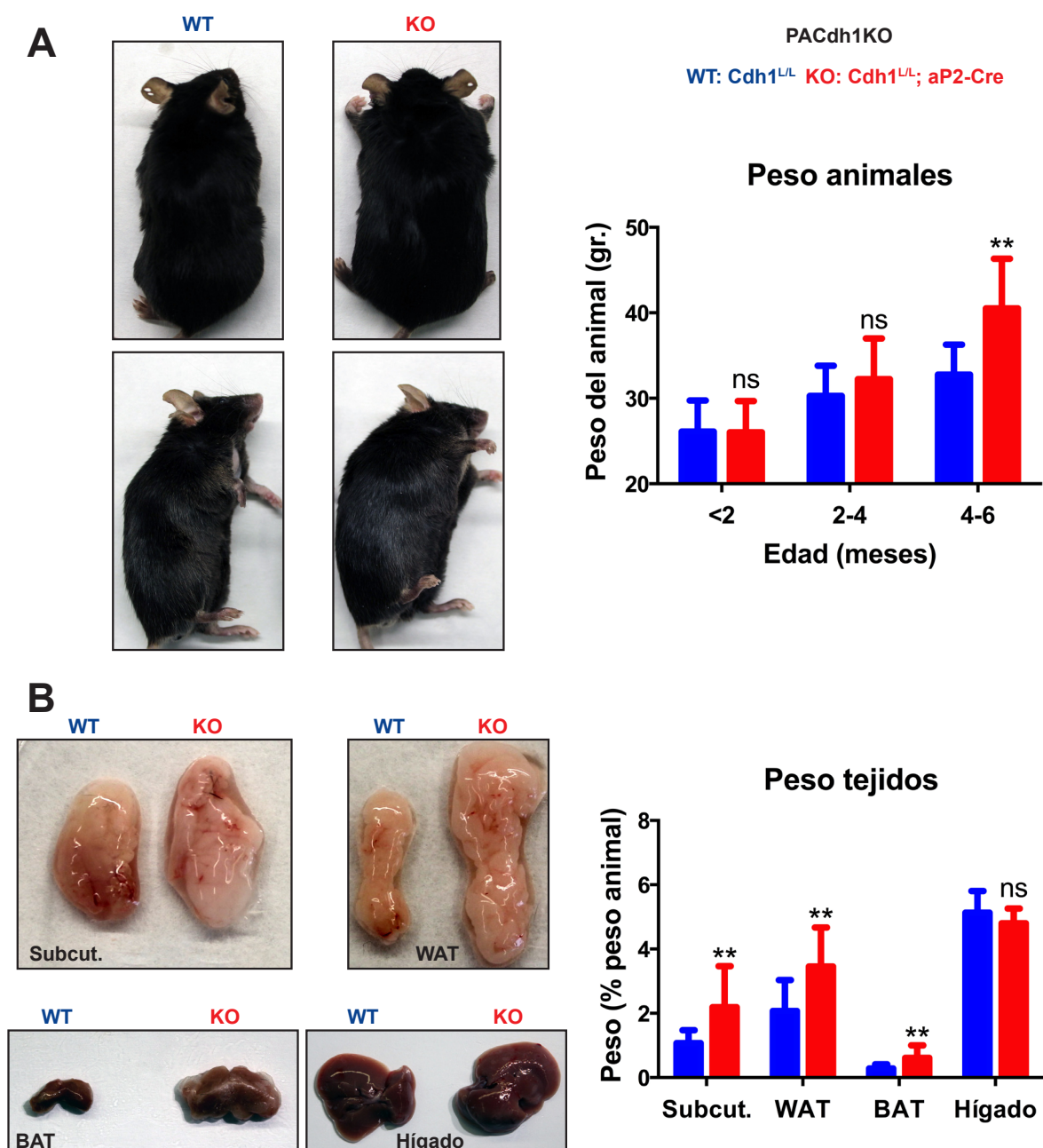
**Figura 33.** *In vivo*, la ausencia constitutiva de *Cdh1* genera depósitos grasos con mayores niveles proteicos de UCP1, y menores de PGC1α. Inmunodetección, por *Western blot*, de las proteínas indicadas en lisados de tejidos completos (subcut: grasa blanca subcutánea inguinal; WAT perigon.: grasa blanca perigonadal; WAT perirrenal: grasa blanca perirrenal; WAT retroperitoneal: grasa blanca retroperitoneal; BAT: grasa marrón) de animales *Cdh1*(+/lox) y *Cdh1*(-/-) (arriba). Abajo, se muestra la cuantificación de la intensidad de las bandas, normalizando frente al control de carga y frente a los tejidos de los animales control (n=3). ns= no significativo; \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001

## -Resultados-

### 3.4. Fenotipo basal de los animales PACdh1KO.

Los ratones PACdh1KO presentan una depleción parcial de Cdh1 en preadipocitos, lo que conduce a un incremento en su adipogénesis, mayor expansión clonal, hiperactivación de la ruta PI3K/AKT y un aumento en los niveles proteicos de UCP1 en tejido adiposo. Pero, ¿qué consecuencias tienen estas alteraciones en el fenotipo de los animales?

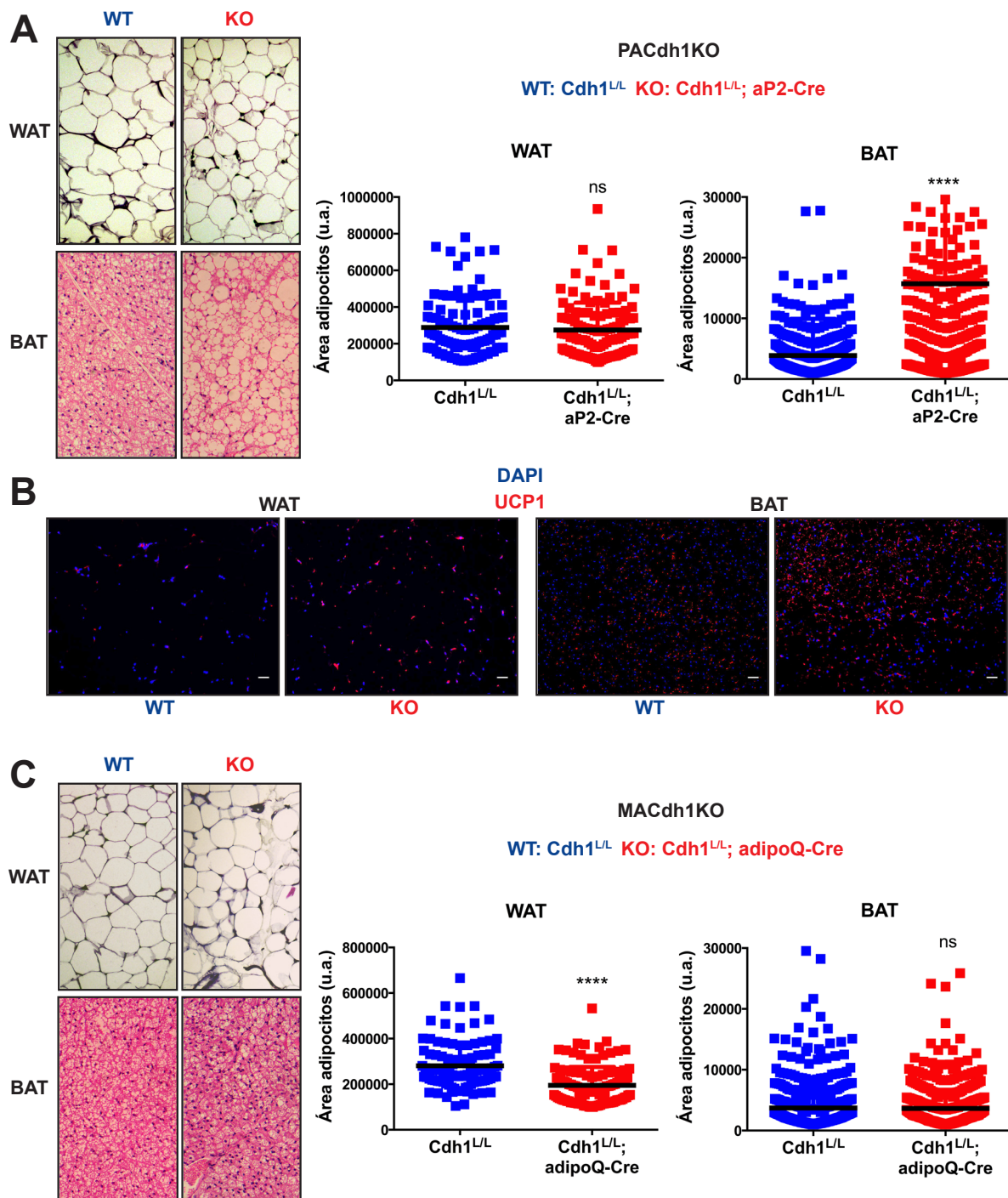
La expresión reducida de Cdh1 durante la adipogénesis generó animales con tendencia a la obesidad, ya que, con la edad, fueron ganando más peso que los animales control (**Figura 34A**), sin afectar a su tamaño. Además, el peso relativo de sus depósitos grasos (grasa subcutánea inguinal, perigonadal y grasa marrón) fue significativamente mayor que el de los animales control (**Figura 34B**).





**Figura 34. Fenotipo basal *in vivo* de los animales PACdh1KO: la depleción de Cdh1 durante la adipogénesis genera ratones con tendencia a la obesidad y tejidos adiposos de mayor tamaño. A.** Se muestran fotografías representativas de animales adultos (machos, 4 meses; izquierda) del modelo PACdh1KO (WT: Cdh1<sup>L/L</sup>, y KO: Cdh1<sup>L/L</sup>; aP2-Cre), y la cuantificación del peso corporal (en machos; derecha) a diferentes edades (n=8, para cada grupo de edad). **B.** Fotografías representativas de distintos tejidos (subcut: grasa blanca subcutánea inguinal; WAT: grasa blanca perigonadal; BAT: grasa marrón) de estos animales (izquierda), y cuantificación de su peso relativo con respecto al peso corporal del animal (n=13; derecha). ns= no significativo; \*p<0,05; \*\*p<0,01

En el caso de la grasa blanca, esa diferencia no pareció deberse a una hipertrofia adipocitaria, pues la cuantificación del tamaño medio de los adipocitos en cortes histológicos indicó que los adipocitos blancos deplecionados de Cdh1 eran incluso algo más pequeños que los adipocitos control (**Figura 35A**).



## **-Resultados-**

**Figura 35.** Los mutantes PACdh1KO presentan hipertrofia de sus adipocitos marrones, pero no de los adipocitos blancos, y niveles incrementados de UCP1 en WAT y BAT. Los mutantes MACdh1KO tienen adipocitos blancos más pequeños. **A.** Imágenes representativas de tinciones histológicas H&E (izquierda) en grasa blanca perigonadal (WAT) y grasa marrón (BAT) de animales adultos del modelo PACdh1KO (WT: Cdh1<sup>+/+</sup>, y KO: Cdh1<sup>-/-</sup>; aP2-Cre), a partir de las cuales se cuantificó el tamaño de los adipocitos ('u.a.': unidades arbitrarias; derecha). **B.** Detección de focos de UCP1 (en rojo) por inmunohistoquímica (marcando los núcleos con DAPI, en azul) en cortes de WAT y BAT de animales adultos WT y deplecionados de Cdh1 del modelo PACdh1KO (escala = 10 micras). **C.** Imágenes representativas de tinciones histológicas H&E (izquierda) en grasa blanca perigonadal (WAT) y grasa marrón (BAT) de animales adultos del modelo MACdh1KO (WT: Cdh1<sup>+/+</sup>, y KO: Cdh1<sup>-/-</sup>; adipoQ-Cre), a partir de las cuales se cuantificó el tamaño de los adipocitos ('u.a.': unidades arbitrarias; derecha). ns= no significativo; \*\*\*\*p<0,0001

En cuanto a los depósitos de grasa marrón (BAT), si bien son mayores en los ratones mutantes, presentan un color más claro (**Figura 34B**), y su análisis histológico evidenció grandes vacuolas lipídicas (similares a las de los adipocitos blancos) en los adipocitos marrones (**Figura 35A**). Consecuentemente, el tamaño medio de estos adipocitos fue significativamente mayor que el de los adipocitos marrones control (**Figura 35A**). Por último, el análisis inmunohistoquímico confirmó los niveles incrementados de UCP1 tanto en WAT como en BAT de los animales portadores del transgén (**Figura 35B**).

### 3.5. Fenotipo basal de los animales MACdh1KO.

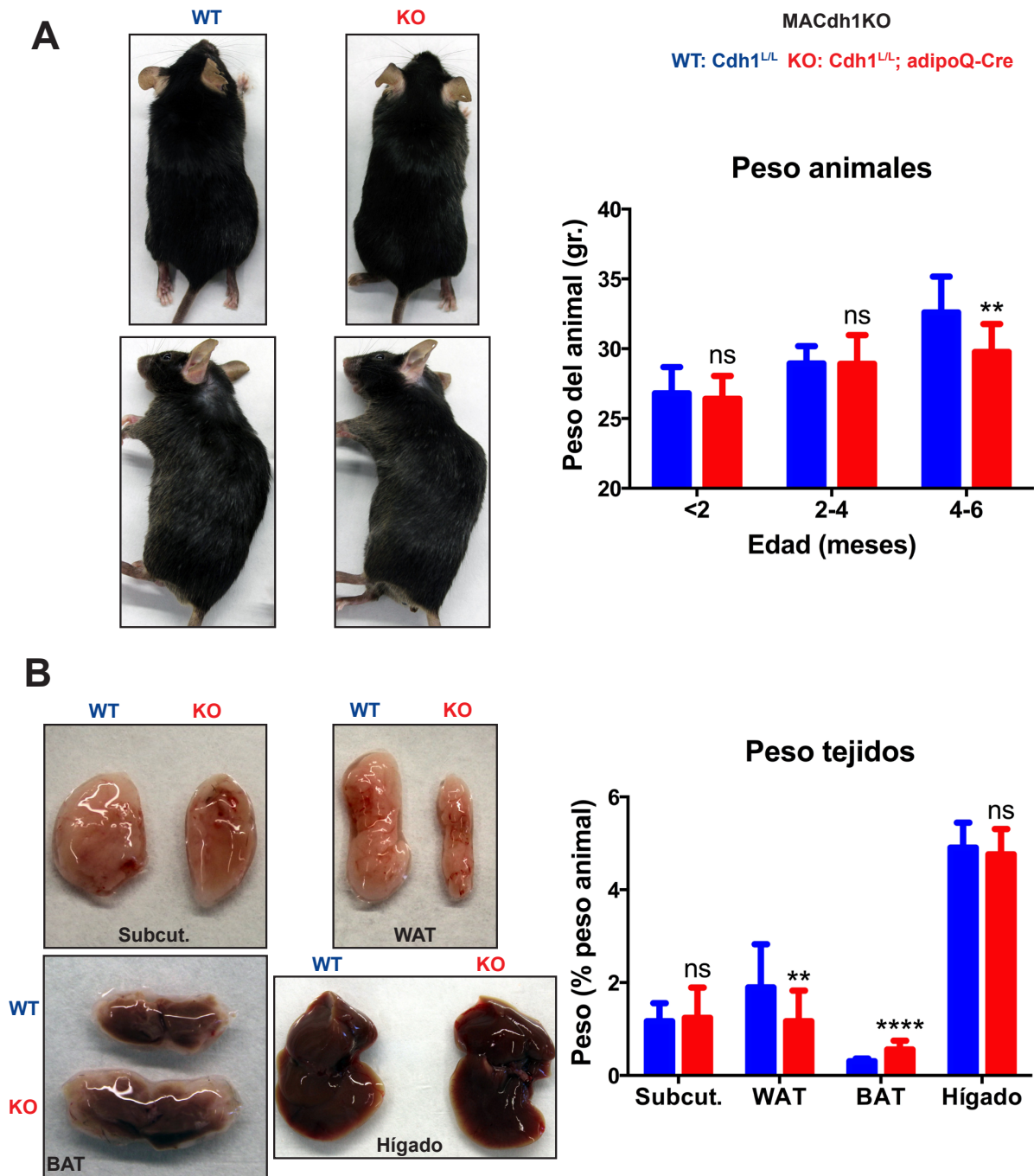
Los ratones MACdh1KO pierden Cdh1 en adipocitos maduros, sin verse afectada ni su adipogénesis ni su expansión clonal. Sus depósitos grasos muestran una hiperactivación de la ruta PI3K/AKT y mayores niveles de UCP1 en sus adipocitos. ¿Y cuál es su fenotipo *in vivo*?

Los animales MACdh1KO mostraron cierta protección frente a la obesidad, ya que presentaron un menor peso corporal (a partir de los 4 meses de edad eran más delgados que los ratones control, **Figura 36A**), y depósitos de grasa blanca perigonadal más pequeños (**Figura 36B**). En cambio, el peso relativo de sus depósitos de grasa marrón fue significativamente mayor que el de los animales control (**Figura 36B**). El análisis histológico evidenció que los adipocitos blancos mutantes eran más pequeños que los WT, y que el BAT de los ratones MACdh1KO presentaba un fenotipo característico de grasa marrón, con adipocitos repletos de múltiples vacuolas de pequeño tamaño (**Figura 35C**).

### 3.6. Fenotipo basal de los animales Cdh1(-/Δ).

Los animales constitutivamente deficientes en Cdh1 presentaron un fenotipo muy complejo, con múltiples desórdenes metabólicos. Debido a ello su fenotipo en tejido graso fue difícilmente interpretable, ya que no se pudo descartar que se debiera a factores extrínsecos al tejido adiposo.

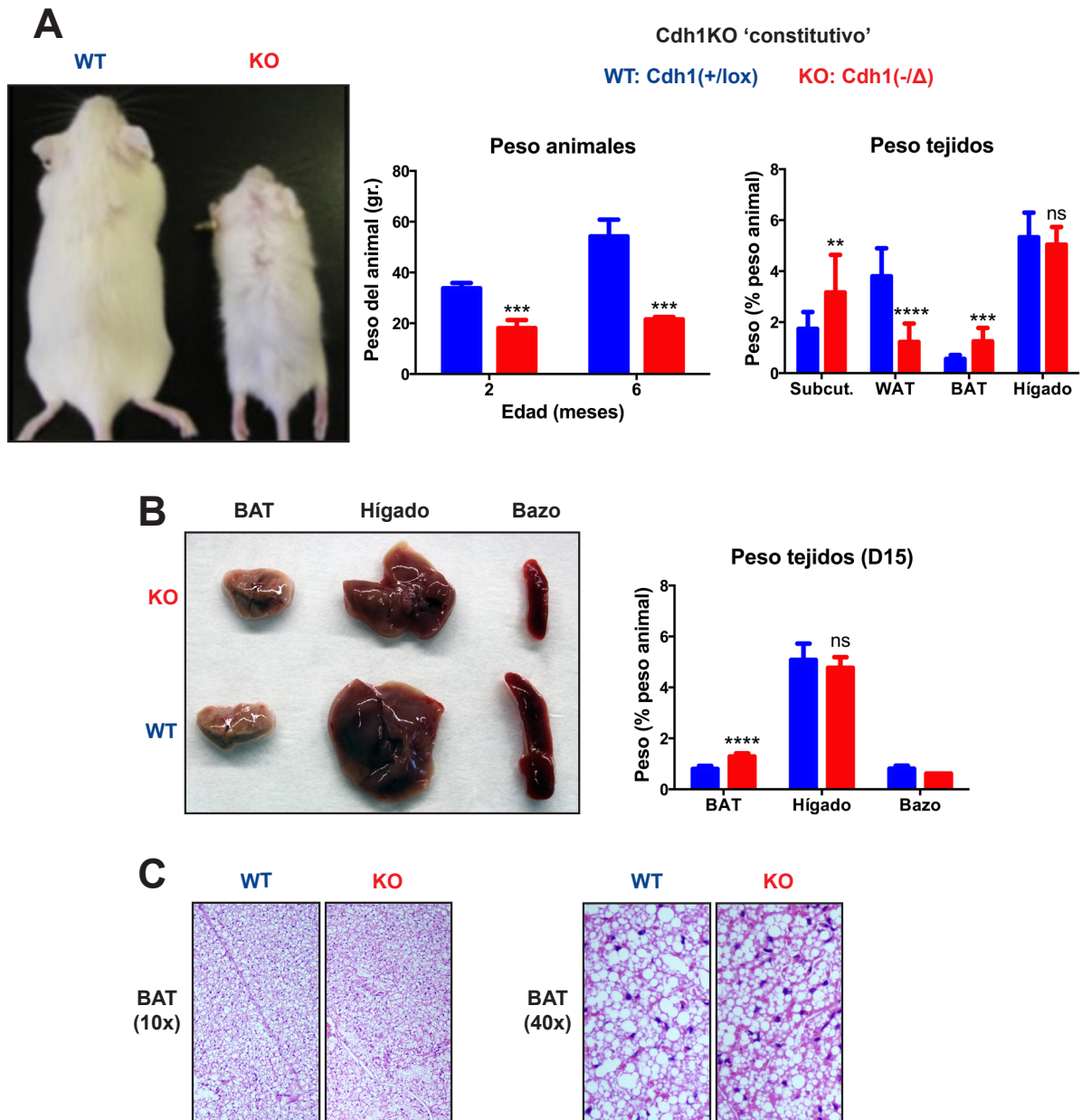
Sin embargo, este modelo permitió confirmar observaciones realizadas en los animales Cdh1KO específicos de tejido adiposo. Los ratones Cdh1(-/Δ) fueron notablemente más pequeños que los animales control y, en cuanto a sus depósitos grasos, combinaron características de los modelos PACdh1KO y MACdh1KO: mucha más grasa subcutánea, pérdida casi total de grasa perigonadal y visceral, y depósitos de grasa marrón más grandes (**Figura 37A**). Esta hiperplasia de la grasa marrón se observaba



**Figura 36.** Fenotipo basal *in vivo* de los animales MACdh1KO: la depleción de Cdh1 en adipocitos maduros genera ratones ligeramente más delgados, con más grasa marrón y menores depósitos de grasa blanca. **A.** Se muestran fotografías representativas de animales adultos (machos, 6 meses; izquierda) del modelo MACdh1KO (WT: Cdh1<sup>L/L</sup>, y KO: Cdh1<sup>L/L</sup>; adipoQ-Cre), y la cuantificación del peso corporal (en machos; derecha) a diferentes edades (n=11, para cada grupo de edad). **B.** Fotografías representativas de distintos tejidos (subcut: grasa blanca subcutánea inguinal; WAT: grasa blanca perigonadal; BAT: grasa marrón) de estos animales (izquierda), y cuantificación de su peso relativo con respecto al peso corporal del animal (n=20; derecha). ns= no significativo; \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*\*p<0,0001

ya desde edades tempranas, y parecía ser específica de dicho tejido, pues el peso relativo de otros tejidos no adiposos no era diferente al de los ratones control (**Figura 37B**). Además, histológicamente la grasa marrón carente de Cdh1 era indistinguible de la grasa marrón control (**Figura 37C**).

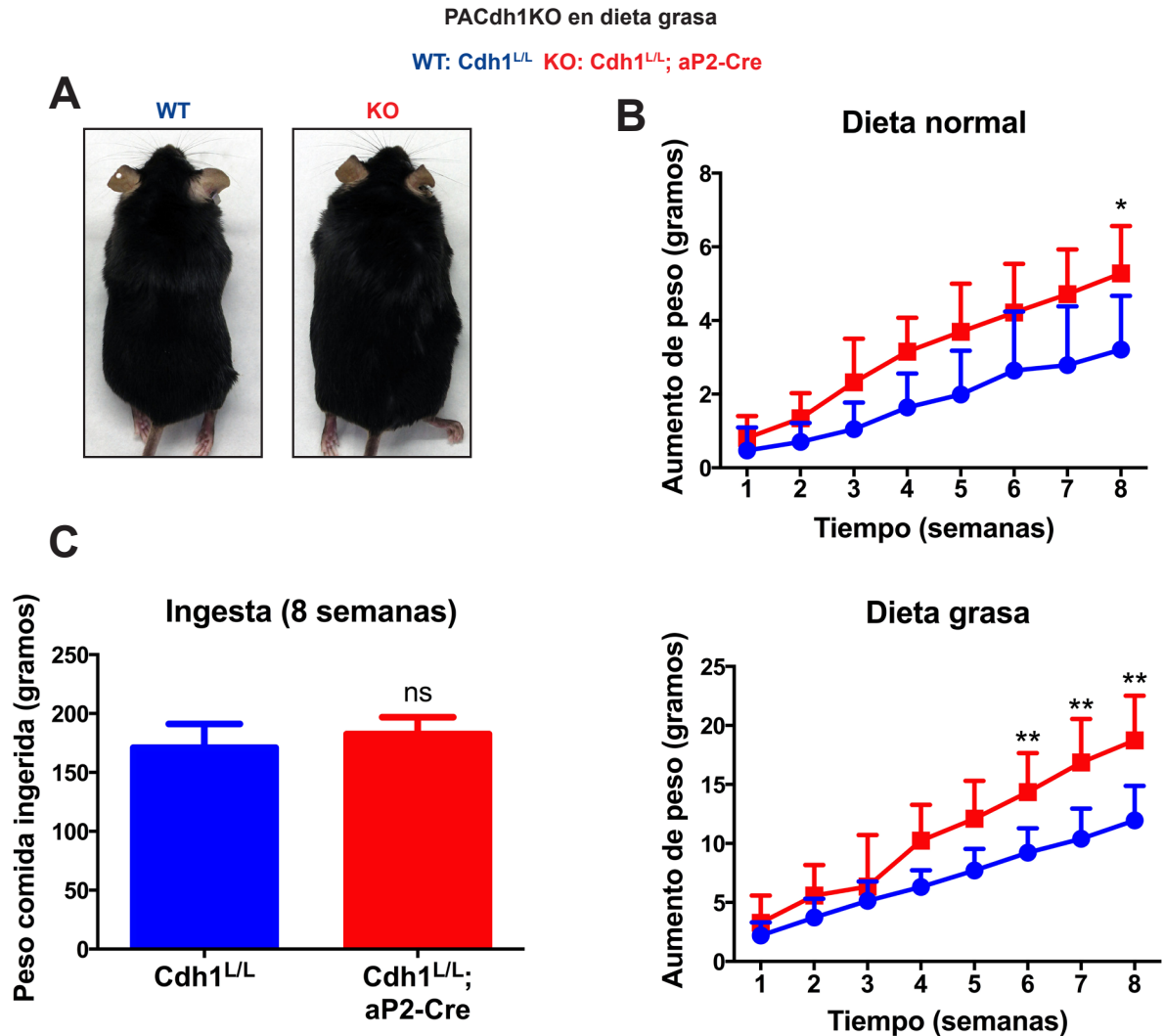
## -Resultados-



**Figura 37.** La depleción constitutiva de Cdh1 genera ratones más pequeños, con mayores depósitos de grasa marrón y grasa blanca subcutánea, pero sin apenas grasa blanca visceral. **A.** Se muestran fotografías representativas de animales Cdh1(+/-lox) y Cdh1(-/-Δ), machos de 1 mes de edad (izquierda), y la cuantificación del peso corporal (en machos) a diferentes edades, y del peso relativo de los tejidos adiposos (subcut: grasa blanca subcutánea inguinal; WAT: grasa blanca perigonadal; BAT: grasa marrón) e hígado con respecto al peso del animal (derecha). **B.** Fotografías representativas de distintos tejidos procedentes de ratones jóvenes (de 15 días de edad) WT y carentes de Cdh1 (izquierda), y cuantificación de su peso relativo con respecto al peso corporal (derecha). **C.** Tinciones histológicas de H&E de grasa marrón de animales jóvenes Cdh1(+/-lox) y Cdh1(-/-Δ). ns= no significativo; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001; \*\*\*\*p<0,0001

3.7. En respuesta a dieta grasa, los animales PACdh1KO presentan obesidad y comorbilidades asociadas.

Bajo dieta normal los animales PACdh1KO presentaron ya una tendencia a obesidad, que se vio incrementada al suministrarles una dieta rica en grasa durante 8 semanas (**Figura 38A**). Tanto en dieta normal como en dieta grasa, los animales PACdh1KO

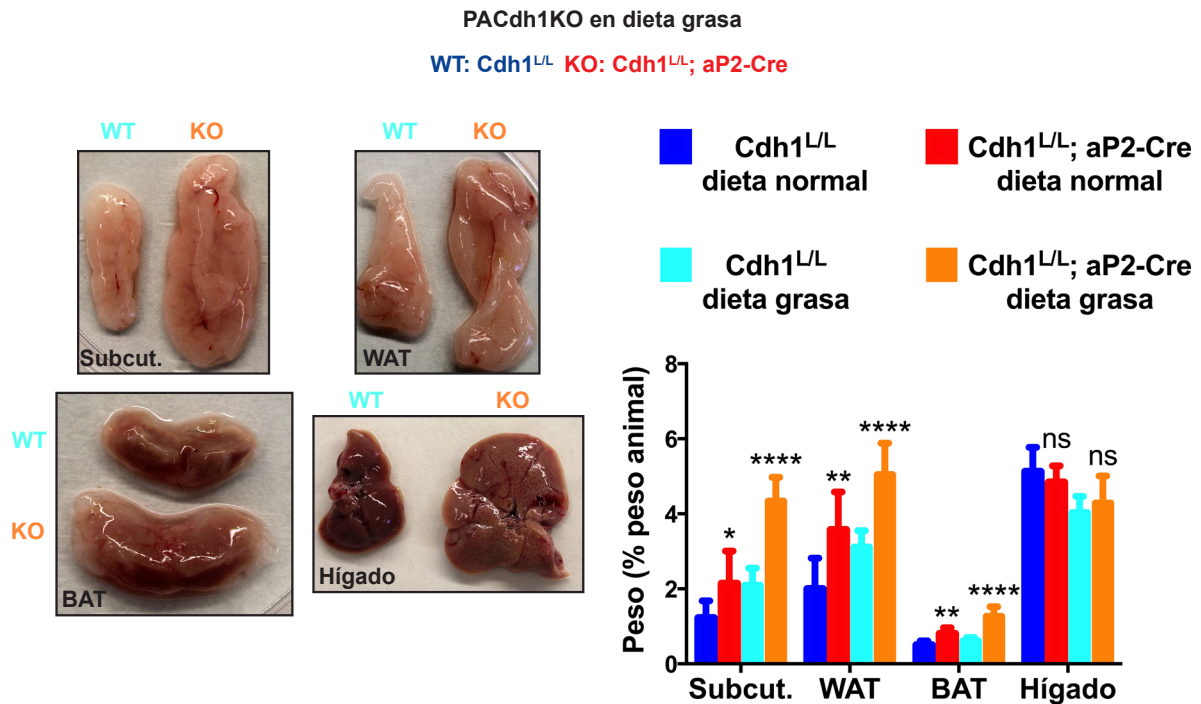


**Figura 38.** En dieta grasa, la depleción de Cdh1 en adipogénesis genera ratones con mayor tendencia a la obesidad. **A.** Se muestran fotografías representativas de animales adultos (machos, 4 meses) del modelo PACdh1KO (WT: Cdh1<sup>L/L</sup>, y KO: Cdh1<sup>L/L</sup>; aP2-Cre), alimentados durante 8 semanas con dieta rica en grasa. **B.** Cuantificación de la ganancia de peso de dichos animales (machos) a lo largo de las semanas, alimentados con dieta normal (n=5; arriba) o con dieta rica en grasa (n=7; abajo). **C.** Cuantificación del peso de comida ingerida (por individuo) de los animales de los genotipos indicados, durante la alimentación con dieta grasa. \*p<0,05; \*\*p<0,01

experimentaron una ganancia de peso mayor que los controles, a lo largo de las distintas semanas, siendo las diferencias más claras en dieta grasa (**Figura 38B**). Como se observa en la **Figura 38**, este incremento de peso no se debió a una mayor ingesta de comida. Además, la alimentación con dieta grasa indujo un aumento significativo de los depósitos grasos en los ratones WT y mutantes, pero agudizó las diferencias, ya observadas en dieta normal, en el peso relativo de los distintos depósitos entre ambos genotipos (**Figura 39**).

Dos de las comorbilidades más importantes asociadas a obesidad son la pérdida de tolerancia a la glucosa y el desarrollo de la esteatosis hepática (hígado graso). Para determinar si estas alteraciones también ocurrían en los animales deplecionados de Cdh1, valoramos el nivel de glucosa en sangre a distintos tiempos tras una inyección intraperitoneal del azúcar. Las curvas de glucosa de los animales WT y PACdh1KO, alimentados con dieta normal (**Figura 40A**) o dieta grasa durante 8 semanas (**Figura**

## -Resultados-



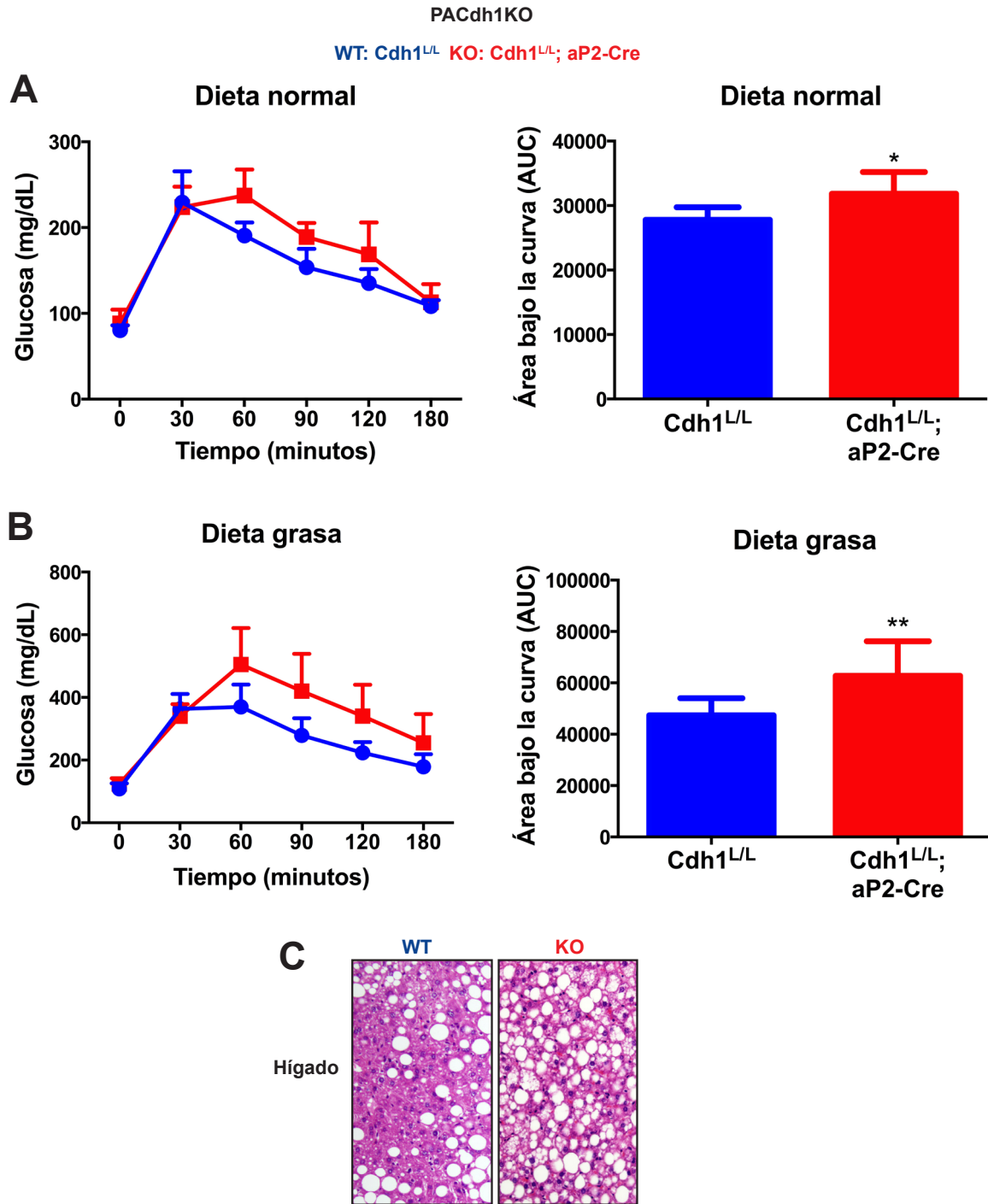
**Figura 39.** En dieta grasa, los ratones con adipogénesis deficiente en Cdh1 muestran mayores depósitos grasos y esteatosis hepática. Se muestran fotografías representativas (izquierda), y la cuantificación del peso relativo (derecha), de los tejidos adiposos (subcut: grasa blanca subcutánea inguinal; WAT: grasa blanca perigonadal; BAT: grasa marrón) y del hígado de los ratones del modelo PACdh1KO (WT: Cdh1<sup>L/L</sup>, y KO: Cdh1<sup>L/L</sup>; aP2-Cre) alimentados durante 8 semanas con dieta rica en grasa (n=7). ns= no significativo; \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*\*p<0,0001

**40B**), revelaron que los ratones mutantes presentaban mayor intolerancia a la glucosa, y que dicha intolerancia se agudizaba con la alimentación rica en grasa. Además, la dieta grasa favoreció la aparición de hepatoesteatosis, mucho más evidente en los ratones mutantes, tanto *de visu* (**Figura 39**) como histológicamente (**Figura 40C**).

**Por tanto, la depleción *in vivo* de Cdh1 en estadios tempranos de la adipogénesis generó ratones con mayor predisposición a la obesidad y comorbilidades asociadas.**

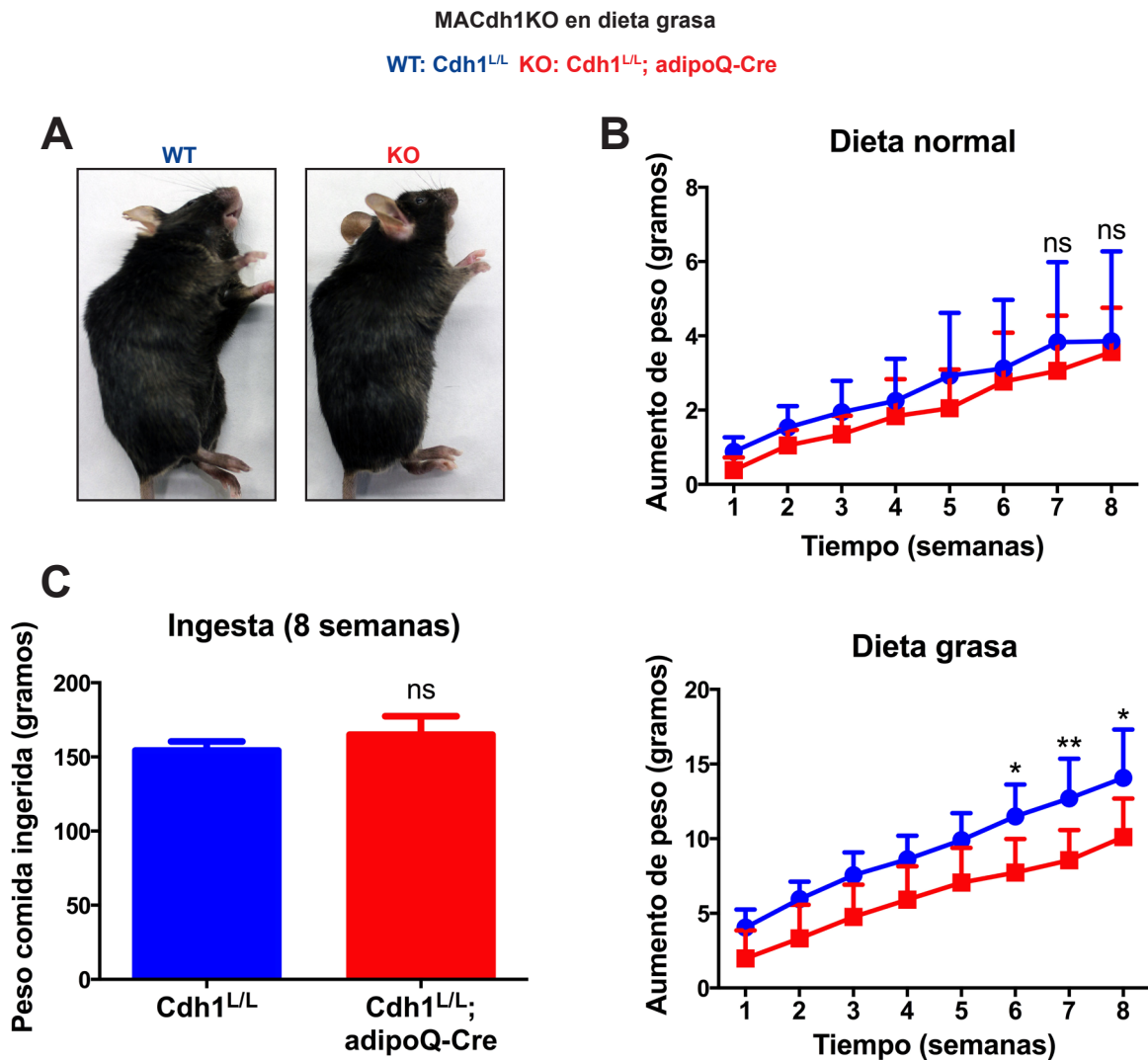
3.8. En respuesta a dieta grasa, los animales MACdh1KO muestran protección frente a obesidad y comorbilidades asociadas.

En condiciones basales, la deficiencia de Cdh1 en adipocitos maduros dio lugar a ratones con una leve protección frente a la obesidad, sobre todo a partir de los 4 meses de edad (**Figura 35A**), y ésta se volvió más obvia bajo dieta grasa (**Figura 41A**). Como muestra la **Figura 41B**, los animales mutantes ya presentaron una tendencia a engordar menos en dieta normal, haciéndose más evidente y significativa en la alimentación durante 8 semanas con dieta grasa. Tampoco en este modelo las diferencias de peso se debieron a variaciones en la ingesta (**Figura 41C**). Además, en dieta normal los ratones mutantes MACdh1KO ya presentaron depósitos de grasa blanca de menor tamaño, y depósitos de grasa marrón más grandes (**Figura 35B**). En dieta grasa se observó la misma tendencia en ambos tejidos, pero con diferencias más acusadas (**Figura 42**).



**Figura 40.** Los animales cuya adipogénesis está deplecionada de Cdh1 presentan mayor resistencia a la glucosa, y hepatoesteatosis inducida por dieta grasa. Perfiles de tolerancia a la glucosa en animales adultos (machos, 4 meses) del modelo PACdh1KO (WT: Cdh1<sup>L/L</sup>, y KO: Cdh1<sup>L/L</sup>; aP2-Cre), alimentados con dieta normal (A, n=5), o con dieta grasa durante 8 semanas (B, n=8-10) (izquierda). Con estos perfiles se calculó el área bajo la curva (AUC, derecha) para facilitar la cuantificación. C. Imágenes representativas de tinciones H&E de hígados procedentes de animales WT y PACdh1KO alimentados con dieta grasa durante 8 semanas. \*p<0,05; \*\*p<0,01

## -Resultados-

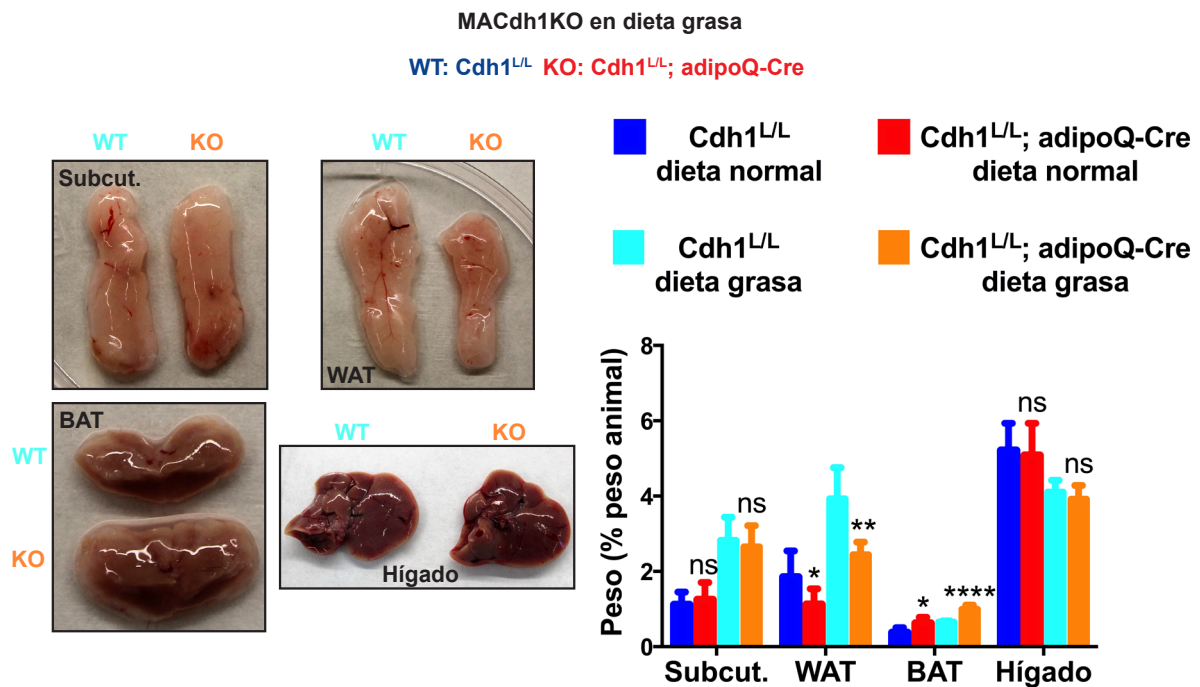


**Figura 41.** En dieta grasa, la depleción de Cdh1 en adipocitos maduros genera ratones protegidos frente a la obesidad. **A.** Se muestran fotografías representativas de animales adultos (machos, 4 meses) del modelo MACdh1KO (WT: Cdh1<sup>L/L</sup>, y KO: Cdh1<sup>L/L</sup>; adipoQ-Cre), alimentados durante 8 semanas con dieta rica en grasa. **B.** Cuantificación de la ganancia de peso de dichos animales (machos) a lo largo de las semanas, alimentados con dieta normal (n=5; arriba) o con dieta rica en grasa (n=6; abajo). **C.** Cuantificación del peso de comida ingerida (por individuo) de los animales de los genotipos indicados, durante la alimentación con dieta grasa. ns= no significativo;

También estudiamos las comorbilidades asociadas a la obesidad. Los ratones MACdh1KO presentaron mejores perfiles de tolerancia a la glucosa que los animales control, si bien las diferencias no fueron significativas cuando estaban alimentados con dieta normal (**Figura 43A**). En cambio, como se evidencia en la **Figura 43B** sí lo fueron en alimentación grasa. Además, en este modelo comprobamos, tanto *de visu* (**Figura 42**) como histológicamente (**Figura 43C**), que los ratones mutantes estaban protegidos frente a la hepatoestasis inducida por dieta grasa.

**En conjunto, estos resultados evidencian que la depleción de Cdh1 en adipocitos maduros protege frente a la obesidad y frente a sus comorbilidades asociadas.**





**Figura 42.** En dieta grasa, los ratones con adipocitos deficientes en Cdh1 muestran menores depósitos de WAT y más grasa marrón. Se muestran fotografías representativas (izquierda), y la cuantificación del peso relativo (derecha), de los tejidos adiposos (subcut: grasa blanca subcutánea inguinal; WAT: grasa blanca perigonadal; BAT: grasa marrón) y del hígado de los ratones del modelo MACdh1KO (WT: Cdh1<sup>L/L</sup>, y KO: Cdh1<sup>L/L</sup>; adipoQ-Cre) alimentados durante 8 semanas con dieta rica en grasa (n=6). ns= no significativo; \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*\*p<0,0001

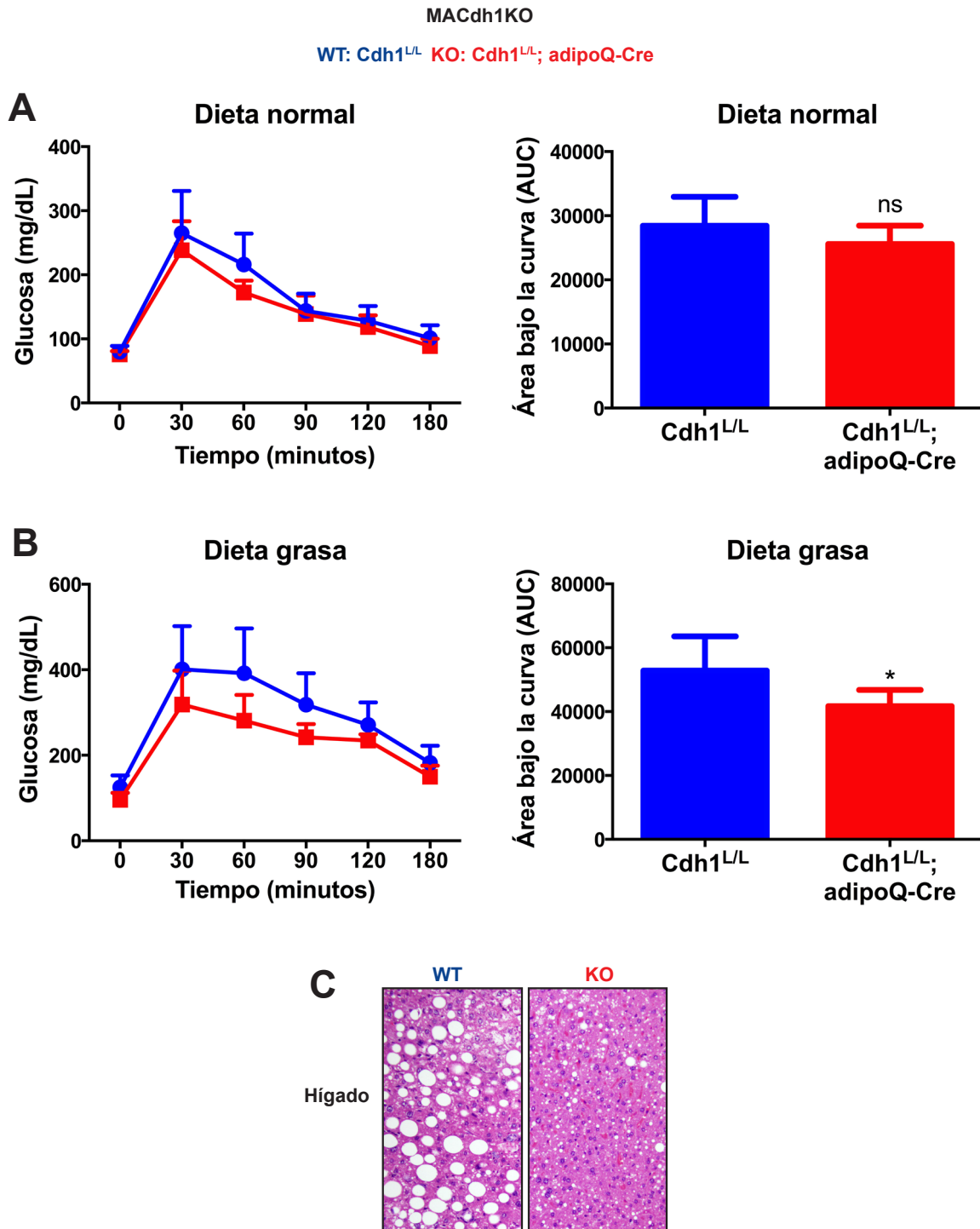
### 3.9. Los ratones PACdh1KO presentan mayor tolerancia al frío.

La pérdida de Cdh1 induce un incremento en los niveles proteicos de UCP1 en el tejido adiposo. La consecuencia metabólica directa de este incremento, si ese exceso de UCP1 es funcional (como parece *in vitro*), sería una mayor capacidad termogénica y tolerancia al frío.

Para evaluar esta posibilidad, mantuvimos a los ratones en frío (4-6°C) durante 10 días. Estudiamos su capacidad termogénica durante las primeras horas del tratamiento, realizando dos tipos de mediciones: temperatura media de la superficie de la piel en la zona interescapular (donde se encuentra el BAT) mediante la obtención de termografías, y temperatura rectal con ayuda de un termómetro. Los resultados, representados en la **Figura 44A**, avalaron que los ratones PACdh1KO muestran una mayor tolerancia al frío que los animales control.

Tras los 10 días de tratamiento, se evaluó el efecto del frío sobre los distintos depósitos grasos (**Figura 44B**). Como era esperable, el frío condujo a un aumento del BAT, y a una disminución de los depósitos grasos blancos (debido al incremento del gasto energético asociado a la termogénesis). Con la exposición al frío se revirtió el fenotipo de obesidad que presentaban los ratones PACdh1KO a temperatura ambiente, ya que perdían completamente el exceso de grasa blanca (subcutánea y perigonadal).

## -Resultados-

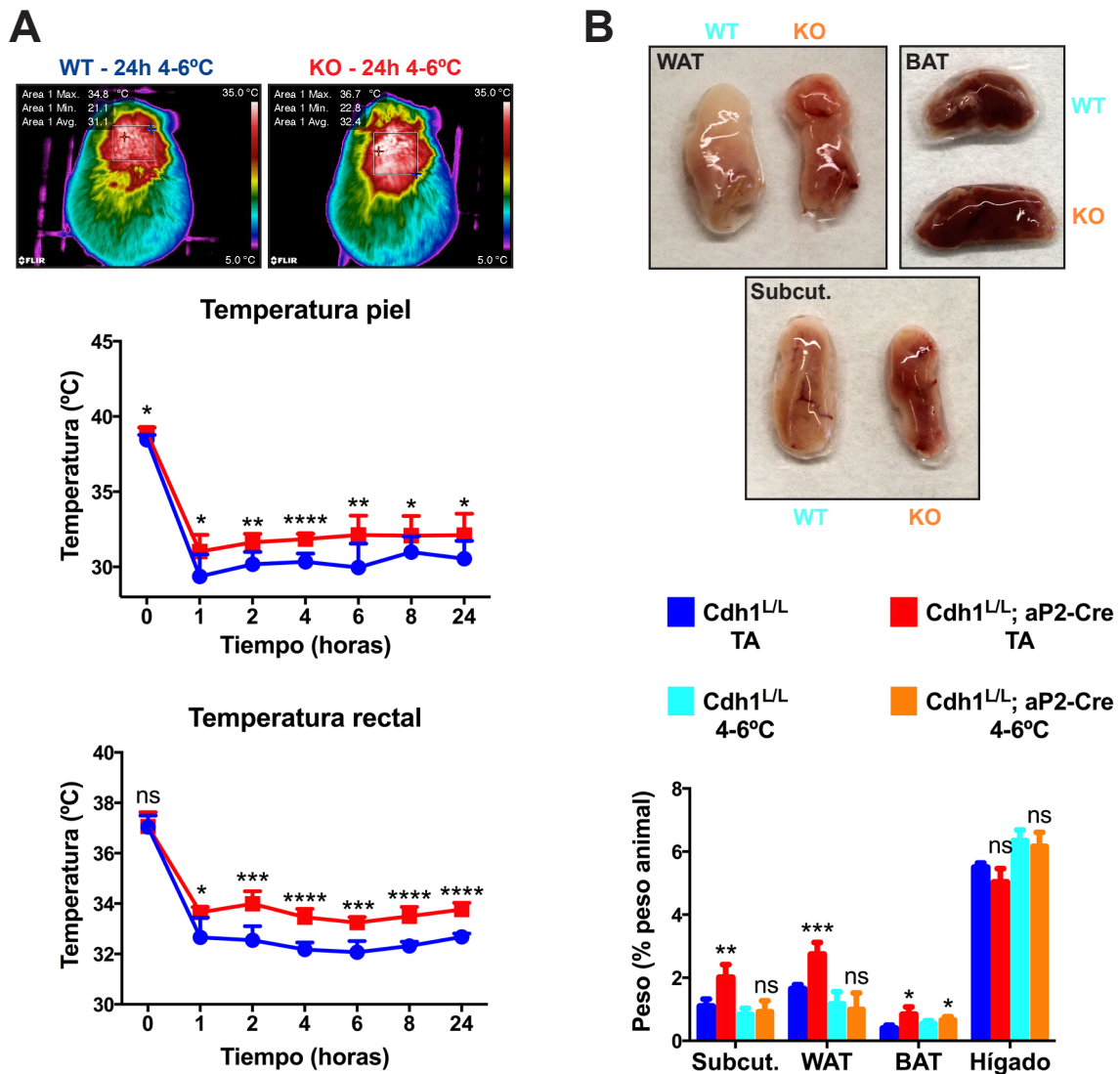


**Figura 43.** Los animales con depleción de Cdh1 en adipocitos maduros son glucémicamente más tolerantes y resistentes a la hepatoesteatosis. Perfiles de tolerancia a la glucosa en animales adultos (machos, 4 meses) del modelo MACdh1KO (WT: Cdh1<sup>L/L</sup>, y KO: Cdh1<sup>L/L</sup>; adipoQ-Cre), alimentados con dieta normal (**A**, n=8), o con dieta grasa durante 8 semanas (**B**, n=7-10) (izquierda). Con estos perfiles se calculó el área bajo la curva (AUC, derecha) para facilitar la cuantificación. **C.** Imágenes representativas de tinciones H&E de hígados procedentes de animales WT y MACdh1KO alimentados con dieta grasa durante 8 semanas. ns= no significativo; \*p<0,05

**PACdh1KO tratamiento en frío**

WT: Cdh1<sup>L/L</sup>

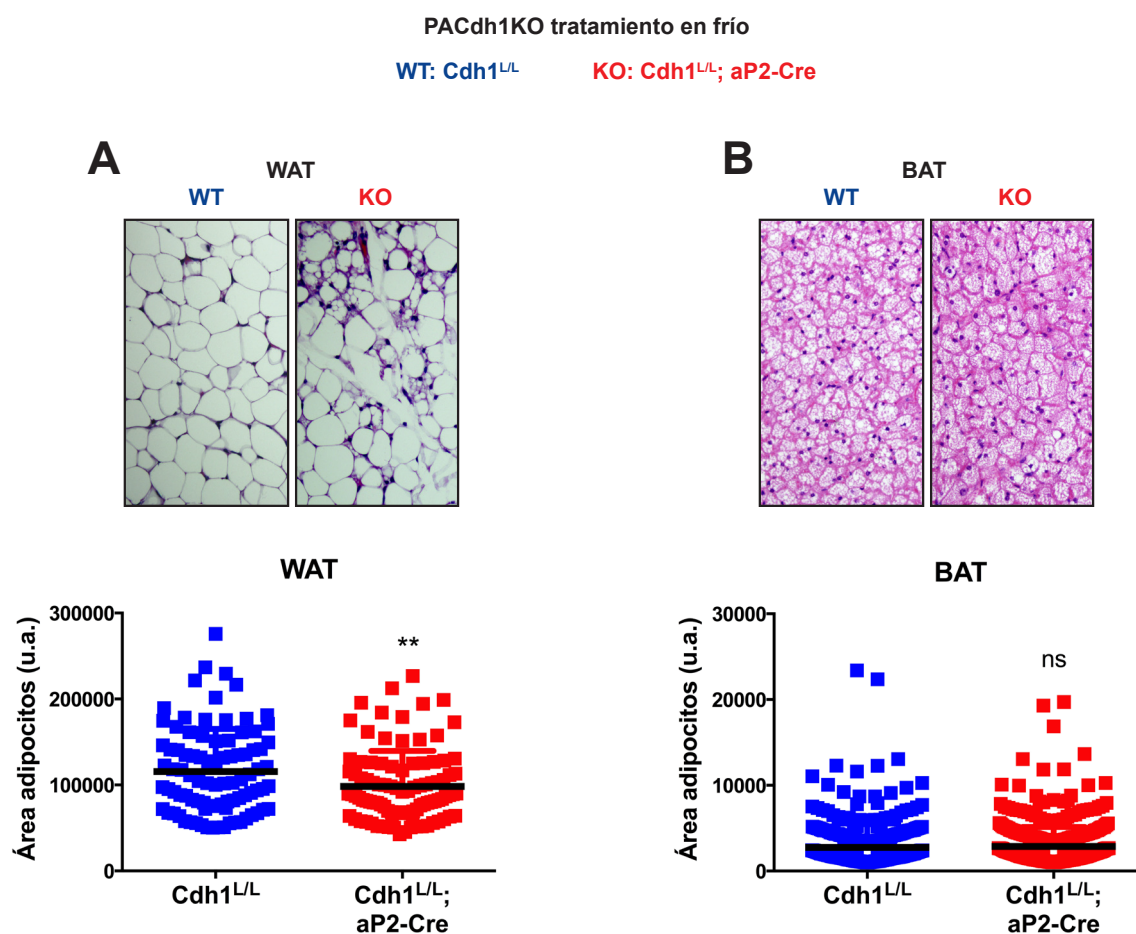
KO: Cdh1<sup>L/L</sup>; aP2-Cre



**Figura 44. Mayor tolerancia al frío de los mutantes PACdh1KO, asociada a una pérdida del fenotipo obeso.** Animales adultos (machos, 2-3 meses) del modelo PACdh1KO (WT: Cdh1<sup>L/L</sup>, y KO: Cdh1<sup>L/L</sup>; aP2-Cre), se sometieron durante 10 días a un tratamiento en frío (4-6°C). **A.** A distintos tiempos, se midió la temperatura media de la superficie de la piel en la zona interescapular (previamente depilada) mediante la obtención de termografías (n=8, arriba), y la temperatura corporal mediante un termómetro rectal (n=6, abajo). **B.** Al final del tratamiento, se fotografiaron los tejidos (arriba) y se cuantificó (abajo) el peso relativo de los mismos (subcut: grasa blanca subcutánea inguinal; WAT: grasa blanca perigonadal; BAT: grasa marrón; n=8) en ratones WT y PACdh1KO mantenidos a temperatura ambiente (TA) o en frío (4-6°C). ns= no significativo; \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001; \*\*\*\*p<0,0001

Pero estos animales mutantes seguían presentando depósitos de grasa marrón de mayor tamaño que los ratones control que, además, *de visu*, parecía haber perdido el fenotipo 'blanco'. El análisis histológico mostró que, tras el frío, los adipocitos blancos de WAT eran significativamente más pequeños en los animales mutantes que en los controles, con mayor presencia de células multiloculares y/o con vacuolas pequeñas (**Figura 45A**). Además, tras el frío los adipocitos marrones mutantes recuperan un tamaño normal y pierden el fenotipo 'blanco' que presentaban a temperatura ambiente

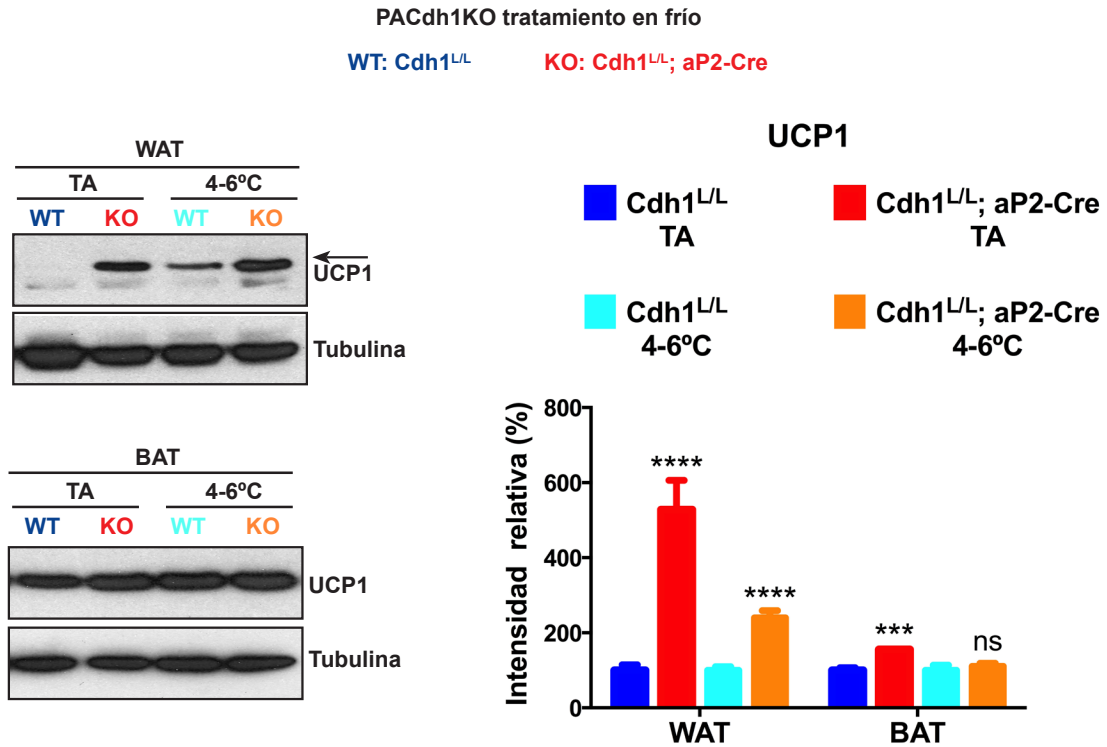
## -Resultados-



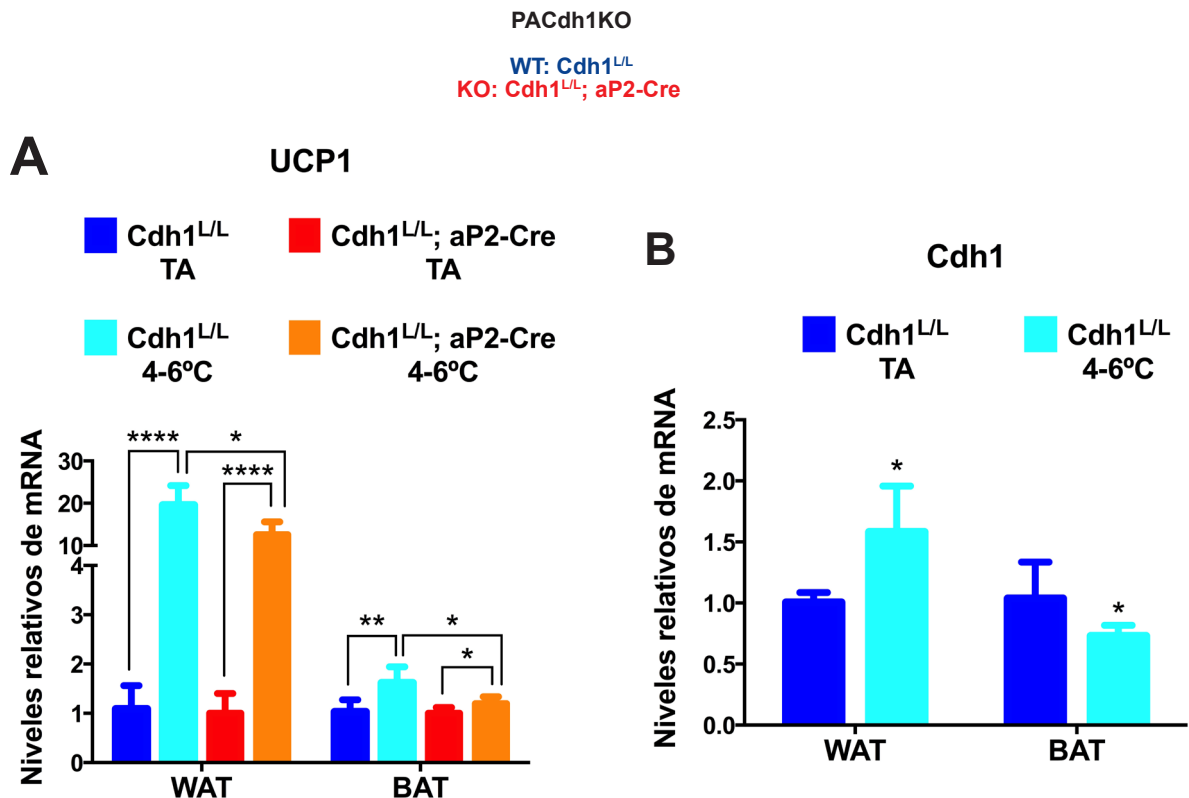
**Figura 45.** El tratamiento en frío revierte el fenotipo de obesidad de los mutantes PACdh1KO. Se muestran tinciones de H&E representativas de grasa blanca perigonadal (WAT, **A**) o grasa marrón (BAT, **B**) de animales del modelo PACdh1KO (WT: Cdh1<sup>L/L</sup>, y KO: Cdh1<sup>L/L</sup>; aP2-Cre) tratados durante 10 días con frío (4-6°C, arriba), a partir de las cuales se cuantificó el tamaño de los adipocitos ('u.a.': unidades arbitrarias; abajo), . ns= no significativo; \*\*p<0,01

(**Figura 45B**). Por último, el estudio bioquímico en WAT y BAT, tras el tratamiento en frío durante 10 días, mostró que los ratones mutantes perdían el exceso de UCP1 en BAT, pero seguían manteniendo niveles más altos de UCP1 en grasa blanca (**Figura 46**). La exposición al frío indujo la transcripción de UCP1 tanto en BAT como en WAT, pero a un nivel mucho menor en los animales mutantes (**Figura 47A**).

La exposición al frío estimula, principalmente, la ruta b-adrenérgica y la ruta tiroidea (ver 'Introducción'). Por ese motivo, para intentar corroborar estos resultados, sometimos a los animales a un tratamiento con CL316243, un agonista b-adrenérgico que inyectamos intraperitonealmente durante 7 días. El efecto de este tratamiento resultó muy similar al observado en la exposición al frío en lo referente a los cambios en el tamaño de los distintos depósitos grasos (**Figura 49A**).



**Figura 46. Mayores niveles proteicos de UCP1 en grasa perigonadal de los mutantes PACdh1KO tras la exposición al frío.** Inmunodetección, por *Western blot*, de UCP1 en lisados de tejidos completos (WAT: grasa blanca perigonadal; BAT: grasa marrón) de animales del modelo PACdh1KO (WT: Cdh1<sup>L/L</sup>, y KO: Cdh1<sup>L/L</sup>; aP2-Cre) mantenidos a temperatura ambiente (TA) o expuestos al frío (4-6°C) durante 10 días (izquierda). A la derecha, se muestra la cuantificación de la intensidad de las bandas, normalizando, en cada condición, frente al control de carga y frente a los tejidos de los animales control. ns= no significativo; \*\*\*p<0,001; \*\*\*\*p<0,0001

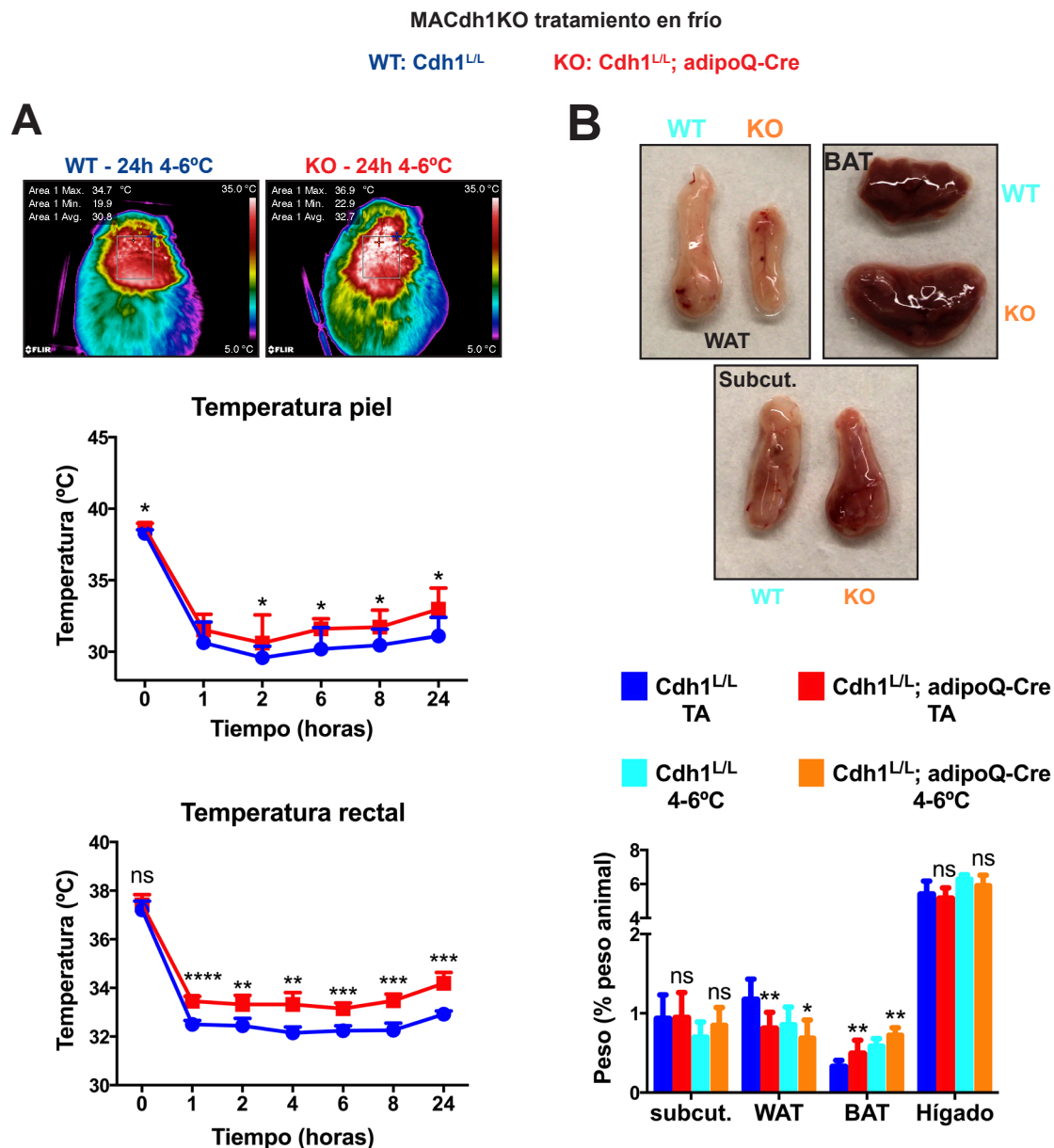


## -Resultados-

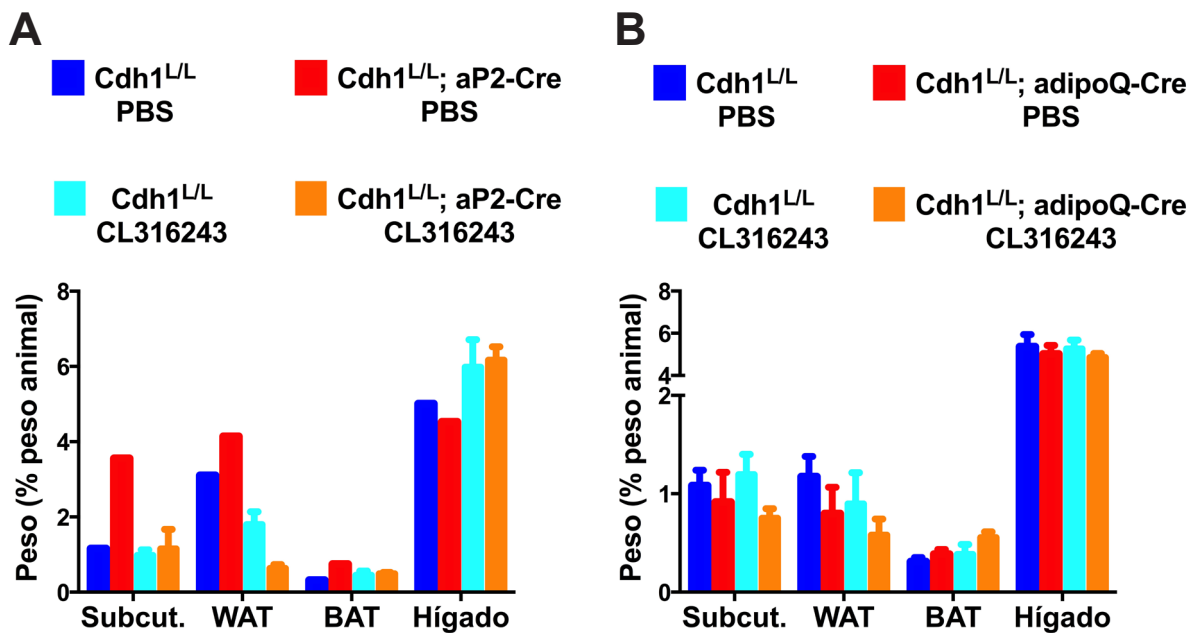
**Figura 47.** La depleción de *Cdh1* en preadipocitos (PACdh1KO) genera una menor estimulación transcripcional de UCP1 tras la exposición al frío en WAT y BAT, donde *Cdh1* también ve modulada su expresión. Cuantificación de los niveles relativos de mRNA de UCP1 (A) y *Cdh1* (B), por q-RT-PCR, en grasa blanca perigonadal (WAT) y grasa marrón (BAT) de animales de los genotipos indicados, mantenidos a temperatura ambiente (TA) o expuestos al frío (4-6°C) durante 10 días. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$

### 3.10. Los ratones MACdh1KO son más termogénicos.

Realizamos el mismo tratamiento en frío en los ratones carentes de *Cdh1* en adipocitos maduros (modelo MACdh1KO). Los ratones mutantes termorregularon mejor que los controles (Figura 48A), y continuaron manteniendo el fenotipo de protección a la obesidad que presentaban a temperatura ambiente, con depósitos de WAT más pequeños y mayor abundancia de grasa marrón (Figura 48B). El tratamiento con el agonista b-adrenérgico CL316243 condujo a resultados similares en cuanto a los depósitos grasos (Figura 49B), lo que confirmó los resultados observados en la exposición al frío.



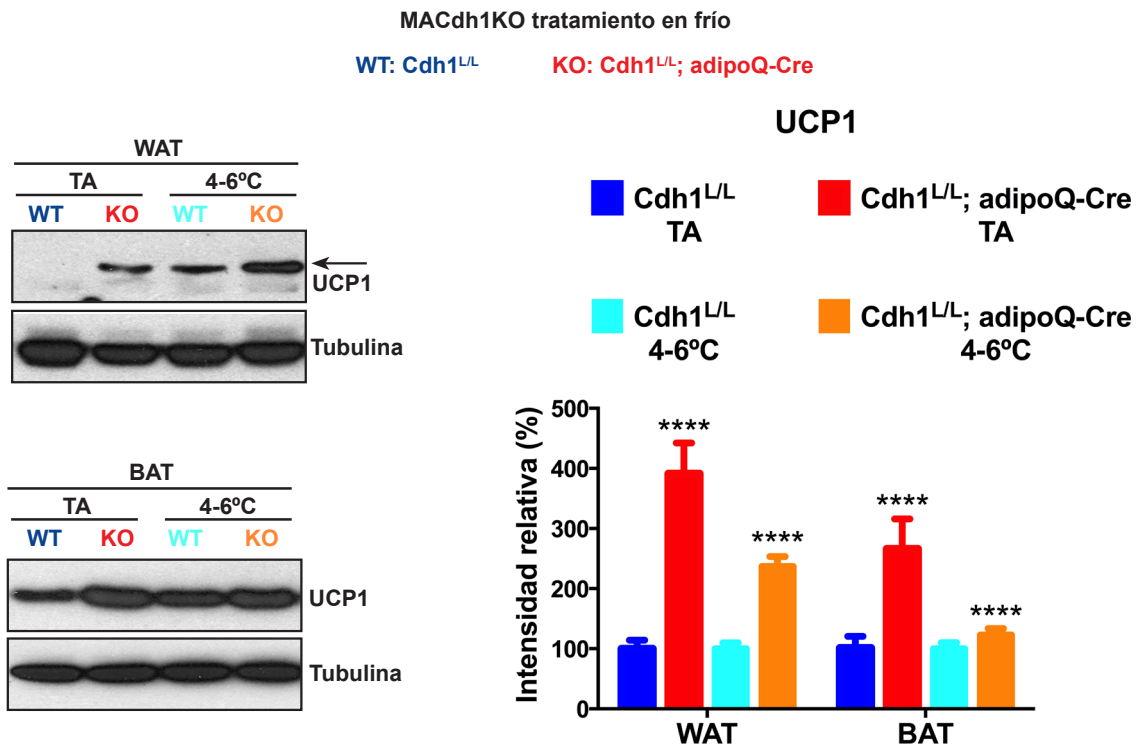
**Figura 48. Mayor termogénesis de los ratones MACdh1KO.** Animales adultos (machos, 2-3 meses) del modelo MACdh1KO (WT: Cdh1<sup>L/L</sup>, y KO: Cdh1<sup>L/L</sup>; adipoQ-Cre), se sometieron durante 10 días a un tratamiento en frío (4-6°C). **A.** A distintos tiempos, se midió la temperatura media de la superficie de la piel en la zona interescapular (previamente depilada) mediante la obtención de termografías (n=9, arriba), y la temperatura corporal mediante un termómetro rectal (n=5, abajo). **B.** Al final del tratamiento, se fotografiaron los tejidos (arriba) y se cuantificó (abajo) el peso relativo de los mismos (subcut: grasa blanca subcutánea inguinal; WAT: grasa blanca perigonadal; BAT: grasa marrón) en ratones WT y MACdh1KO mantenidos a temperatura ambiente (TA) o en frío (4-6°C). ns= no significativo; \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001; \*\*\*\*p<0,0001



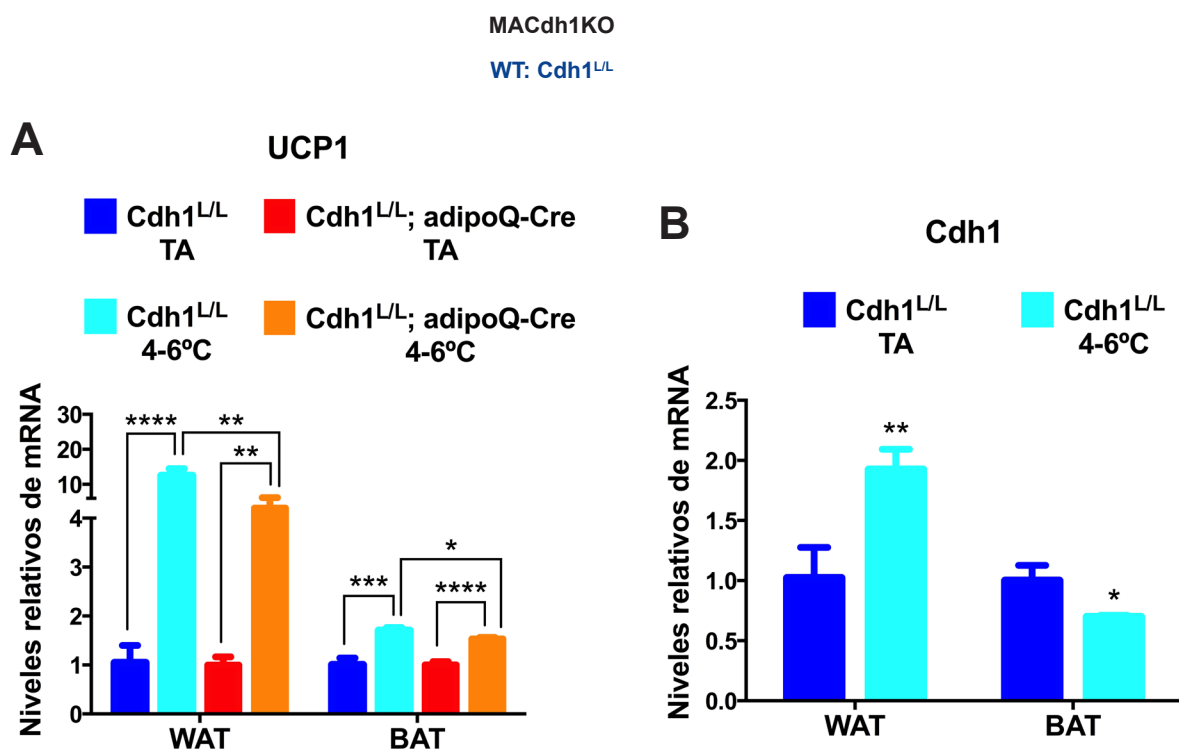
**Figura 49. In vivo, la estimulación β-adrenérgica revierte el fenotipo obeso en los mutantes PACdh1KO, y consolida la protección a obesidad de los mutantes MACdh1KO.** Animales adultos (machos, 2-3 meses) de los modelos PACdh1KO (**A**, WT: Cdh1<sup>L/L</sup>, y KO: Cdh1<sup>L/L</sup>; aP2-Cre) y MACdh1KO (**B**, WT: Cdh1<sup>L/L</sup>, y KO: Cdh1<sup>L/L</sup>; adipoQ-Cre), se sometieron durante 7 días a un tratamiento de estimulación β-adrenérgica mediante la inyección intraperitoneal diaria del agonista β-adrenérgico CL316243 (10 mg/kg animal), utilizando como control vehicular PBS. Al final del tratamiento, se recogieron los distintos tejidos (subcut: grasa blanca subcutánea inguinal; WAT: grasa blanca perigonadal; BAT: grasa marrón) y se cuantificó su peso relativo con respecto al peso del animal.

Bioquímicamente, como se indica en la **Figura 50**, tras el tratamiento en frío los animales MACdh1KO mantuvieron niveles incrementados de UCP1 en WAT y BAT, aunque con menores diferencias que las observadas a temperatura ambiente. A nivel transcripcional, tras el frío los animales WT presentaron mayores niveles de mRNA de UCP1 en BAT y WAT, con cambios más notables en este último. En los ratones mutantes MACdh1KO también se observaron estos incrementos, pero a menor nivel que en los ratones WT (**Figura 51A**).

## -Resultados-

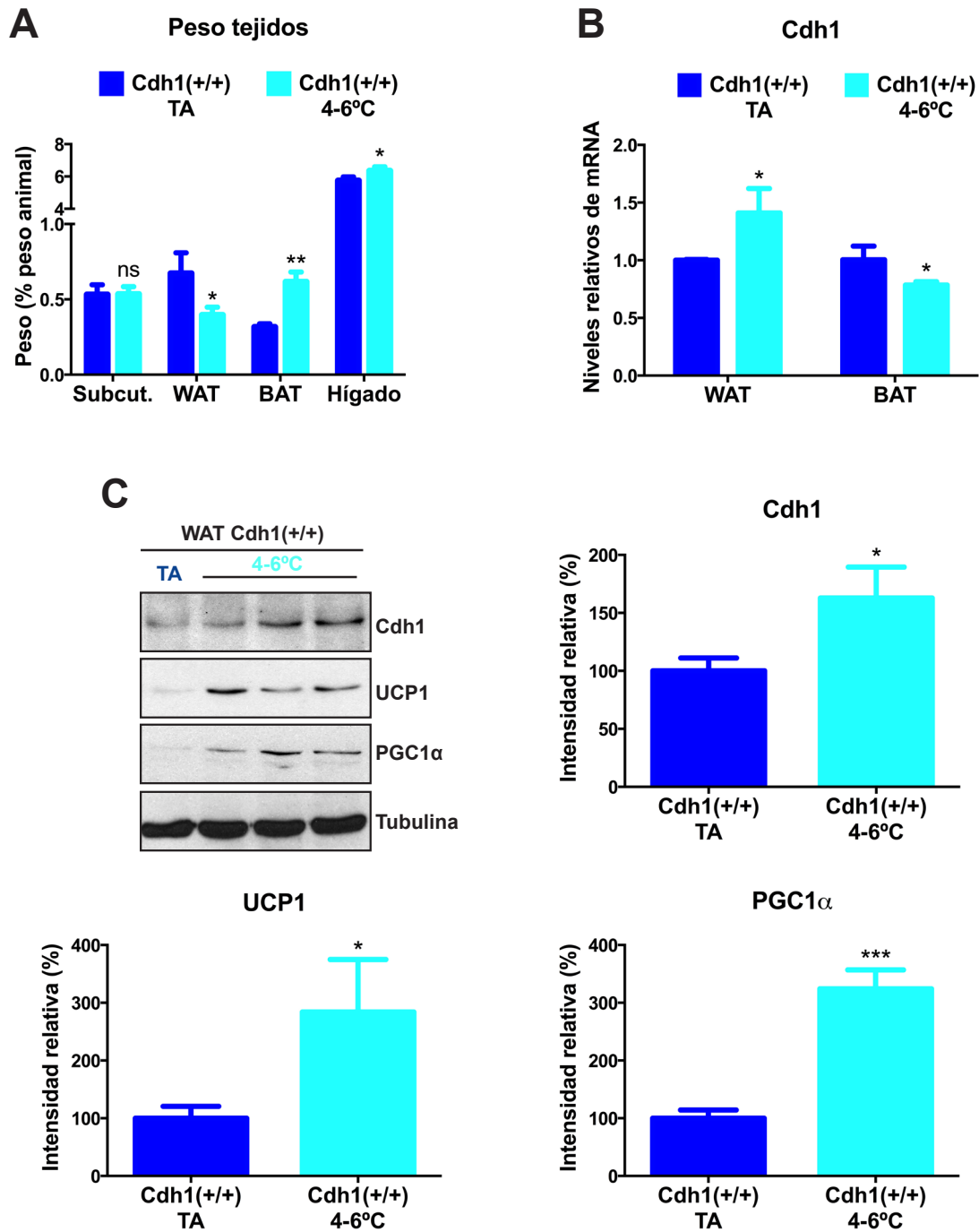


**Figura 50.** Mayores niveles proteicos de UCP1 en WAT y BAT de los ratones MACdh1KO tras la estimulación por frío. Inmunodetección, por *Western blot*, de UCP1 en lisados de tejidos completos (WAT: grasa blanca perigonadal; BAT: grasa marrón) de animales del modelo MACdh1KO (WT: Cdh1<sup>L/L</sup>, y KO: Cdh1<sup>L/L</sup>; adipoQ-Cre) mantenidos a temperatura ambiente (TA) o expuestos al frío (4-6°C) durante 10 días (izquierda). A la derecha, se muestra la cuantificación de la intensidad de las bandas, normalizando, en cada condición, frente al control de carga y frente a los tejidos de los animales control. \*\*\*\*p<0,0001





**Figura 51.** La depleción de *Cdh1* en adipocitos maduros (MAC*dh1*KO) conduce a una menor estimulación transcripcional de UCP1 tras la exposición al frío en WAT y BAT, donde *Cdh1* también ve modulada su expresión. Cuantificación de los niveles relativos de mRNA de UCP1 (A) y *Cdh1* (B), por q-RT-PCR, en grasa blanca perigonadal (WAT) y grasa marrón (BAT) de animales de los genotipos indicados, mantenidos a temperatura ambiente (TA) o expuestos al frío (4-6°C) durante 10 días. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$



**Figura 52.** Modulación de *Cdh1*, *in vivo*, tras la exposición al frío: aumento en grasa blanca (WAT) y disminución en grasa marrón (BAT). En WAT, los niveles de UCP1 y *Cdh1* están inversamente relacionados. **A.** Cuantificación del efecto del frío sobre los depósitos grasos (subcut: grasa blanca subcutánea inguinal; WAT: grasa blanca perigonadal; BAT: grasa marrón) en ratones *Cdh1*(+/+) mantenidos a temperatura ambiente (TA) o en frío (4-6°C) durante 10 días. **B.** En estos mismos animales, se analizó la modulación transcripcional de *Cdh1*, por q-RT-PCR, en WAT y BAT (n=3). **C.** Inmunodetección, por *Western blot*, de las proteínas indicadas en lisados de WAT y BAT procedentes de animales *Cdh1*(+/+) mantenidos a temperatura ambiente o en frío durante 10 días (arriba izquierda). Se muestra la cuantificación de las intensidad de las bandas, normalizando frente al control de carga y frente a los valores de los animales mantenidos a temperatura ambiente. ns= no significativo; \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$

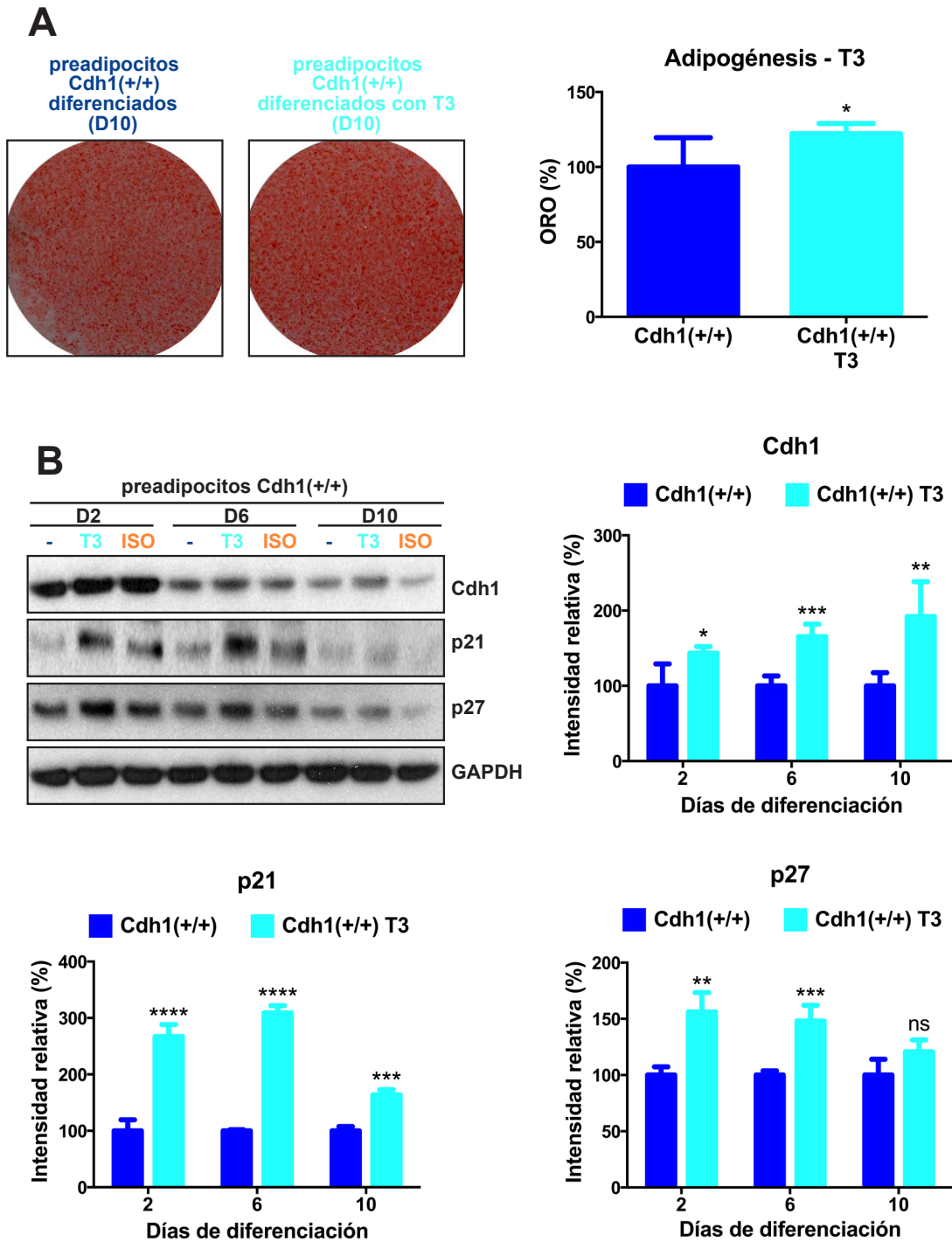
#### 4. Regulación de Cdh1 tras la exposición al frío.

Durante el desarrollo de este trabajo se ha demostrado el papel de Cdh1 inhibiendo la generación de nuevos adipocitos y la estabilización en éstos de UCP1. Teniendo en cuenta la función termogénica de UCP1, estos resultados sugieren que Cdh1, al menos mediante su actividad en tejido adiposo, podría participar en la homeostasis de la temperatura corporal. De ser así, cabría esperar una regulación de la actividad y/o expresión de Cdh1 en respuesta al frío.

Para testar esta idea, analizamos el efecto del frío sobre la transcripción de Cdh1 en tejido adiposo. Los datos revelaron que el frío promueve la expresión de Cdh1 en grasa perigonadal, y la inhibe en grasa marrón (**Figura 47B** y **Figura 51B**). Estos resultados se confirmaron en animales control del genotipo Cdh1(+/+), expuestos o no al frío durante 10 días. El efecto del frío sobre los tejidos fue el mismo que el observado en los experimentos previos: disminución de los depósitos de WAT e incremento de la grasa marrón (**Figura 52A**). La variación transcripcional de Cdh1 tras la exposición al frío también siguió el mismo patrón: incremento en WAT, pero disminución en BAT (**Figura 52B**).

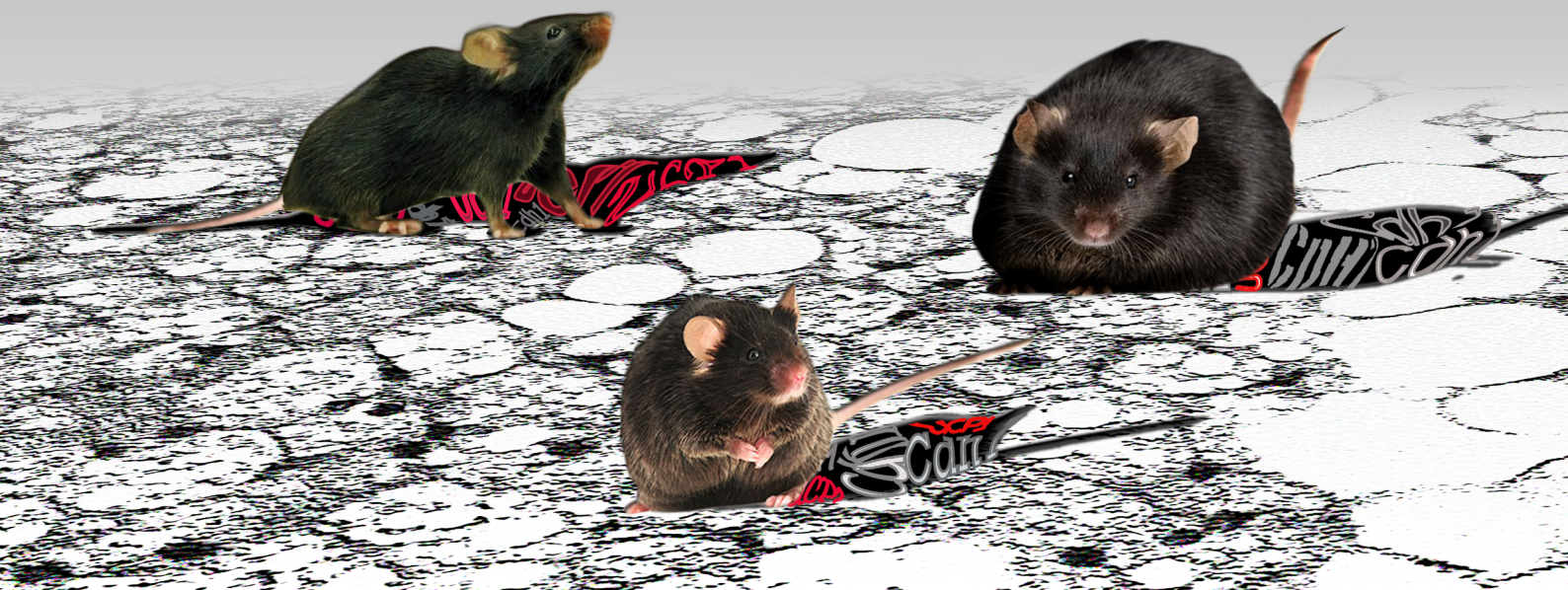
Las mayores diferencias en los niveles proteicos de UCP1 entre los animales que expresaban o no Cdh1 se produjeron en WAT. Además, es en este tejido donde se observa la estimulación transcripcional de Cdh1 en los animales control. Por ello, quisimos determinar si dicha estimulación se traducía en un aumento de los niveles proteicos de Cdh1. Los resultados de la **Figura 52C** constataron un incremento *in vivo* de Cdh1 en WAT tras la exposición al frío. Además, el nivel de Cdh1 en las distintas muestras de WAT tras la exposición al frío correlacionó inversamente con el nivel proteico de UCP1, de tal modo que aquellas con mayor presencia de Cdh1 contenían menores niveles de UCP1. Además, aquellos animales que alcanzaron menores niveles de Cdh1 en WAT tras la exposición al frío tenían más UCP1 a pesar de presentar bajos niveles de PGC1a.

En conjunto, estos resultados indican que **el frío incrementa los niveles de Cdh1 en WAT *in vivo***. Para validar esta observación *in vitro*, simulamos la exposición al frío durante la adipogénesis de células control (mediante la activación de la ruta tiroidea o b-adrenérgica con T3 o isoproterenol, respectivamente). Comprobamos que el tratamiento con T3 incrementó la adipogénesis de MEFs primarios Cdh1(+/+) (**Figura 53A**), y condujo a un aumento en los niveles proteicos de Cdh1, lo que confirmaría los datos obtenidos *in vivo* (**Figura 46B**). En paralelo, detectamos también incrementos en p21 y p27, derivados probablemente de la actividad aumentada de APC/C-Cdh1 (**Figura 53B**). En cambio, el tratamiento con isoproterenol no produjo ninguno de estos efectos (**Figura 53B**), probablemente debido a que no se trata de un agonista específico  $\beta_3$ , sino que también activa los receptores  $\beta_1$  y  $\beta_2$  (Baker et al., 2010).



**Figura 53.** *In vitro*, el tratamiento con triyodotironina (T3) durante la adipogénesis de preadipocitos blancos conduce a un aumento en los niveles proteicos de Cdh1. **A.** Escaneo de cultivos en placa, teñidos con ORO, de preadipocitos primarios procedentes de la grasa blanca subcutánea inguinal de animales adultos Cdh1(+/-) diferenciados a adipocitos durante 10 días en ausencia/presencia de triyodotironina (T3, 10 nM) (izquierda). A la derecha, se muestra la cuantificación de la adipogénesis de dichos cultivos (n=3). **B.** Inmunodetección, por *Western blot*, de las proteínas indicadas durante distintos días del proceso adipogénico, de preadipocitos primarios aislados de animales Cdh1(+/-), en ausencia/presencia de triyodotironina (T3, 10 nM) o isoproterenol (ISO, 200 nM). Se muestra la cuantificación de la intensidad de las bandas, normalizando frente al control de carga y frente a los valores de las células control (diferenciadas en ausencia de T3 e ISO). ns= no significativo; \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001; \*\*\*\*p<0,0001

# Discusión





## ***-Discusión-***

### **1. APC/C-Cdh1 inhibe la adipogénesis.**

La generación de adipocitos es un proceso de diferenciación un tanto inusual, pues cursa con una breve etapa proliferativa, denominada expansión clonal, esencial para la diferenciación terminal. Esta peculiaridad confiere a los reguladores del ciclo celular una gran importancia en el proceso adipogénico: simplificando, los promotores de la proliferación estimulan la adipogénesis, mientras que los antiproliferativos la inhiben (Fajas, 2003). Nuestro trabajo demuestra, por primera vez, que APC/C-Cdh1 también sigue esta lógica y, como inhibidor de la proliferación celular, posee una gran actividad antiadipogénica. Y es una novedad doble: se trata del primer proceso de diferenciación en el que APC/C-Cdh1 juega un papel inhibidor.

La ausencia de Cdh1 genera, tanto en MEFs como en preadipocitos primarios, un incremento de la adipogénesis que va acompañado, bioquímicamente, de mayores niveles de CEBP $\alpha$  y PPAR $\gamma$ , principales inductores de la cascada adipogénica. Podría considerarse la desregulación de estas proteínas como el mecanismo molecular por el cual la ausencia de Cdh1 estimula la diferenciación adipogénica. Sin embargo, aunque no podemos descartar esta posibilidad, valoramos su acumulación como una consecuencia (y no una causa) del exceso adipogénico en ausencia de Cdh1, que sería debido a mecanismos ajenos a estas proteínas. Así ocurre en muchos otros estudios, donde CEBP $\alpha$  y/o PPAR $\gamma$  se utilizan como marcadores de diferenciación adipogénica (Moreno-Navarrete & Fernández-Real, 2012).

#### 1.1. APC/C-Cdh1 inhibe la expansión clonal.

Tanto los MEFs como los preadipocitos primarios carentes de Cdh1 presentan una mayor expansión clonal, medida como porcentaje de células en fase S (porcentaje de células EdU+). Nuestro grupo ha descrito recientemente que los MEFs carentes de Cdh1 entran prematuramente en fase S, que además cursa de forma más lenta e ineficiente que en las células control (Garzón et al., 2017). Por tanto, el incremento observado en el porcentaje de células EdU+ en la adipogénesis Cdh1KO podría ser debido a una fase S más lenta, y no a un incremento real de la proliferación celular. Sin embargo, el evaluar el porcentaje de células EdU+ a lo largo de distintos días nos permite descartar esta posibilidad: ni el pico de proliferación se adelanta (como ocurriría si hubiera una entrada en fase S prematura), ni se atrasa el fin de la expansión clonal (por tanto, la fase S no es más lenta) en la adipogénesis Cdh1KO.

El incremento en la expansión clonal se demuestra también mediante el análisis bioquímico: la adipogénesis de MEFs Cdh1KO cursa con un incremento de la hiperfosforilación de Rb (pRb, forma inactiva) en los inicios del proceso. Los niveles incrementados de pRb son un signo de mayor proliferación, ya que permiten la liberación de E2F y la entrada en fase S (Richon et al., 1997). Además, en la adipogénesis en ausencia de Cdh1 se observa una disminución de los niveles de los CKIs p27 y p21, ambos fuertes inhibidores adipogénicos, *in vitro* e *in vivo*, al inhibir la expansión clonal (ver introducción). Ya está descrito que, para la correcta progresión del ciclo celular y el mantenimiento de la fase G<sub>1</sub>, APC/C-Cdh1 estabiliza los niveles proteicos de ambos CKIs (Bashir et al., 2004; Wei et al., 2004). Este trabajo apunta a que la misma actividad podría ser particularmente relevante en adipogénesis, además de explicar

el incremento en expansión clonal en ausencia de Cdh1.

La normalización de los niveles de expansión clonal (mediante el tratamiento con roscovitina, un inhibidor de la actividad Cdk) revierte, pero sólo parcialmente, el incremento adipogénico observado en ausencia de Cdh1. Este resultado no sólo corrobora que Cdh1 inhibe la adipogénesis durante la expansión clonal, sino que además sugiere actividades antiadipogénicas adicionales. Como ya se ha descrito en la 'Introducción', la actividad Cdk también participa en la diferenciación terminal adipogénica. Por tanto, puede que la adipogénesis en ausencia de Cdh1 curse también con un exceso de actividad Cdk en la diferenciación terminal, y que éste sea el mecanismo responsable del aumento adipogénico remanente tras la normalización de la expansión clonal. Sin embargo, es muy probable que en el tratamiento de la expansión clonal con roscovitina, los niveles intracelulares del inhibidor no decaigan inmediatamente tras su eliminación del medio, y continúe inhibiendo en gran medida la posible actividad Cdk en diferenciación terminal. A pesar de ello, las células mutantes tratadas seguían presentando mayor adipogénesis que las células control. Por ello, sospechamos la existencia de otras actividades antiadipogénicas de Cdh1 independientes de la actividad Cdk.

#### 1.2. Cdh1 inhibe la diferenciación terminal.

Nuestros resultados apoyan que Cdh1 se opone a la diferenciación terminal al inactivar la ruta PI3K/AKT, en un mecanismo ajeno a su actividad como inhibidor de la expansión clonal adipogénica.

Tratando de profundizar en el mecanismo molecular que conduce al incremento de la ruta PI3K/AKT en la adipogénesis de células Cdh1KO, encontramos niveles proteicos reducidos de PTEN, una fosfatasa que se opone a la actividad de PI3K al promover la desfosforilación de PIP3 (Chalhoub & Baker, 2009). En conjunto, los resultados sugieren que Cdh1 inactiva la ruta PI3K/AKT al estabilizar a PTEN, en un mecanismo independiente de APC/C.

PTEN no sólo es una fosfatasa citoplasmática de proteínas y lípidos, sino que además actúa como un factor de transcripción con múltiples funciones como supresor tumoral (Blanco-Aparicio et al., 2007; Yang et al., 2007; Planchon et al., 2008). Curiosamente, se han descrito 2 conexiones entre PTEN y Cdh1:

- A. La fracción nuclear de PTEN interacciona con APC/C, promoviendo su asociación con Cdh1 (Song et al., 2011).
- B. En líneas tumorales, Cdh1, en una actividad independiente de APC/C, inhibe a WWP2 (Liu et al., 2016), una E3 ubiquitina-ligasa que promueve la degradación de PTEN (Maddika et al., 2011).
- C.

Nuestros resultados indican que también en células primarias, y en el proceso adipogénico, Cdh1 modula los niveles proteicos de PTEN en un mecanismo independiente de APC/C, confiriendo una gran importancia fisiológica a esta interacción en tejido adiposo. A falta de analizar los niveles proteicos y/o la activación de WWP2, sugerimos que, durante la adipogénesis, Cdh1 podría estabilizar a PTEN al inhibir a esta

## ***-Discusión-***

ubiquitina-ligasa.

### **2. APC/C-Cdh1 promueve la degradación de UCP1.**

#### **2.1. Mayores niveles proteicos de UCP1 en ausencia de Cdh1.**

UCP1 es una proteína específica de los adipocitos de carácter marrón, y determina su capacidad funcional termogénica. Los adipocitos maduros carentes de Cdh1 presentan niveles proteicos incrementados de UCP1, siempre y cuando estimulemos su transcripción mediante rosiglitazona, un agonista de PPAR $\gamma$ .

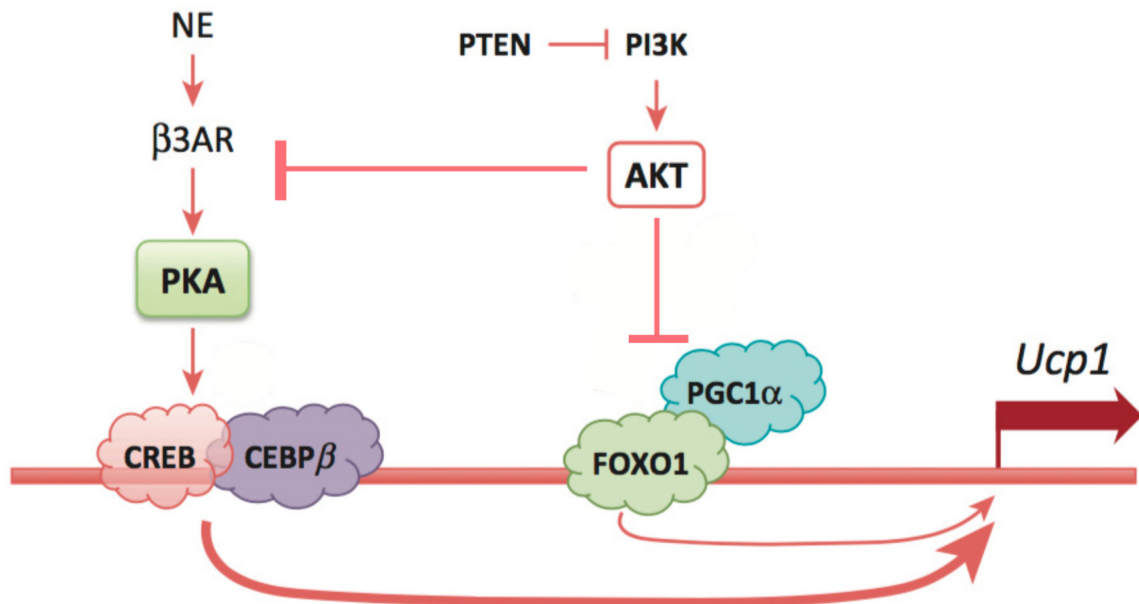
La expresión de UCP1 está finamente controlada transcripcionalmente. La estimulación  $\beta$ -adrenérgica conduce a la inducción transcripcional de UCP1, mediante el incremento en la transcripción y/o actividad de diversos factores de transcripción, como PGC1 $\alpha$ , CREB, PRDM16 y FoxO1. De todos ellos, el principal activador transcripcional de UCP1 es PGC1 $\alpha$ . Sorprendentemente, los adipocitos carentes de Cdh1 presentan menores niveles proteicos de PGC1 $\alpha$ , sugiriendo una deficiente estimulación transcripcional, que necesita ser confirmada. No hemos estudiado a fondo este fenotipo, de gran interés, pero sugerimos que podría deberse a la hiperactivación de la ruta PI3K/AKT observada en los adipocitos mutantes. Como ya se ha comentado en la 'Introducción', la ruta de la insulina y la vía  $\beta$ -adrenérgica se inhiben mutuamente, en adipocitos, en múltiples puntos. Por tanto, la hiperactivación de AKT puede conducir a una menor densidad de receptores  $\beta$ -adrenérgicos, a una disminución de la actividad de PKA, o a otros múltiples efectos, que podrían comprometer la inducción transcripcional tanto de PGC1 $\alpha$  como de UCP1 en los adipocitos mutantes.

¿Cómo es posible que, en ausencia de Cdh1, se observe una mayor acumulación de UCP1 en los adipocitos si éstos presentan menores niveles de PGC1 $\alpha$ ? Esto podría deberse a una desregulación de otros factores o rutas, que determinase un incremento en la transcripción de UCP1. Sin embargo, observamos que la expresión de UCP1 no sólo no aumenta, sino que cae significativamente tras la depleción aguda de Cdh1 en los adipocitos. También podría explicarse la reducción transcripcional de UCP1 por un incremento en la hiperactivación de AKT, como ya se ha explicado para PGC1 $\alpha$ . Además, otro mecanismo ya descrito (**Figura 54**) por el cual la hiperactivación de AKT limita la expresión de UCP1 es la fosforilación de FoxO1 (coactivador de PGC1 $\alpha$ ), que desencadena su inactivación y degradación (Huang et al., 2005; Ortega-Molina et al., 2012).

Por tanto, los adipocitos Cdh1KO presentan niveles proteicos incrementados de UCP1, a pesar de contar con menores niveles de mRNA de UCP1. Nos preguntamos cómo podría explicarse esta discordancia, e inicialmente nos planteamos que un incremento de UCP1, una proteína de la membrana mitocondrial interna, podría deberse a la presencia de un gran número de mitocondrias en los adipocitos Cdh1KO. Sin embargo, el análisis de la carga mitocondrial, utilizando la sonda Mitotracker, no reveló diferencias entre los adipocitos WT y los adipocitos mutantes. No obstante, consideramos importante confirmar estos resultados, ya que, aunque en principio se considera que esta sonda penetra de forma pasiva en la mitocondria, existe la posibi-



lidad de que realmente entre a favor del potencial de membrana. Y el potencial, como ya se ha demostrado en este trabajo, es menor en los adipocitos carentes de Cdh1. Si la sonda penetrara en la mitocondria a favor del gradiente electroquímico, que los adipocitos Cdh1KO (cuyo potencial de membrana es menor) presentaran una intensidad de la sonda similar a las células control, sugeriría una mayor carga mitocondrial en las células mutantes.



**Figura 54. Efecto inhibitorio de la ruta de la insulina sobre la expresión de UCP1.** La ruta PI3K/AKT se opone a los principales mecanismos de inducción transcripcional de UCP1. (Modificado de X.

¿Cuál es entonces la causa por la que los adipocitos carentes de Cdh1 presentan una acumulación proteica de UCP1? Teniendo en cuenta que APC/C-Cdh1 es una E3 ubiquitina-ligasa que media la poliubiquitinación de numerosos sustratos para su posterior degradación por el proteasoma, pensamos que la degradación de UCP1 podría estar alterada en ausencia de Cdh1. La vía mitofágica es el principal mecanismo descrito para la degradación de UCP1, al menos en BAT (Puigserver et al., 1992; Moazed et al., 2002), pero no se descarta la posible implicación de otras rutas proteolíticas. En ese sentido, un estudio reciente indica que, al igual que UCP2 y UCP3, UCP1 también puede ser degradado por el sistema UPS (Clarke et al., 2012). De hecho, UCP1 en los adipocitos *beiges* es más inestable que en adipocitos marrones, sugiriendo la existencia de varios mecanismos de degradación con distinta relevancia según el tipo celular (Gospodarska et al., 2015). Así, las proteínas UCPs, proteínas de la membrana mitocondrial interna, aparecen ubiquitinadas *in vivo*, y se ha demostrado su degradación por el sistema UPS *in vitro*, aunque no se conoce la E3 ubiquitina-ligasa que media esta degradación (ver 'Introducción'). Teniendo en cuenta estos antecedentes, investigamos si UCP1 se degradaba mediante el sistema UPS en nuestros adipocitos, y si esta degradación dependía de Cdh1. El tratamiento de los adipocitos con MG132, un inhibidor específico del proteasoma, genera un importante aumento en los niveles proteicos de UCP1 en los adipocitos WT, pero no en los adipocitos Cdh1KO.

## ***-Discusión-***

El mismo tratamiento no induce cambios ni en los niveles de mRNA de UCP1, ni en la acumulación de otras proteínas mitocondriales (VDAC y TOMM20). Este resultado confirma que UCP1 podría degradarse por la vía del proteasoma y sugiere que dicha degradación podría estar mediada por el complejo APC/C-Cdh1.

### 2.2. Mayor estabilidad proteica de UCP1 en ausencia de Cdh1.

Los datos obtenidos sugieren una mayor estabilidad de UCP1 en ausencia de Cdh1. Para corroborarlo, analizamos la vida media de UCP1 en adipocitos WT y Cdh1KO, mediante el tratamiento con cicloheximida (CHX), un inhibidor de la síntesis proteica. A pesar de no poder estimar la vida media de UCP1 en los adipocitos mutantes (porque apenas se degrada), ni realizar tratamientos más largos de 12 horas con CHX (por citotoxicidad), los datos permiten evidenciar que UCP1 es más estable en ausencia de Cdh1. Sin embargo, necesitamos confirmar estos resultados, pues las diferencias observadas en cuanto a UCP1 podrían deberse a una citotoxicidad diferencial que afectase más drásticamente a las células WT (aunque no hay ninguna evidencia que lo sugiera, no podemos descartarlo). También es llamativo que, en las células control, la degradación de UCP1, muy tardía, ocurra cuando Cdh1 ya se ha degradado. Una hipotética explicación sería que entre la ubiquitinación de UCP1 y su degradación (procesos que se desconoce cómo y dónde ocurren) existiera un desfase temporal. Por ejemplo, si la ubiquitinación de UCP1 tuviera lugar en la mitocondria, y su degradación en el citoplasma, entre ambos procesos habría necesariamente un desajuste temporal cuya magnitud dependería de la facilidad para exportar la proteína ubiquitinada al citoplasma. De hecho, también sería posible que fuera la propia ubiquitinación de UCP1, mediada por APC/C-Cdh1, la que desencadenase su exposición al proteasoma citosólico, de forma similar al modelo propuesto por Azzu y colaboradores (**Figura 6**). En todo caso, para confirmar estos resultados sería interesante calcular la vida media de UCP1 en presencia de una forma no degradable de Cdh1, y/o repetir este análisis en sistemas *in vitro* prescindiendo de membranas celulares.

### 2.3. ¿Es UCP1 un sustrato directo de APC/C-Cdh1?

Nos planteamos dos formas por las que UCP1 se podría degradar de forma dependiente de Cdh1: que UCP1 fuera sustrato directo de APC/C-Cdh1, o que otro/s sustrato/s de este complejo regulasen la estabilidad de UCP1. Comenzamos valorando la primera posibilidad, dada la importancia que supondría el descubrimiento de un nuevo sustrato de APC/C-Cdh1, y que además éste fuera una proteína tan importante fisiológicamente. Para testar esta idea, llevamos a cabo la transfección transitoria de U2OS y MEFs con plásmidos que codifican la versión WT de UCP1 o una versión con la caja D mutada (no funcional). La cotransfección de células tumorales U2OS con Cdh1 y UCP1 WT o UCP1 mutante sugirió que la sobreexpresión de Cdh1 reduce los niveles de UCP1, independientemente de su caja D, al menos en estas células, altamente proliferativas.

UCP1 es una proteína específica de los adipocitos de carácter marrón, un tipo celular muy diferente a las células tumorales U2OS. Debido a la dificultad para transfectar adipocitos marrones, y su alta expresión endógena de UCP1, decidimos optar por realizar los experimentos de transfección en MEFs, tanto asíncronos como sincro-

nizados en  $G_0$ - $G_1$  para simular la quiescencia propia de los adipocitos maduros. La transfección de MEFs asíncronos (proliferativos) WT y Cdh1KO vuelve a demostrar que los niveles proteicos de UCP1 se incrementan en ausencia de Cdh1. Pero en esta condición (células proliferativas), y al igual que en U2OS, el incremento de UCP1 es independiente de su caja D. En cambio, cuando sincronizamos los MEFs en  $G_0$ - $G_1$  (es decir, entran en quiescencia, mediante la privación de suero) se producen cambios muy relevantes:

- Con la quiescencia, los niveles proteicos de UCP1 en MEFs WT se incrementan muy significativamente, sugiriendo que UCP1 se estabiliza cuando las células dejan de proliferar. Esto tiene un gran sentido biológico, pues durante la adipogénesis, los adipocitos salen de ciclo y entran en quiescencia, y ese proceso va acompañado de un incremento en los niveles proteicos de UCP1. A falta de confirmación mediante otros análisis, este dato sugiere la posible existencia de mecanismos de degradación de UCP1 exclusivos o más intensos en células proliferativas.
- Los MEFs Cdh1KO quiescentes también presentan mayores niveles proteicos de UCP1, pero en un rango mucho menor al observado en células proliferativas. Además, la mutación de la caja D revierte completamente este incremento, lo que sugiere que, en células quiescentes, UCP1 sí puede ser reconocido como sustrato de APC/C-Cdh1.

Estos resultados aportan más evidencias adicionales sobre la estabilización de UCP1 en ausencia de Cdh1, y sugieren la existencia de 2 mecanismos de degradación. Proponemos 2 hipótesis:

A. En células proliferativas, UCP1 se degradaría activamente, a través de un mecanismo dependiente de Cdh1 pero no de la caja D; mientras que, en células quiescentes, existiría otro mecanismo distinto, menos activo, donde APC/C-Cdh1 sí parecería degradar directamente a UCP1. Podría tratarse de dos mecanismos de degradación en competencia, y ambos dependientes de Cdh1. Proponemos que uno de los posibles mecanismos de degradación podría estar mediado por Parkin-Cdh1, y el otro por APC/C-Cdh1. Parkin es una E3 ubiquitina-ligasa que promueve la degradación de múltiples proteínas mitocondriales en cooperación con su cofactor PINK (Winklhofer, 2014). Además, Parkin muestra una fuerte actividad antitumoral (Cesari et al., 2003; Picchio et al., 2004; Fujiwara et al., 2008; Veeriah et al., 2010; Yeo et al., 2012), y se ha descrito que interacciona con Cdh1 en mitosis (Lee et al., 2015; Meza-Gutiérrez et al., 2015). Es decir, Cdh1 no sólo puede unirse a APC/C, sino que también forma complejos Parkin-Cdh1 durante la regulación del ciclo celular, y ambas E3 ubiquitina-ligasas compiten por Cdh1. Por tanto, no es descabellado pensar en una posible actividad de Parkin-Cdh1 en la degradación de proteínas mitocondriales (como UCP1) en células proliferativas, a través de mecanismos independientes de la caja D. En células quiescentes no se formaría el complejo Parkin-Cdh1 (sólo es activo en mitosis) y, en su lugar, Cdh1 se uniría a APC/C. El complejo APC/C-Cdh1 (y, por tanto, en un mecanismo dependiente de la caja D) degradaría a UCP1 y, de este modo, modularía sus niveles.

B. En células proliferativas, Cdh1, en una actividad independiente de APC/C (y, por ende, de la caja D), activaría a otra E3 ubiquitina-ligasa [como hace, por ejemplo, con

## ***-Discusión-***

Smurf1, (Wan et al., 2011)], responsable de la degradación de UCP1. Con la salida de ciclo, Cdh1 sería 'secuestrado' por APC/C, y el complejo APC/C-Cdh1 modularía los niveles de UCP1.

El análisis de la vida media de las dos versiones de UCP1 (silvestre y mutada) expresadas ectópicamente en MEFs sincronizados en G<sub>0</sub>, reveló que sólo la versión silvestre se degrada, y únicamente en presencia de Cdh1. O, dicho de otra forma, tanto la delección de Cdh1, como la mutación de la caja D evitan la degradación de UCP1.

En resumen, múltiples evidencias colocan a UCP1 como posible sustrato directo de APC/C-Cdh1, al menos en células quiescentes. Sin embargo, se requieren experimentos adicionales para su confirmación. UCP1 es una proteína de la membrana mitocondrial interna y, hasta la fecha no se ha descrito una localización mitocondrial para el complejo APC/C-Cdh1. Esto complica sobremanera describir cómo APC/C-Cdh1 puede llegar a interactuar con ella y promover su degradación. Por ello, consideramos necesario profundizar un poco más en este mecanismo, analizando por coimmunoprecipitación si APC/C-Cdh1 y UCP1 llegan a interactuar (y dónde), demostrando en ensayos de ubiquitinación *in vitro* que UCP1 ni se ubiquitina ni se degrada en ausencia de Cdh1 o de su caja D, etc.

### 2.4. El incremento de UCP1 conlleva cambios metabólicos intracelulares en los adipocitos carentes de Cdh1.

Los adipocitos Cdh1KO tienen mayores niveles proteicos de UCP1, pero no sabemos si ese incremento tiene consecuencias metabólicas en las células. UCP1 es un desacoplante mitocondrial, de forma que la consecuencia metabólica directa de su actividad es una disminución en el potencial de membrana mitocondrial. Nuestros datos indican que los adipocitos carentes de Cdh1 poseen un potencial de membrana menor que los adipocitos control. Sin embargo, en MEFs detectamos un potencial de membrana muy superior al de los adipocitos, y sin diferencias en ausencia de Cdh1. Estas observaciones apuntan a que los adipocitos generados *in vitro* presentan un bajo potencial de membrana como consecuencia de la expresión de UCP1, y que dicho potencial disminuye aún más en ausencia de Cdh1 debido al exceso proteico de UCP1. Además, evaluamos la tasa de consumo de oxígeno de los adipocitos WT y deplecionados de Cdh1. Los resultados demuestran que, al menos en medio rico, los adipocitos (pero no los MEFs) muestran un menor consumo de oxígeno. Un último análisis demostró que los adipocitos deplecionados de Cdh1 compensan la ineficiencia de su cadena respiratoria incrementando la actividad de rutas catabólicas anaerobias, como la fermentación láctica. Sin embargo, no podemos descartar que el aumento de la glucólisis se deba a mecanismos independientes de UCP1, ya que algunos sustratos de APC/C-Cdh1, como Pfkfb3 (Herrero-Méndez et al., 2009; Rodríguez-Rodríguez et al., 2013), son importantes reguladores glucolíticos.

En conjunto, los resultados de este apartado demuestran que el exceso de UCP1 en los adipocitos Cdh1KO es metabólicamente activo y funcional *in vitro*. Aun así, sería positivo reforzarlos realizando ensayos adicionales: valorando los niveles de AMP/ATP (esta relación sería mayor en los adipocitos Cdh1KO si tuvieran déficit energético), la capacidad lipolítica y b-oxidación de ácidos grasos, o el consumo de oxígeno en

condiciones de restricción nutricional. En este último experimento, la idea sería limitar la compensación energética mediante vías anaerobias, y forzar la hiperactivación de la cadena respiratoria en los adipocitos Cdh1KO, que provocaría un mayor consumo de oxígeno y/o a un fenotipo de déficit energético.

### **3. Fenotipo *in vivo* de la depleción de Cdh1 en tejido adiposo.**

#### **3.1. Depleción de Cdh1 mediada por el transgén aP2-Cre o adipoQ-Cre.**

En primer lugar, validamos el correcto funcionamiento de las líneas de ratón Cdh1KO específicas de tejido adiposo, analizando la depleción de Cdh1 mediada por los transgenes aP2-Cre (modelo PACdh1KO) y adipoQ-Cre (modelo MACdh1KO) en los tejidos de los animales y en los preadipocitos diferenciados *in vitro*. Ambos modelos funcionaron correctamente. En cuanto al transgén aP2-Cre (modelo PACdh1KO) es una proteína transportadora de ácidos grasos en los adipocitos maduros, aunque también se expresa en otros tejidos y tipos celulares, incluyendo cerebro, células endoteliales y macrófagos. Esto plantea el problema de si los fenotipos observados en el modelo PACdh1KO son consecuencia de la pérdida de Cdh1 en tejido adiposo (células adiposas) o se deben a la depleción inespecífica de Cdh1 en otros tejidos o tipos celulares. No hemos realizado un estudio exhaustivo de la expresión de Cdh1 en los distintos tejidos de animales control y portadores del transgén. Sin embargo, los datos obtenidos *in vitro*, en ensayos de diferenciación con MEFs o preadipocitos primarios, avalan el papel de Cdh1 en adipogénesis y validan las observaciones realizadas *in vivo* con este modelo (si bien no podemos descartar por completo la contribución minoritaria de un efecto inespecífico). En cuanto al transgén adipoQ-Cre, es el más utilizado para generar modelos de delección génica específicos de tejido adiposo, gracias a su gran especificidad y eficiencia (ver introducción), ya que adipoQ, o adiponectina, es una adipocina sintetizada por el tejido adiposo y específica de adipocitos maduros.

#### **3.2. Hiperactivación de la ruta PI3K/AKT e incremento en los niveles proteicos de UCP1, en los animales Cdh1KO.**

Bioquímicamente, los tejidos adiposos mutantes PACdh1KO y MACdh1KO muestran las características observadas en los adipocitos Cdh1KO diferenciados *in vitro*: hiperactivación de la ruta PI3K/AKT (acompañada de la disminución de PTEN), y aumento de los niveles proteicos de UCP1.

UCP1 es una proteína específica de adipocitos marrones y *beiges*. La capacidad de *browning* (es decir, de generación de adipocitos *beiges*) es más alta en grasa subcutánea que en grasa perigonadal (ver 'Introducción'). Por tanto, es sorprendente que los animales deficientes en Cdh1 presenten el mayor exceso de UCP1 en dicho depósito que, por otra parte, es aquel en el que la regulación transcripcional de UCP1 es menos relevante. Para entender este fenotipo, hay que recordar que, al igual que ocurre *in vitro*, los tejidos grasos muestran una menor activación b-adrenérgica y una disminución transcripcional de UCP1 en ausencia de Cdh1, que sugerimos se debe a la hiperactivación de la ruta PI3K/AKT. Además, todos los tejidos grasos Cdh1KO presentan mayores niveles proteicos de UCP1. Estos resultados apoyan la estabilización

## ***-Discusión-***

proteica de UCP1 *in vivo* en ausencia de Cdh1, y explican por qué es en WAT donde se observa un mayor exceso de UCP1 en los ratones mutantes, ya que la grasa perigonadal es el depósito graso donde la transcripción de UCP1 pierde más relevancia en favor de la degradación proteica.

### 3.3. Fenotipo de los mutantes PACdh1KO.

Bajo dieta normal, los animales mutantes ya presentan cierta tendencia a obesidad, pues engordan más y todos sus depósitos grasos tienen un peso relativo mucho mayor que el de los hermanos control. Los ratones mutantes no presentan una hipertrofia de los adipocitos blancos, por lo que el aumento de tamaño de los depósitos grasos únicamente se puede explicar mediante un incremento adipogénico. El BAT de los animales mutantes es mucho más grande que el de los ratones control, pero visualmente parece menos marrón. El color marrón de este tejido se debe a la presencia de multitud de mitocondrias en los adipocitos, y su aclaramiento suele estar asociado al fenotipo obeso, con la aparición de adipocitos similares a los blancos inmiscuidos entre la grasa marrón. Este fenotipo se confirma mediante análisis histológico por Hematoxilina y Eosina (H&E), observándose adipocitos mucho mayores y con grandes vacuolas lipídicas entre los adipocitos marrones. Esto explicaría el color más claro del BAT de los ratones mutantes y, al menos en parte, el tamaño incrementado de sus depósitos de grasa marrón, aunque no se puede descartar también el posible efecto de un exceso de adipogénesis marrón. En ese sentido, es importante apuntar que absolutamente todos los ensayos de adipogénesis *in vitro* realizados durante este trabajo se llevan a cabo a partir de MEFs primarios o preadipocitos blancos, y ambos sufren una adipogénesis de carácter blanco. Por tanto, todas las conclusiones obtenidas acerca del papel de Cdh1 en adipogénesis sólo se pueden aplicar a la adipogénesis blanca, y no son extrapolables a la adipogénesis marrón. Ambos procesos son muy similares, pero para poder concluir algún papel de Cdh1 en adipogénesis marrón, sería preciso realizar ensayos de adipogénesis a partir de preadipocitos marrones. Nuestra predicción es que, posiblemente, Cdh1 también inhiba la formación de BAT, al frenar la activación de la ruta de la insulina, una vía muy importante en la adipogénesis marrón (ver 'Introducción').

El fenotipo obeso de estos animales se hace más evidente al alimentarlos con dieta grasa durante 2 meses, y no se debía a una mayor ingesta de comida. Además, los ratones PACdh1KO presentaron una mayor incidencia de hepatoesteatosis inducida por dieta grasa, además de menor tolerancia a la glucosa. Estos resultados indican que los ratones PACdh1KO sufren los problemas metabólicos asociados a la obesidad, aunque podrían completarse valorando también los niveles sanguíneos de triglicéridos, colesterol, etc., y realizando curvas de tolerancia a la insulina.

Son particularmente relevantes los cambios observados en los ratones tras el tratamiento en frío. Por una parte, los animales PACdh1KO termorregulan mejor. Por otra, revierten completamente el fenotipo de obesidad que presentan a temperatura ambiente: pierden el exceso de grasa blanca, disminuyen significativamente el tamaño de sus adipocitos blancos, pero mantienen un mayor peso relativo del BAT, a pesar de que desaparecen las células con grandes vacuolas lipídicas similares a los adipocitos blancos, y se normaliza el tamaño medio de los adipocitos marrones. Resulta-

dos similares se observan tras el tratamiento diario durante 7 días con CL316243, un agonista b-adrenérgico. La explicación es sencilla: el frío activa a UCP1, y su exceso en los ratones mutantes permite una mayor capacidad termogénica generando, presumiblemente, un alto gasto energético que consume el exceso de adiposidad que presentaban a temperatura ambiente. Tras el frío, tanto en grasa blanca como en grasa marrón los ratones mutantes alcanzan niveles de mRNA de UCP1 inferiores a las de los animales control, posiblemente por una estimulación ineficiente de la ruta b-adrenérgica. A pesar de ello, tras 10 días a 4-6°C los niveles proteicos de UCP1 en grasa blanca perigonadal siguen siendo más elevados en los animales portadores del transgén que en los controles. En cambio, se pierde el exceso proteico en BAT. Estos datos confirman que la ausencia de *Cdh1* promueve la estabilidad proteica de UCP1. No podemos descartar que, *in vivo*, *Cdh1* contribuya a modular negativamente la traducción del mRNA de UCP1, pero las observaciones *in vitro* apoyan la hipótesis del efecto sobre la estabilidad de la proteína. Por otro lado, las diferencias observadas entre BAT y WAT sugieren que la regulación de UCP1 ocurre mayoritariamente a nivel transcripcional en BAT; mientras que en WAT cobra más relevancia la regulación post-transcripcional centrada probablemente en la estabilidad de la proteína. Por otra parte, el análisis bioquímico indica que, tras 10 días en frío, las diferencias en el nivel proteico de UCP1 entre muestras de animales control y mutantes se atenúan en grasa blanca y desaparecen en grasa marrón. ¿Cómo es posible entonces que habiendo perdido, al menos parcialmente, el exceso de UCP1, los ratones mutantes muestren una reversión completa del fenotipo obeso tras el tratamiento en frío?:

A. La normalización de los niveles de UCP1 podría ocurrir gradualmente, manteniendo inicialmente niveles proteicos muy superiores a los de los animales control. Así, podría ocurrir la reversión del fenotipo obeso en los ratones mutantes principalmente durante las primeras horas o días de la exposición al frío. Para su confirmación, sería necesario estudiar la adiposidad y los niveles proteicos de UCP1 a distintos días durante el tratamiento en frío.

B. Aunque con una menor diferencia, tras el tratamiento frío los ratones mutantes siguen presentando niveles incrementados de UCP1 en grasa perigonadal. Y es probable que esto también ocurra en otros depósitos, como la grasa retroperitoneal, perirrenal y subcutánea. Algunos estudios sugieren que la habilidad de los ratones obesos para reducir la adiposidad cuando se exponen al frío depende de los adipocitos *beiges*, y no de los adipocitos marrones (Kozak et al., 2010). Según esto, es posible que la pérdida del fenotipo obeso en los ratones PAC*dh1*KO se deba, principalmente, a su exceso proteico de UCP1 (atenuado, pero exceso al fin y al cabo) en grasa blanca.

C. No podemos descartar que *Cdh1* participe también en alguno de los mecanismos de generación de calor independientes de UCP1 (ver 'Introducción').

En conjunto, el estudio *in vivo* de los ratones PAC*dh1*KO sugiere la coexistencia de dos fenotipos aparentemente opuestos. Por una parte, el exceso adipogénico, asociado a un incremento en la expansión clonal e hiperactivación de la ruta PI3K/AKT, determina una mayor tendencia a obesidad. Y todo ello está en consonancia con la literatura previa: el incremento en la expansión clonal debido a la pérdida de p21 y/o p27 también deriva en ratones obesos (Naaz et al., 2004); y la hiperactividad de la ruta PI3K/AKT conduce a una mayor adipogénesis y a una menor expresión de UCP1 (ver 'Introducción').

## ***-Discusión-***

En paralelo, la depleción de Cdh1 en los adipocitos maduros incrementa la presencia de UCP1 en las mitocondrias y confiere un cierto carácter ‘marrón’ a los mismos, de forma similar a la actividad de Rb (Hansen et al., 2004; Dali-Youcef et al., 2007; Calo et al., 2010). Sin embargo, Cdh1 no inhibe la transcripción de UCP1, sino su estabilidad a nivel proteico, y cuando UCP1 se activa fuertemente (en la exposición al frío), los ratones mutantes presentan las mismas características que se observan en la sobreexpresión ectópica de esta proteína en grasa blanca: reducción de la adiposidad, resistencia a la obesidad y mayor tolerancia al frío (Kopecky et al., 1995; Kozak et al., 2010).

### 3.4. Fenotipo de los mutantes MACdh1KO.

Estos animales mutantes, al sufrir la depleción de Cdh1 sólo en adipocitos maduros, no presentan un exceso adipogénico ni tendencia a obesidad. Los ratones mutantes MACdh1KO son más delgados, con depósitos de grasa blanca menores, y adipocitos blancos algo más pequeños. En cambio, su BAT es más grande y conserva las características propias de la grasa marrón, suponiendo una primera evidencia clara que sugiere una actividad antiadipogénica de Cdh1 también en grasa marrón. Los preadipocitos blancos mutantes de este modelo no diferencian más que los control, pero el tamaño incrementado de su BAT sugiere que la adipogénesis marrón sí está potenciada, aunque no lo hemos comprobado. Es posible que la expresión de adipoQ, y por tanto la escisión de Cdh1, sea más temprana durante la adipogénesis marrón que durante la adipogénesis blanca. La gran relevancia que tiene la ruta PI3K/AKT (hiperactiva en los ratones mutantes) en la formación de la grasa marrón (Lynes et al., 2015) también podría explicar este fenotipo. La protección frente a obesidad (y comorbilidades asociadas) de los ratones MACdh1KO se hace más evidente cuando ésta se induce mediante la alimentación con dieta grasa, donde las diferencias observadas no se deben a cambios en la ingesta de comida.

¿Por qué los ratones MACdh1KO presentan protección a obesidad? Atribuimos este fenotipo al exceso en los niveles proteicos de UCP1 en los depósitos grasos. Como ya se ha comentado en la ‘Introducción’, niveles incrementados de UCP1 no correlacionan necesariamente con un mayor gasto energético, sino que para ello se requiere la activación de la proteína. El principal estímulo que promueve la activación de UCP1 es el frío. La temperatura a la cual los ratones se encuentran en condiciones de termoneutralidad es 30°C. Los ratones en el animalario se mantienen a una temperatura de 22±1°C, es decir, alrededor de 8°C por debajo de su temperatura óptima, con lo que se encuentra crónicamente en situación de frío moderado. Por tanto, UCP1 está ligeramente activo, y su exceso en los ratones mutantes puede conducir a un incremento en el gasto energético (aún por estudiar) que limitaría la ganancia de peso. Se ha descrito que el primer tejido adiposo que se utiliza como fuente de energía tras un incremento de la demanda energética es la grasa perigonadal (Tchernof et al., 2006; Arner, 2010), lo que explica que sea ésta, y no la grasa subcutánea, la más reducida en los ratones mutantes.

En la exposición al frío, los ratones mutantes MACdh1KO presentan mayor capacidad termogénica (al igual que en el otro modelo) y persistencia del fenotipo de protección



a obesidad. Resultados similares se obtienen mediante el tratamiento diario con el agonista b-adrenérgico CL316243 durante 7 días. Es decir, el exceso en los niveles proteicos de UCP1, activado debido al frío (de forma ligera a temperatura ambiente, e intensa a 4-6°C), promovería una protección frente a la obesidad. Sería interesante estudiar el fenotipo de estos ratones mutantes en condiciones de termoneutralidad, donde, según esta idea, no deberían presentar fenotipo alguno al estar UCP1 inactivo.

#### **4. Fenotipo adiposo *in vivo* de la delección constitutiva de Cdh1.**

La delección constitutiva de Cdh1 produce animales significativamente más pequeños con múltiples anomalías, lo cual imposibilita descifrar si el fenotipo observado en el tejido adiposo de estos animales es debido a la delección de Cdh1 en el mismo, o consecuencia de sus defectos metabólicos orgánicos. Sin embargo, sí consideramos que su análisis puede ser útil para confirmar alguno de los fenotipos detectados en los animales con una deficiencia en Cdh1KO específica de tejido adiposo.

Los ratones constitutivamente deficientes en Cdh1 presentan mucha más grasa blanca subcutánea y más grasa marrón (de carácter marrón, sin 'blanqueamiento'). Sin embargo, apenas poseen grasa perigonadal y grasa visceral (retroperitoneal y perirrenal). No podemos descartar que su fenotipo adiposo se deba a factores extrínsecos, es decir, a sus múltiples **desórdenes metabólicos**. También es posible que la lipodistrofia observada en estos animales sea una combinación de los fenotipos observados en los animales Cdh1KO específicos de tejido adiposo:

- A. La estimulación de la diferenciación adipogénica blanca en ausencia de Cdh1 resulta en un incremento muy acusado en la formación de grasa blanca subcutánea.
- B. La posible estimulación de la adipogénesis marrón produce depósitos de grasa marrón más grandes.
- C. La pérdida de grasa visceral podría deberse a un aumento notable del gasto energético. Estos animales presentan unos niveles de UCP1 muy altos y, probablemente, muy activos, ya que su reducido tamaño (mayor relación superficie/volumen) y su menor densidad de pelaje pueden derivar en una mayor pérdida de calor, requiriendo mayor termogénesis. El gasto energético asociado a la activación termogénica de UCP1 conllevaría la pérdida de grasa visceral, primer y principal depósito adiposo de reserva energética (Tchernof et al., 2006; Arner, 2010).

#### **5. Regulación de Cdh1 en tejido adiposo en la exposición al frío.**

Los ensayos *in vivo* demuestran un papel antiadipogénico y antitérmico de Cdh1. Por tanto, pensamos que quizás los niveles de Cdh1 en tejido adiposo podrían ser regulados en función de las necesidades térmicas.

Comprobamos que, en efecto, con el frío se induce la transcripción de Cdh1 en grasa blanca, y se inhibe en grasa marrón. La estimulación de la ruta tiroidea (una vía activada en respuesta al frío) durante la adipogénesis también incrementó los niveles proteicos de Cdh1, p21 y p27.

## **-Discusión-**

Pero, ¿cuál es el significado fisiológico de esta regulación, y por qué se produce de forma diferencial en WAT y BAT? Hipotetizamos que la disminución de Cdh1 en BAT tras el frío puede ser un mecanismo fisiológico para promover la adipogénesis y acumulación de UCP1, y dotar al organismo de una mayor capacidad termogénica. El tratamiento en frío apoya esta hipótesis: en los ratones WT disminuyen los niveles de Cdh1 y, por tanto, la degradación de UCP1. Por ese motivo, tras 10 días a 4-6°C, los niveles proteicos de UCP1 en BAT de animales WT se asemejan a los de los animales carentes de Cdh1. igualándose los niveles proteicos de esta proteína entre ambos genotipos.

En cambio, en WAT se produce una acumulación de Cdh1 tras la exposición al frío. ¿Por qué sucede esto si también debe aumentar la termogénesis en WAT, mediante la aparición de adipocitos *beiges*? Nosotros sugerimos que quizás en este tejido los niveles de UCP1 deban estar más finamente regulados:

A. Niveles excesivos de UCP1 pueden conducir a la muerte de células musculares e incluso de los adipocitos marrones (Kozak et al., 2010), por lo que probablemente los adipocitos *beiges* tampoco deban acumular niveles demasiado altos de esta proteína. También es posible que el exceso de UCP1 sea perjudicial para el organismo. Así, recientemente se ha demostrado que la caquexia asociada al cáncer (un excesivo y patológico gasto energético que causa 1/3 de las muertes debidas a tumores) se produce por un incremento excesivo en los niveles de UCP1, concretamente en WAT, en pacientes oncológicos (Petruzzelli et al., 2014). Por tanto, parece importante controlar que no se acumulen niveles excesivos de UCP1 en WAT, y quizás Cdh1 participe en este mecanismo.

B. Se ha descrito que tras la exposición al frío, los cambios transcripcionales y proteicos de UCP1 son menores en grasa marrón que en grasa blanca, donde las variaciones son mucho más dinámicas (ver 'Introducción'). Así, en WAT se produce un fuerte incremento en los niveles de UCP1, que rápidamente vuelven a la normalidad cuando el estímulo frío desaparece (Gospodarska et al., 2015). Es posible que Cdh1 deba acumularse en los adipocitos *beiges* durante la exposición al frío, para garantizar la rápida degradación de UCP1 cuando el estímulo desaparezca y que los adipocitos *beiges* puedan retornar al fenotipo blanco.

### **6. Modelo. Papel fisiológico de Cdh1 en tejido adiposo.**

El trabajo resumido en esta memoria nos permite proponer un modelo sobre el papel fisiológico de Cdh1 en tejido adiposo, que modularía la termogénesis restringiendo la formación de nuevos adipocitos y la acumulación en éstos de UCP1 (**Figura 55 y Figura 56A**).

Cdh1 inhibe la adipogénesis blanca (y, probablemente, la marrón) al reducir tanto la expansión clonal (posiblemente mediante la estabilización de CKIs) como la diferenciación terminal (al limitar la activación de la ruta PI3K/AKT probablemente promoviendo la estabilización de PTEN) (**Figura 55**). Así, la depleción de Cdh1 en preadipocitos murinos *in vivo* conduce a un aumento de la adiposidad y tendencia a la obesidad (**Figura 56B**).

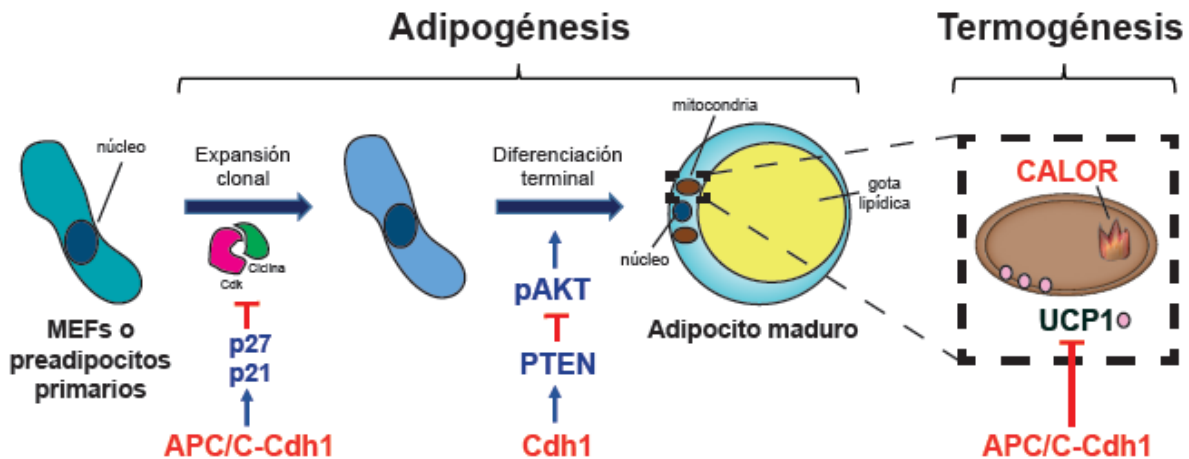


Figura 55. Modelo propuesto en relación al papel de Cdh1 en adipogénesis y termogénesis.

Por otra parte, nuestros datos evidencian que, en los adipocitos maduros, Cdh1 promueve la degradación de UCP1 por el proteasoma. Concretamente, aunque esto necesita confirmación, UCP1 parece ser sustrato de APC/C-Cdh1. Así, los animales deplecionados de Cdh1 en adipocitos maduros presentan un exceso proteico de UCP1 y resistencia a obesidad (**Figura 56C**), y todo parece indicar que entre ambas observaciones existe una relación causa-efecto.

Cuando los ratones se exponen a frío se produce una intensa activación de UCP1, lo que confiere a los 2 modelos de inactivación de Cdh1 en tejido adiposo mayor capacidad termogénica y tolerancia al frío. Presumiblemente, este fenotipo estaría asociado a un incremento en el gasto energético, incremento que apoyaría la resistencia a obesidad de los ratones carentes de Cdh1 en adipocitos maduros (**Figura 56C**). En los ratones con una expresión reducida de Cdh1 desde el inicio del proceso adipogénico (modelo PACdh1KO), que a temperatura ambiente presentan un fenotipo obeso (con mayor número de adipocitos blancos UCP1+, pero donde UCP1 está poco activo), el tratamiento en frío (y, por tanto, la activación de UCP1) produciría a una reversión completa del fenotipo obeso (**Figura 56B**).

La relevancia de todas nuestras observaciones radica en que no sólo contribuyen a profundizar en el papel fisiológico de Cdh1 en mamíferos, sino que, a lo largo, podrían sustentar el diseño de nuevas estrategias para luchar contra la obesidad. Desde 2007, año en el que se detectó la presencia de BAT activo en humanos adultos (y su incidencia directa como protector de obesidad), se han buscado mecanismos moleculares y farmacológicos para incrementar los niveles y/o actividad de los adipocitos marrones y *beiges*. Y ha sido un camino, como se ha descrito en la introducción, hasta ahora infructuoso. Este trabajo abre la posibilidad, obviamente con mucho aún por descifrar, de utilizar a Cdh1 como futura diana terapéutica en el tratamiento de la obesidad. Así, se hace imprescindible continuar profundizando en el mecanismo molecular por el cual APC/C-Cdh1 promueve la degradación de UCP1. También nos parece muy relevante investigar si existe alguna relación entre obesidad y niveles de Cdh1 en el tejido adiposo de pacientes obesos. Y, si así fuera, quizás una actuación combinada de inhibición de APC/C-Cdh1 en tejido adiposo (para impedir la degradación de UCP1) y estimulación adrenérgica con agonistas  $\beta_3$  (para activar a UCP1) podría resultar útil para combatir, o al menos aliviar, la obesidad.

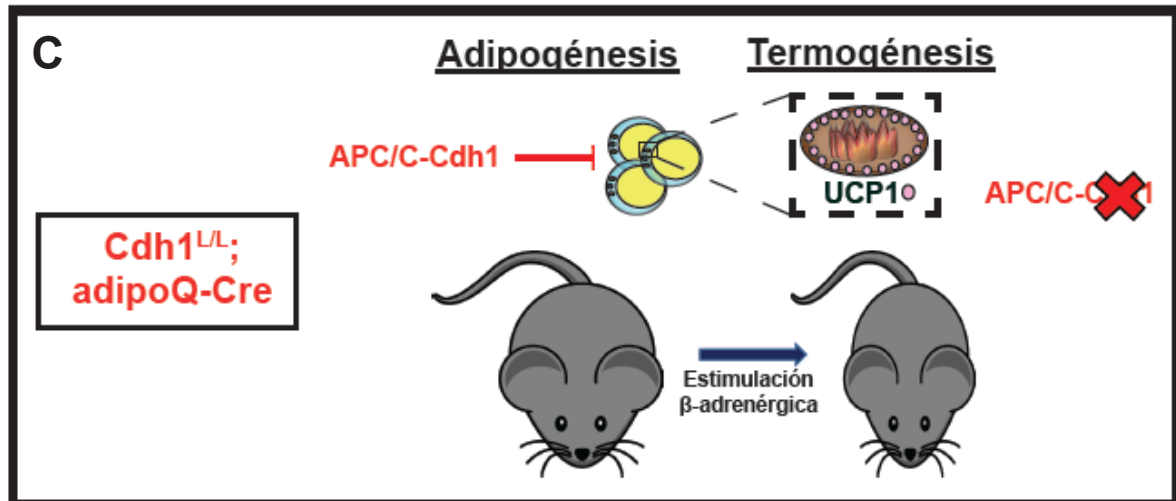
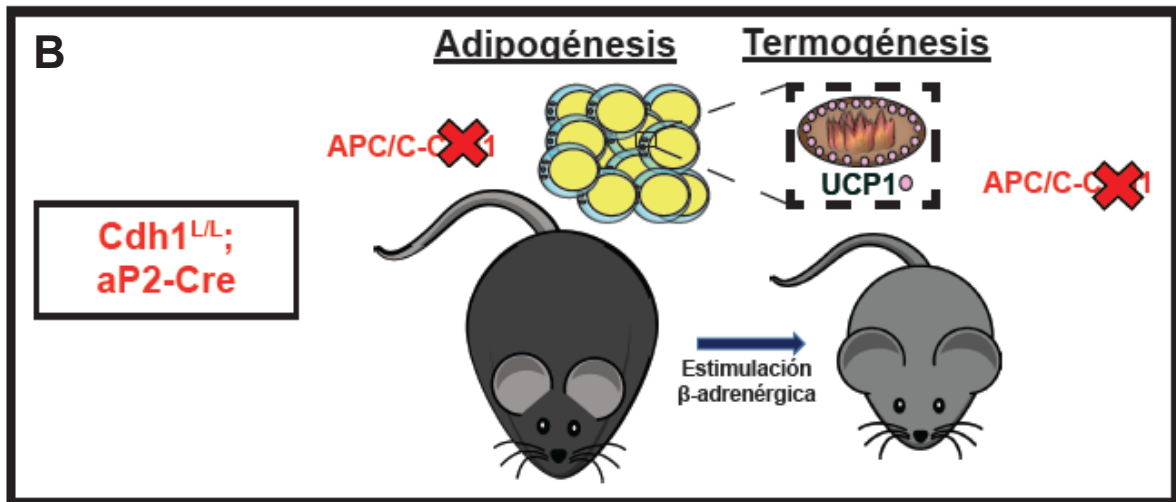
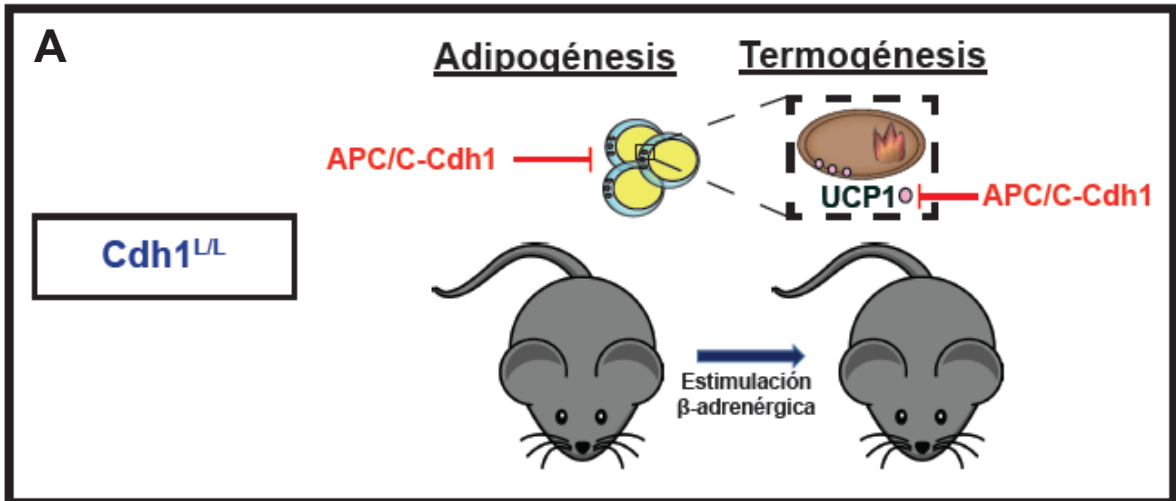


Figura 56. Modelo del papel fisiológico de Cdh1 en adipogénesis y termogénesis (A), y consecuencias de su depleción en adipogénesis (B) o en adipocitos maduros (C)



# Conclusiones



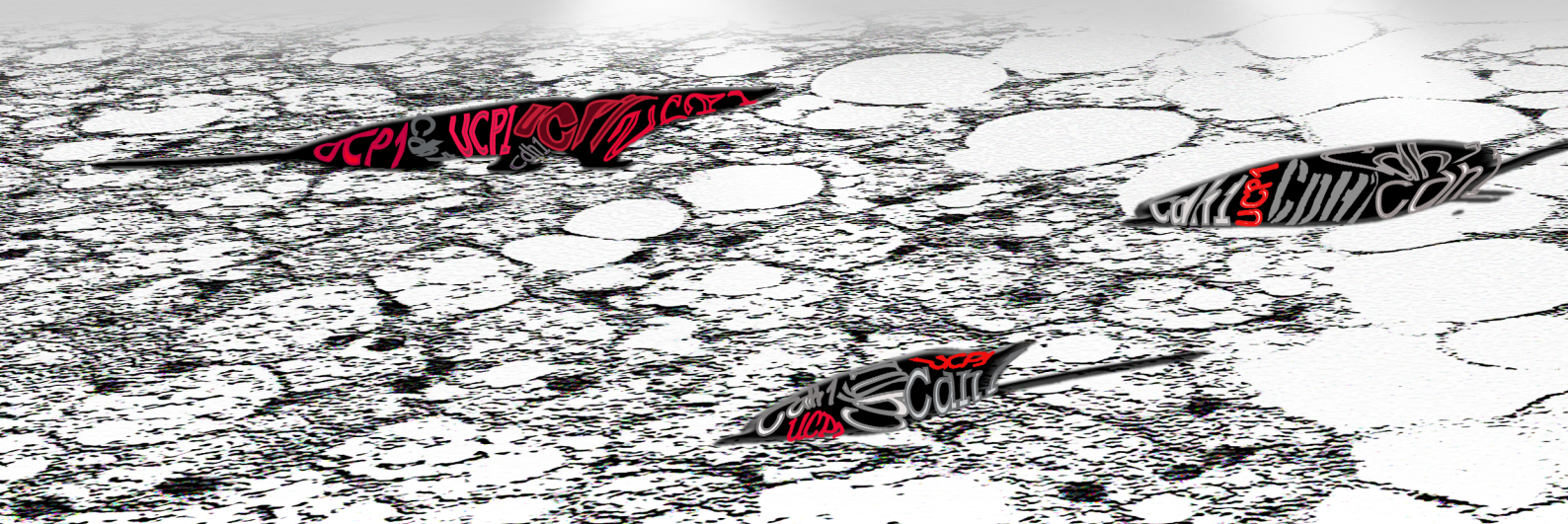


- 1.** Cdh1 posee una notable actividad antiadipogénica, inhibiendo tanto la expansión clonal como la diferenciación terminal de los adipocitos.
- 2.** APC/C-Cdh1 restringe la expansión clonal probablemente al reducir la actividad CDK mediante la estabilización de los inhibidores de Cdks p21 y p27.
- 3.** La actividad represora que ejerce Cdh1 sobre la diferenciación terminal es independiente de APC/C y está mediada por la inhibición de la actividad PI3K/AKT, inhibición que sería consecuencia de la estabilización proteica de PTEN.
- 4.** Los adipocitos maduros carentes de Cdh1 presentan niveles proteicos de UCP1 anormalmente elevados.
- 5.** La degradación proteica de UCP1 depende del proteasoma y de Cdh1.
- 6.** Al menos en células quiescentes, la degradación de UCP1 dependería de su 'caja D'. Por tanto UCP1 podría ser un novedoso sustrato de APC/C-Cdh1.
- 7.** La depleción de Cdh1 desde estadíos tempranos de la adipogénesis da lugar a ratones con fenotipo obeso, mayor peso corporal y mayor adiposidad. Al ser expuestos al frío, estos animales muestran mayor capacidad termogénica y reversión del fenotipo obeso.
- 8.** La depleción de Cdh1 en adipocitos maduros genera ratones protegidos frente a la obesidad, más delgados, con más grasa marrón y menores depósitos de grasa visceral. Además, estos ratones muestran mayor tolerancia al frío.
- 9.** Los niveles proteicos y de mRNA de Cdh1 en grasa blanca y marrón se encuentran modulados según la temperatura ambiental.
- 10.** En resumen, Cdh1 parece jugar un papel muy relevante en la fisiología del tejido adiposo, regulando la termogénesis al restringir la formación de nuevos adipocitos y la acumulación en éstos de UCP1.



## ***-Conclusiones-***

# Bibliografía



## ***-Conclusiones-***

## ***-Bibliografía-***

Abbasi F, Brown BW, Lamendola C, McLaughlin T, Reaven GM (2002). Relationship between obesity, insulin resistance, and coronary heart disease risk. *J. Am. Coll. Cardiol.* 40: 937-943.

Abel ED, Peroni O, Kim JK *et al.* (2001). Adipose-selective targeting of the GLUT4 gene impairs insulin action in muscle and liver. *Nature* 409: 729-733.

Abella A, Dubus P, Malumbres M, Rane SG, Kiyokawa H, Sicard A, Vignon F, Langin D, Barbacid M, Fajas L (2005). Cdk4 promotes adipogenesis through PPAR activation. *Cell Metab.* 2: 239-249.

Accili D, Taylor SI (1991). Targeted inactivation of the insulin receptor gene in mouse 3T3-L1 fibroblasts via homologous recombination. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 4708-4712.

Adams AE, Carroll AM, Fallon PG, Porter RK (2008). Mitochondrial uncoupling protein 1 expression in thymocytes. *Biochim. Biophys. Acta* 1777: 772-776.

Adams AE, Hanrahan O, Nolan DN, Voorheis HP, Fallon P, Porter RK (2007). Images of mitochondrial UCP 1 in mouse thymocytes using confocal microscopy. *Biochim. Biophys. Acta.* 1777: 115-117.

Adams AE, Kelly OM, Porter RK (2010). Absence of mitochondrial uncoupling protein 1 affects apoptosis in thymocytes, thymocyte/T-cell profile and peripheral T-cell number. *Biochim. Biophys. Acta* 1797: 807-816.

Agostini M, Schoenmakers E, Mitchell C, Szatmari I, Savage D, Smith A, Rajanayagam O, Semple R *et al.* (2006). Non-DNA binding, dominant-negative, human PPAR $\gamma$  mutations cause lipodystrophic insulin resistance. *Cell Metab.* 4: 303-311.

Aguer C, Fiehn O, Seifert EL, Bézaire V, Meissen JK *et al.* (2013). Muscle uncoupling protein 3 overexpression mimics endurance training and reduces circulating biomarkers of incomplete  $\beta$ -oxidation. *FASEB J.* 27: 4213-4225.

Aguilar V, Annicotte JS, Escote X *et al.* (2010). Cyclin G2 regulates adipogenesis through PPAR $\gamma$  coactivation. *Endocrinology* 151: 5247-5254.

Aguilar V, Fajas L (2010). Cycling through metabolism. *EMBO Mol. Med.* 2: 338-348.

Ahmadian M, Suh JM, Hah N, Liddle C, Atkins AR, Downes M, Evans RM (2013). PPAR $\gamma$  signaling and metabolism: the good, the bad and the future. *Nat Med.* 19: 557-566.

Akabane S, Uno M, Tani N, Shimazaki S, Ebara N, Kato H, Kosako H, Oka T (2016). PKA regulates PINK1 stability and Parkin recruitment to damaged mitochondria through phosphorylation of MIC60. *Mol. Cell* 62: 371-384.

Albert V, Svensson K, Shimobayashi M *et al.* (2016). mTORC2 sustains thermogenesis via Akt-induced glucose uptake and glycolysis in brown adipose tissue. *EMBO Mol Med.* 8: 232-246.

Alia AT, Hochfeldb WE, Myburghc R, Pepper MS (2013). Adipocyte and adipogenesis. *European Journal of Cell Biology* 92: 229-236.

Almeida A (2012). Regulation of APC/C-Cdh1 and its function in neuronal survival. *Mol. Neurobiol.* 46: 547-554.

Almeida A, Bolaños JP, Moreno S (2005). Cdh1/Hct1-APC is essential for the survival of postmitotic neurons. *J. Neurosci.* 25: 8115-8121.

Altiock S, Xu M, Spiegelman BM (1997). PPAR $\gamma$  induces cell cycle withdrawal: inhibition of E2F/DP DNA-binding activity via down-regulation of PP2A. *Genes Dev.* 11: 1987-1998.

Altshuler-Keylin S, Kajimura S (2017). Mitochondrial homeostasis in adipose tissue remodeling. *Sci.*

*Signal.* 10: eaai9248.

Altshuler-Keylin S, Shinoda K, Hasegawa Y *et al.* (2016). Beige adipocyte maintenance is regulated by autophagy-induced mitochondrial clearance. *Cell Metab.* 24: 402-419.

Álvarez R, de Andrés J, Yubero P, Vifias O, Mampel T, Iglesias R, Giralt M, Villarroya F (1995). A novel regulatory pathway of brown fat thermogenesis. Retinoic acid is a transcriptional activator of the mitochondrial uncoupling protein gene. *J. Biol Chem.* 270: 5666-5673.

Álvarez-Crespo M, Csikasz RI, Martínez-Sánchez N, Diéguez C, Cannon B, Nedergaard J, López M (2016). Essential role of UCP1 modulating the central effects of thyroid hormones on energy balance. *Mol. Metab.* 5: 271-282.

Álvarez, R, Checa ML, Brun S, Vifias O, Mampel T, Iglesias R, Giralt M, Villarroya F (2000). Both retinoic-acid-receptor- and retinoid-X-receptor-dependent signalling pathways mediate the induction of the brown-adipose-tissue-uncoupling-protein-1 gene by retinoids. *Biochem. J.* 345: 91-97.

Álvarez, R, De Andrés J, Yubero P, Vinas O, Mampel T, Iglesias R *et al.* (1995). A novel regulatory pathway of brown fat thermogenesis. Retinoic acid is a transcriptional activator of the mitochondrial uncoupling protein gene. *J. Biol. Chem.* 270: 5666-5673.

Amodio N, Scrima M, Palaia L, Salman AN, Quintiero A, Franco R *et al.* (2010). Oncogenic role of the E3 ubiquitin ligase NEDD4-1, a PTEN negative regulator, in non-small-cell lung carcinomas. *Am. J. Pathol.* 177: 2622-2634.

An Y, Wang G, Diao Y, Long Y *et al.* (2017). A molecular switch regulating cell fate choice between muscle progenitor cells and brown adipocytes. *Dev. Cell.* 41: 382-391.

Anand R, Langer T, Baker MJ (2013). Proteolytic control of mitochondrial function and morphogenesis. *Biochim. Biophys. Acta* 1833: 195-204.

Andrews ZB, Liu ZW, Wallingford N *et al.* (2008). UCP2 mediates ghrelin's action on NPY/AgRP neurons by lowering free radicals. *Nature* 454: 846-851.

Annicotte JS, Blanchet E, Chavey C, Iankova I, Costes S, Assou S *et al.* (2009). The CDK4-pRB-E2F1 pathway controls insulin secretion. *Nat. Cell Biol.* 11: 1017-1023.

Aquila H, Link TA, Klingenberg M (1985). The uncoupling protein from brown fat mitochondria is related to the mitochondrial ADP/ATP carrier. Analysis of sequence homologies and of folding of the protein in the membrane. *EMBO J.* 4: 2369-2376.

Arango NA, Szotek PP, Manganaro TF, Oliva E, Donahoe PK, Teixeira J (2005). Conditional deletion of b-catenin in the mesenchyme of the developing mouse uterus results in a switch to adipogenesis in the myometrium. *Dev. Biol.* 288: 276-283.

Arbeeny CM, Meyers DS, Hillyer DE, Bergquist KE (1995). Metabolic alterations associated with the antidiabetic effect of  $\beta$ 3-adrenergic receptor agonists in obese mice. *Am. J. Physiol.* 268: 678-684.

Arch JR (2002). Beta(3)-adrenoceptor agonists: potential, pitfalls and progress. *Eur. J. Pharmacol.* 440: 99-107.

Arch JR (2008). The discovery of drugs for obesity, the metabolic effects of leptin and variable receptor pharmacology: perspectives from beta3- adrenoceptor agonists. *Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 378: 225-240.

Arch JR (2011). Challenges in b(3)-adrenoceptor agonist drug development. *Ther. Adv. Endocrinol. Metab.* 2: 59-64.

Argyropoulos G, Harper ME (2002). Uncoupling proteins and thermoregulation. *J. Appl. Physiol.* 92:

## ***-Bibliografía-***

2187-2198.

Armoni M, Harel C, Karni S, Chen H, Bar-Yoseph F, Ver MR, Quon MJ, Karnieli E (2006). FOXO1 represses peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$ 1 and - $\gamma$ 2 gene promoters in primary adipocytes. A novel paradigm to increase insulin sensitivity. *J. Biol. Chem.* 281: 19881-19891.

Arner P (1995). Differences in lipolysis between human subcutaneous and omental adipose tissues. *Ann Med.* 27: 435-8.

Arsenijevic D, Onuma H, Pecqueur C *et al.* (2000). Disruption of the uncoupling protein-2 gene in mice reveals a role in immunity and reactive oxygen species production. *Nat. Genet.* 26: 435-439.

Ashrafi G, Schwarz TL (2013). The pathways of mitophagy for quality control and clearance of mitochondria. *Cell Death Differ.* 20: 31-42.

Attwooll C, Lazzarini Denchi E, Helin K (2004). The E2F family: specific functions and overlapping interests. *EMBO J.* 23: 4709-4716.

Aubin D, Gagnon A, Sorisky A (2005). Phosphoinositide 3-kinase is required for human adipocyte differentiation in culture. *Int. J. Obes.* 29: 1006-1009.

Auld CA, Caccia CD, Morrison RF (2007). Hormonal induction of adipogenesis induces Skp2 expression through PI3K and MAPK pathways. *J. Cell Biochem.* 100: 204-216.

Auld CA, Hopkins RG, Fernandes KM, Morrison RF (2006). Novel effect of helenalin on Akt signaling and Skp2 expression in 3T3-L1 preadipocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 346: 314-320.

Auld CA, Morrison RF (2006). Evidence for cytosolic p27(Kip1) ubiquitylation and degradation during adipocyte hyperplasia. *Obesity* 14: 2136-2144.

Ayad NG, Rankin S, Murakami M, Jebanathirajah J, Gygi S, Kirschner MW (2003). Tome-1, a trigger of mitotic entry, is degraded during G1 via the APC. *Cell* 113: 101-113.

Ayala-Summano JT, Vélez-delValle C, Beltrán-Langarica A, Marsch-Moreno M, Hernández-Mosqueira C, Kuri-Harcuch W (2013). Glucocorticoid paradoxically recruits adipose progenitors and impairs lipid homeostasis and glucose transport in mature adipocytes. *Scientific reports* 3: 2573.

Azzu V, Affourtit C, Breen E, Parker N, Brand MD (2008). Dynamic regulation of uncoupling protein 2 content in INS-1E insulinoma cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1777: 1378-1383.

Azzu V, Brand MD (2010). Degradation of an intramitochondrial protein by the cytosolic proteasome. *J. Cell Sci.* 123: 578-585.

Azzu V, Jastroch M, Divakaruni AS, Brand MD (2010). The regulation and turnover of mitochondrial uncoupling proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 1797: 785-791.

Azzu V, Mookerjee SA, Brand MD (2010). Rapid turnover of mitochondrial uncoupling protein 3. *Biochem. J.* 426: 13-17.

Bäck K, Arnqvist HJ (2009). Changes in insulin and IGF-I receptor expression during differentiation of human preadipocytes. *Growth Horm. IGF Res.* 19: 101-111.

Baker JG (2010). The selectivity of  $\beta$ -adrenoceptor agonists at human  $\beta$ 1-,  $\beta$ 2- and  $\beta$ 3-adrenoceptors. *Br. J. Pharmacol.* 160: 1048-1061.

Bakopanos E, Silva JE (2000). Thiazolidinediones inhibit the expression of  $\beta$ 3-adrenergic receptors at a transcriptional level. *Diabetes* 49: 2108-2115.

Bal NC, Maurya SK, Sopariwala DH, Sahoo SK, Gupta SC, Shaikh SA, Pant M, Rowland LA, Bom-

- bardier E, Goonasekera SA *et al.* (2012). Sarcoplipin is a newly identified regulator of muscle-based thermogenesis in mammals. *Nat. Med.* 18: 1575-1579.
- Banks AS, McAllister FE, Camporez JP, Zushin PJ, Jurczak MJ, Laznik-Bogoslavski D, Shulman GI, Gygi SP, Spiegelman BM (2015). An ERK/Cdk5 axis controls the diabetogenic actions of PPAR $\gamma$ . *Nature* 517: 391-395.
- Barak Y, Nelson MC, Ong ES, Jones YZ, Ruiz-Lozano P, Chien KR, Koder A, Evans RM (1999). PPAR gamma is required for placental, cardiac, and adipose tissue development. *Mol. Cell* 4: 585-595.
- Barbatelli G, Murano I, Madsen L, Hao Q, Jiménez M *et al.* (2010). The emergence of cold-induced brown adipocytes in mouse white fat depots is determined predominantly by white to brown adipocyte transdifferentiation. *Am. J. Physiol. Endocr. Metab.* 298: 1244-1253.
- Barbera MJ, Schluter A, Pedraza N, Iglesias R, Villarroya F, Giral M. (2001). Peroxisome proliferator-activated receptor alpha activates transcription of the brown fat uncoupling protein-1 gene. A link between regulation of the thermogenic and lipid oxidation pathways in the brown fat cell. *J. Biol. Chem.* 276: 1486-1493.
- Barford D (2011). Structural insights into anaphase-promoting complex function and mechanism. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 366: 3605-3624.
- Bartelt A, Bruns OT, Reimer R, Hohenberg H, Ilttrich H, Peldschus K, Kaul MG, Tromsdorf UI, Weller H, Waurisch C *et al.* (2011). Brown adipose tissue activity controls triglyceride clearance. *Nat. Med.* 17: 200-205.
- Bartelt A, Heeren J (2012). The holy grail of metabolic disease: brown adipose tissue. *Curr. Opin. Lipidol.* 23: 190-195.
- Barthelme D, Sauer RT (2012). Identification of the Cdc48\*20S proteasome as an ancient AAA+ proteolytic machine. *Science* 337: 843-846.
- Bartness TJ, Ryu V (2015). Neural control of white, beige and brown adipocytes. *Int. J. Obes. Suppl. Relat. Metab. Disord.* 5: 35-39.
- Bartness TJ, Vaughan CH, Song CK (2010). Sympathetic and sensory innervation of brown adipose tissue. *Int. J. Obes.* 34: 36-42.
- Bashir T, Dorrello NV, Amador V, Guardavaccaro D, Pagano M (2004). Control of the SCF(Skp2-Cks1) ubiquitin ligase by the APC/C(Cdh1) ubiquitin ligase. *Nature* 431: 190-193.
- Bassermann F, Frescas D, Guardavaccaro D, Busino L, Peschiaroli A, Pagano M (2008). The Cdc14B-Cdh1-Plk1 axis controls the G2 DNA-damage-response checkpoint. *Cell* 134: 256-267.
- Baudry A, Yang ZZ, Hemmings BA (2006). PKBalpha is required for adipose differentiation of mouse embryonic fibroblasts. *J. Cell Sci.* 119: 889-897.
- Baumann CA, Rusch HP (1939). Effect of diet on tumors induced by ultraviolet light. *Am. J. Cancer* 35: 213-221.
- Becattini B, Marone R, Zani F *et al.* (2011). PI3K $\gamma$  within a nonhematopoietic cell type negatively regulates diet-induced thermogenesis and promotes obesity and insulin resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 108: 854-863.
- Becker EB, Bonni A (2005). Beyond proliferation – cell cycle control of neuronal survival and differentiation in the developing mammalian brain. *Semin. Cell Dev. Biol.* 16: 439-448.
- Behan JW, Yun JP, Proektor MP, Ehsanipour EA, Arutyunyan A, Moses AS *et al.* (2009). Adipocytes

## ***-Bibliografía-***

impair leukemia treatment in mice. *Cancer Res.* 69: 7867-7874.

Bell A, Grunder L, Sorisky A (2000). Rapamycin inhibits human adipocyte differentiation in primary culture. *Obes. Res.* 8: 249-254.

Benmaamar R, Pagano M (2005). Involvement of the SCF complex in the control of Cdh1 degradation in S-phase. *Cell Cycle* 4: 1230-1232.

Bennett CN, Ross SE, Longo KA, Bajnok L, Hemati N, Johnson KW, Harrison SD, MacDougald OA (2002). Regulation of Wnt signaling during adipogenesis. *J. Biol. Chem.* 277: 30998-31004.

Beranger GE, Karbiener M, Barquissau V, Pisani DF, Scheideler M, Langin D, Amri EZ (2013). *In vitro* brown and "brite"/"beige" adipogenesis: human cellular models and molecular aspects. *Biochim. Biophys. Acta* 1831: 905-914.

Berrington de González A, Hartge P, Cerhan JR, Flint AJ, Hannan L, MacInnis RJ, Moore SC, Tobias GS, Anton-Culver H, Freeman LB, *et al.* (2010). Body-mass index and mortality among 1.46 million white adults. *N. Engl. J. Med.* 363: 2211-2219.

Berry DC, Jiang Y, Graff JM (2016). Mouse strains to study cold-inducible beige progenitors and beige adipocyte formation and function. *Nat. Commun.* 7: 10184.

Berry R, Rodeheffer MS (2013). Characterization of the adipocyte cellular lineage *in vivo*. *Nat. Cell Biol.* 15: 302-308.

Bessesen DH, Van Gaal LF (2017). Progress and challenges in anti-obesity pharmacotherapy. *Lancet Diabetes Endocrinol.* pii: S2213-8587(17)30236-X.

Bi P, Shan T, Liu W, Yue F, Yang X, Liang XR, Wang J, Li J, Carlesso N, Liu X, Kuang S (2014). Inhibition of Notch signaling promotes browning of white adipose tissue and ameliorates obesity. *Nat. Med.* 20: 911-918.

Bianco AC, Sheng XY, Silva JE (1988). Triiodothyronine amplifies norepinephrine stimulation of uncoupling protein gene transcription by a mechanism not requiring protein synthesis. *J. Biol. Chem.* 263: 18168-18175.

Bianco AC, Silva JE (1987). Intracellular conversion of thyroxine to triiodothyronine is required for the optimal thermogenic function of brown adipose tissue. *J. Clin. Invest.* 79: 295-300.

Bianco AC, Silva JE (1988). Cold exposure rapidly induces virtual saturation of brown adipose tissue nuclear T3 receptors. *Am. J. Physiol.* 255: 496-503.

Bickel PE, Tansey JT, Welte MA (2009). PAT proteins, an ancient family of lipid droplet proteins that regulate cellular lipid stores. *Biochim. Biophys. Acta* 1791: 419-440.

Binné UK, Classon MK, Dick FA *et al.* (2007). Retinoblastoma protein and anaphase-promoting complex physically interact and functionally cooperate during cell-cycle exit. *Nat. Cell Biol.* 9: 225-232.

Blagosklonny MV, Wu GS, Omura S, el-Deiry WS (1996). Proteasome-dependent regulation of p21WAF1/CIP1 expression. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 227: 564-569.

Blanco-Aparicio C, Renner O, Leal JF, Carnero A (2007). PTEN, more than the AKT pathway. *Carcinogenesis* 28: 1379-1386.

Blanchet E, Annicotte JS, Lagarrigue S, Aguilar V, Clapé C *et al.* (2011). E2F transcription factor-1 regulates oxidative metabolism. *Nat. Cell Biol.* 13:1146-1152.

Blüher M (2010). The distinction of metabolically 'healthy' from 'unhealthy' obese individuals. *Curr. Opin. Lipidol.* 21: 38-43.



- Blüher M, Michael MD, Peroni OD, Ueki K, Carter N, Kahn BB, Kahn CR (2002). Adipose tissue selective insulin receptor knockout protects against obesity and obesity-related glucose intolerance. *Dev. Cell* 3: 25-38.
- Boekhout M, Yuan R, Wondergem AP *et al.* (2016). Feedback regulation between atypical E2Fs and APC/CCdh1 coordinates cell cycle progression. *EMBO Rep.* 17: 414-427.
- Bogna Grygiel-Górniak B (2014). Peroxisome proliferator-activated receptors and their ligands: nutritional and clinical implications – a review. *Nutr J.* 14: 13-17.
- Bonet ML, Mercader J, Palou A (2017). A nutritional perspective on UCP1-dependent thermogenesis. *Biochimie.* 134: 99-117.
- Bonet ML, Oliver P, Palou A (2013). Pharmacological and nutritional agents promoting browning of white adipose tissue. *Biochim Biophys Acta* 1831: 969-985.
- Boon MR, van den Berg SA, Wang Y, van den Bossche J, Karkampouna S, Bauwens M, de Saint-Hubert M, van der Horst G *et al.* (2013). BMP7 activates brown adipose tissue and reduces diet-induced obesity only at subthermoneutrality. *PLoS ONE* 8: e74083.
- Bordicchia M, Liu D, Amri EZ, Ailhaud G, Dessi-Fulgheri P, Zhang C, Takahashi N, Sarzani R, Collins S (2012). Cardiac natriuretic peptides act via p38 MAPK to induce the brown fat thermogenic program in mouse and human adipocytes. *J. Clin. Invest.* 122: 1022-1036.
- Borga M, Virtanen KA, Romu T, Leinhard OD, Persson A, Nuutila P *et al.* (2014). Brown adipose tissue in humans: detection and functional analysis using PET (positron emission tomography), MRI (magnetic resonance imaging), and DECT (dual energy computed tomography). *Meth. Enzymol.* 537: 141-159.
- Boss O, Hagen T, Lowell BB (2000). Uncoupling proteins 2 and 3: potential regulators of mitochondrial energy metabolism. *Diabetes* 49: 143-156.
- Boss O, Samec S, Paoloni-Giacobino A, Rossier C *et al.* (1997). Uncoupling protein-3: a new member of the mitochondrial carrier family with tissue-specific expression. *FEBS Lett.* 408: 39-42.
- Boström P, Wu J, Jedrychowski MP, Korde A, Ye L *et al.* (2012). A PGC1- $\alpha$ -dependent myokine that drives brown-fat-like development of white fat and thermogenesis. *Nature* 481: 463-468.
- Boucher J, Macotela Y, Bezy O, Mori MA, Kriaciunas K, Kahn CR (2010). A kinase-independent role for unoccupied insulin and IGF-1 receptors in the control of apoptosis. *Sci. Signal.* 3: ra87.
- Boucher J, Mori MA, Lee KY *et al.* (2012). Impaired thermogenesis and adipose tissue development in mice with fat-specific disruption of insulin and IGF-1 signalling. *Nat Commun.* 3: 902-921.
- Boucher J, Softic S, El Ouaamari A, Krumpoch MT *et al.* (2016). Differential roles of insulin and IGF-1 receptors in adipose tissue development and function. *Diabetes* 65: 2201-2213.
- Bouillaud F, Ricquier D, Mory G, Thibault J (1984). Increased level of mRNA for the uncoupling protein in brown adipose tissue of rats during thermogenesis induced by cold exposure or norepinephrine infusion. *J. Biol. Chem.* 259: 11583-11586.
- Bragoszewski P, Gornicka A, Sztolszterer ME, Chacinska A (2013). The ubiquitin-proteasome system regulates mitochondrial intermembrane space proteins. *Mol. Cell Biol.* 33: 2136-2148.
- Brand MD, Affourtit C, Esteves TC, Green K, Lambert AJ, Miwa S, Pakay JL, Parker N (2004). Mitochondrial superoxide: production, biological effects, and activation of uncoupling proteins. *Free Radic Biol. Med.* 37: 755-767.
- Brand MD, Brindle KM, Buckingham JA, Harper JA, Rolfe DF, Stuart JA (1999). The significance and

## ***-Bibliografía-***

- mechanism of mitochondrial proton conductance. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* 23: 4-11.
- Brand MD, Esteves TC (2005). Physiological functions of the mitochondrial uncoupling proteins UCP2 and UCP3. *Cell Metab.* 2: 85-93.
- Brasaemle DL (2007). Thematic review series: adipocyte biology. The perilipin family of structural lipid droplet proteins: stabilization of lipid droplets and control of lipolysis. *J. Lipid Res.* 48: 2547-2559.
- Brasaemle DL, Barber T, Wolins NE, Serrero G, Blanchette-Mackie EJ, Londos C (1997). Adipose differentiation-related protein is an ubiquitously expressed lipid storage droplet-associated protein. *J. Lipid Res.* 38: 2249-2263.
- Brasaemle DL, Dolios G, Shapiro L, Wang R (2004). Proteomic analysis of proteins associated with lipid droplets of basal and lipolytically stimulated 3T3-L1 adipocytes. *J. Biol. Chem.* 279: 46835-46842.
- Bray GA, Jablonski KA, Fujimoto WY *et al.* (2008). Relation of central adiposity and body mass index to the development of diabetes in the Diabetes Prevention Program. *Am. J. Clin. Nutr.* 87: 1212-1218.
- Brennan CM, Breen EP, Porter RK (2006). Cold acclimation and oxygen consumption in the thymus. *Biochim. Biophys. Acta* 1757: 1463-1468.
- Brent GA (1994). The molecular basis of thyroid hormone action. *N. Engl. J. Med.* 331: 847-853.
- Brito MB, Goulielmaki E, Papakonstanti EA (2015). Focus on PTEN regulation. *Front. Oncol.* 5: 166.
- Broeders E, Bouvy ND, van Marken Lichtenbelt WD (2014). Endogenous ways to stimulate brown adipose tissue in humans. *Ann. Med.* 47: 123-132.
- Brown NG, Watson ER, Weissmann F *et al.* (2014). Mechanism of polyubiquitination by human anaphase-promoting complex: RING repurposing for ubiquitin chain assembly. *Mol. Cell.* 56: 246-260.
- Bryzgalova G, Effendic S, Khan A, Rehnmark S, Barbounis P, Boulet J, Dong G, Singh R, Shapses S, Malm J, Webb P, Baxter JD, Grover GJ (2008). Anti-obesity, anti-diabetic, and lipid lowering effects of the thyroid receptor beta subtype selective agonist KB-141. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 111: 262-267.
- Bukowiecki LJ, Géloën A, Collet AJ (1986). Proliferation and differentiation of brown adipocytes from interstitial cells during cold acclimation. *Am. J. Physiol.* 250: 880-887.
- Burton JL, Tsakraklides V, Solomon MJ (2005). Assembly of an APC-Cdh1-substrate complex is stimulated by engagement of a destruction box. *Mol. Cell* 18: 533-542.
- Busiello RA, Savarese S, Lombardi A (2015). Mitochondrial uncoupling proteins and energy metabolism. *Front Physiol.* 6: 36.
- Cai L, Lubitz J, Flegal KM, Pamuk ER (2010). The predicted effects of chronic obesity in middle age on medicare costs and mortality. *Med. Care* 48: 510-517.
- Calo E, Quintero-Estades JA, Danielian PS, Nedelcu S, Berman SD, Lees JA (2010). Rb regulates fate choice and lineage commitment *in vivo*. *Nature* 466: 1110-1114.
- Calle EE, Kaaks R (2004). Overweight, obesity and cancer: epidemiological evidence and proposed mechanisms. *Nat. Rev. Cancer* 4: 579-591.
- Cannon B, Nedergaard J (2004). Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol. Rev.* 84: 277-359.
- Cannon B, Nedergaard J (2009). Thermogenesis challenges the adipostat hypothesis for body-weight

control. *Proc. Nutr. Soc.* 68: 401-407.

Cannon B, Nedergaard J (2011). Nonshivering thermogenesis and its adequate measurement in metabolic studies. *J. Exp. Biol.* 214: 242-253.

Canoy D, Boekholdt SM, Wareham N *et al.* (2007). Body fat distribution and risk of coronary heart disease in men and women in the European Prospective Investigation Into Cancer and Nutrition in Norfolk cohort: a population-based prospective study. *Circulation* 116: 2933-2943.

Canto C, Gerhart-Hines Z, Feige JN, Lagouge M, Noriega L, Milne JC, Elliott PJ, Puigserver P, Auwerx J (2009). AMPK regulates energy expenditure by modulating NAD<sup>+</sup> metabolism and SIRT1 activity. *Nature* 458: 1056-1060.

Cao L, Choi EY, Liu X, Martin A, Wang C, Xu X, During MJ (2011). White to brown fat phenotypic switch induced by genetic and environmental activation of a hypothalamic-adipocyte axis. *Cell Metab.* 14: 324-338.

Cao W, Daniel KW, Robidoux J, Puigserver P, Medvedev AV *et al.* (2004). p38 mitogen-activated protein kinase is the central regulator of cyclic AMP-dependent transcription of the brown fat uncoupling protein 1 gene. *Mol. Cell. Biol.* 24: 3057-3067.

Cao W, Medvedev AV, Daniel KW, Collins S (2001).  $\beta$ -adrenergic activation of p38 MAP kinase in adipocytes: cAMP induction of the uncoupling protein 1 (UCP1) gene requires p38 MAP kinase. *J. Biol. Chem.* 276: 27077-27082.

Cao Z, Umek RM, McKnight SL (1991). Regulated expression of three C/EBP isoforms during adipose conversion of 3T3-L1 cells. *Genes Dev.* 5: 1538-1552.

Capasso S, Alessio N, Di Bernardo G, Cipollaro M, Melone MAB, Peluso G, Giordano A, Galderisi U (2014). Silencing of RB1 and RB2/P130 during adipogenesis of bone marrow stromal cells results in dysregulated differentiation. *Cell Cycle* 13: 482-490.

Cappell SD, Chung M, Jaimovich A, Spencer SL, Meyer T (2016). Irreversible APC(Cdh1) inactivation underlies the point of no return for cell-cycle entry. *Cell* 166: 167-180.

Carey AL, Formosa MF, Van Every B, Bertovic D, Eikelis N, Lambert GW, Kalff V, Duffy SJ, Cherk MH, Kingwell BA (2013). Ephedrine activates brown adipose tissue in lean but not obese humans. *Diabetologia* 56: 147-155.

Carrano AC, Eytan E, Hershko A, Pagano M (1999). SKP2 is required for ubiquitin-mediated degradation of the CDK inhibitor p27. *Nat. Cell Biol.* 1:193-199.

Carrière A, Jeanson Y, Berger-Müller S *et al.* (2014). Browning of white adipose cells by intermediate metabolites: an adaptive mechanism to alleviate redox pressure. *Diabetes* 63: 3253-3265.

Carroll AM, Haines LR, Pearson TW, Brennan CM, Breen EP, Porter RK (2004). Immunodetection of UCP 1 in rat thymus. *Biochem. Soc. Trans.* 32: 1066-1067.

Carroll AM, Haines LR, Pearson TW, Fallon P, Walsh C, Brennan CM, Breen EP, Porter RK (2005). Detection of a functioning UCP 1 in thymus. *J. Biol. Chem.* 280: 15534-15543.

Carroll M, Porter RK, Morrice NA (2008). Identification of serine phosphorylation in mitochondrial uncoupling protein 1. *Biochim. Biophys. Acta* 1777: 1060-1065.

Caspar-Bauguil S, Cousin B, Bour S, Casteilla L, Penicaud L, Carpené C (2009). Adipose tissue lymphocytes: types and roles. *J. Physiol. Biochem.* 65: 423-436.

Cassard-Doulier AM, Gelly C, Fox N, Schrementi J, Raimbault S, Klaus S, Forest C, Bouillaud F, Ri-

## ***-Bibliografía-***

cquier D (1993). Tissue-specific and beta-adrenergic regulation of the mitochondrial uncoupling protein gene: control by cis-acting elements in the 5'-flanking region. *Mol. Endocrinol.* 7: 497-506.

Cassard-Doulier AM, Larose M, Matamala JC, Champigny O, Bouillaud F, Ricquier D (1994). *In vitro* interactions between nuclear proteins and uncoupling protein gene promoter reveal several putative transactivating factors including Ets1, retinoid X receptor, thyroid hormone receptor, and a CACCC box-binding protein. *J. Biol. Chem.* 269: 24335-24342.

Castro A, Bernis C, Vigneron S, Labbé JC, Lorca T (2005). The anaphase-promoting complex: a key factor in the regulation of cell cycle. *Oncogene* 24: 314-325.

Cawthorn WP, Scheller EL, MacDougald OA (2012). Adipose tissue stem cells meet preadipocyte commitment: going back to the future. *J. Lipid Res.* 53: 227-246.

Cawthorne MA, Sennitt MV, Arch JR, Smith SA (1992). BRL 35135, a potent and selective atypical beta-adrenoceptor agonist. *Am. J. Clin. Nutr.* 55: 252-257.

Cederberg A, Gronning LM, Ahren B, Tasken K, Carlsson P, Enerback S (2001). FOXC2 is a winged helix gene that counteracts obesity, hypertriglyceridemia, and diet-induced insulin resistance. *Cell* 106: 563-573.

Celi FS, Le TN, Ni B (2015). Physiology and relevance of human adaptive thermogenesis response. *Trends Endocrinol. Metab.* 26: 238-47.

Cesari R, Martin ES, Calin GA *et al.* (2003). Parkin, a gene implicated in autosomal recessive juvenile parkinsonism, is a candidate tumor suppressor gene on chromosome 6q25-q27. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100: 5956-5961.

Ciechanover A (1998). The ubiquitin-proteasome pathway: on protein death and cell life. *EMBO J.* 17: 7151-7160.

Cinti S (2005). The adipose organ. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 73: 9-15.

Cinti S (2012). The adipose organ at a glance. *Dis. Model Mech.* 5 :588-594.

Cinti S (2017). UCP1 protein: the molecular hub of adipose organ plasticity. *Biochimie.* 134: 71-76.

Cioffi F, Senese R, de Lange P, Goglia F, Lanni A, Lombardi A (2009). Uncoupling proteins: a complex journey to function discovery. *Biofactors* 35: 417-428.

Clapham JC, Arch JR (2007). Thermogenic and metabolic antiobesity drugs: rationale and opportunities. *Diabetes Obes. Metab.* 9: 259-275.

Clarke KJ, Adams AE, Manzke LH, Pearson TW *et al.* (2012). A role for ubiquitylation and the cytosolic proteasome in turnover of mitochondrial uncoupling protein 1 (UCP1). *Biochim. Biophys. Acta.* 1817: 1759-1767.

Classon M, Kennedy BK, Mulloy R, Harlow E (2000). Opposing roles of pRB and p107 in adipocyte differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 10826-10831.

Clijsters L, Ogink J, Wolthuis R (2013). The spindle checkpoint, APC/C-Cdc20, and APC/C-Cdh1 play distinct roles in connecting mitosis to S phase. *J. Cell Biol.* 201: 1013-1026.

Cline GW, Vidal Puig AJ, Dufour S, Cadman KS, Lowell BB, Shulman GI (2001). *In vivo* effects of uncoupling protein-3 gene disruption on mitochondrial energy metabolism. *J. Biol. Chem.* 276: 20240-20244.

Clouthier DE, Comerford SA, Hammer RE (1997). Hepatic fibrosis, glomerulosclerosis, and a lipodys-

- trophy-like syndrome in PEPCK-TGF- $\beta$ 1 transgenic mice. *J. Clin. Invest.* 100: 2697-2713.
- Cohen P, Levy JD, Zhang Y, Frontini A, Kolodin DP, Svensson KJ, Lo JC, Zeng X, Ye L, Khandekar MJ *et al.* (2014). Ablation of PRDM16 and beige adipose causes metabolic dysfunction and a subcutaneous to visceral fat switch. *Cell* 156: 304-316.
- Cole KA, Harmon AW, Harp JB, Patel YM (2004). Rb regulates C/EBP $\beta$ -DNA-binding activity during 3T3-L1 adipogenesis. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 286: 349-354.
- Colman E (2007). Dinitrophenol and obesity: an early twentieth-century regulatory dilemma. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 48: 115-117.
- Colombo SL, Palacios-Callender M, Frakich N *et al.* (2011). Molecular basis for the differential use of glucose and glutamine in cell proliferation as revealed by synchronized HeLa cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 108: 21069-21074.
- Collins S (2012).  $\beta$ -adrenoceptor signaling networks in adipocytes for recruiting stored fat and energy expenditure. *Front. Endocrinol.* 2: 102.
- Collins S, Cao W, Robidoux J (2004). Learning new tricks from old dogs: beta-adrenergic receptors teach new lessons on firing up adipose tissue metabolism. *Mol. Endocrinol.* 18: 2123-2131.
- Collins S, Surwit RS (2001). The  $\beta$ -adrenergic receptors and the control of adipose tissue metabolism and thermogenesis. *Recent Prog. Horm. Res.* 56: 309-328.
- Conaway RC, Brower CS, Conaway JW (2002). Emerging roles of ubiquitin in transcription regulation. *Science* 296: 1254-1258.
- Constant VA, Gagnon A, Landry A *et al.* (2006). Macrophage conditioned medium inhibits the differentiation of 3T3-L1 and human abdominal preadipocytes. *Diabetologia* 49: 1402-1411.
- Contreras C, González F, Fernø J, Diéguez C, Rahmouni K, Nogueiras R, López M (2015). The brain and brown fat. *Ann. Med.* 47: 150-168.
- Cooke D, Bloom S (2006). The obesity pipeline: current strategies in the development of anti-obesity drugs. *Nat. Rev. Drug Discov.* 5: 919-931.
- Cooke PS, Holsberger DR, Cimafranca MA *et al.* (2007). The F box protein S phase kinase-associated protein 2 regulates adipose mass and adipocyte number *in vivo*. *Obesity* 15: 1400-1408.
- Cornelius P, MacDougald OA, Lane MD (1994). Regulation of adipocyte development. *Annu. Rev. Nutr.* 14: 99-129.
- Cornu M, Albert V, Hall MN (2013). mTOR in aging, metabolism, and cancer. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 23: 53-62.
- Coskun T, Bina HA, Schneider MA, Dunbar JD, Hu CC, Chen Y, Moller DE, Kharitonov A (2008). Fibroblast growth factor 21 corrects obesity in mice. *Endocrinology* 149: 6018-6027.
- Costford SR, Chaudhry SN, Crawford SA, Salkhordeh M, Harper ME (2008). Long-term high-fat feeding induces greater fat storage in mice lacking UCP3. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 295: 1018-1024.
- Costford SR, Chaudhry SN, Salkhordeh M, Harper ME (2006). Effects of the presence, absence, and overexpression of uncoupling protein-3 on adiposity and fuel metabolism in congenic mice. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 290: 1304-1312.
- Coulter AA, Bearden CM, Liu X, Koza RA, Kozak LP (2003). Dietary fat interacts with QTLs controlling induction of Pgc-1 $\alpha$  and Ucp1 during conversion of white to brown fat. *Physiol. Genomics* 14: 139-147.

## ***-Bibliografía-***

Cousin B, Cinti S, Morroni M, Raimbault S, Ricquier D, Pénicaud L, Casteilla L (1992). Occurrence of brown adipocytes in rat white adipose tissue: molecular and morphological characterization. *J. Cell Sci.* 103: 931-942.

Craney A, Rape M (2013). Dynamic regulation of ubiquitin-dependent cell cycle control. *Curr. Opin. Cell Biol.* 25: 704-710.

Crasta K, Lim HH, Giddings TH Jr., Winey M, Surana U (2008). Inactivation of Cdh1 by synergistic action of Cdk1 and polo kinase is necessary for proper assembly of the mitotic spindle. *Nat. Cell Biol.* 10: 665-675.

Crichton PG, Lee Y, Kunji ERS (2017). The molecular features of uncoupling protein 1 support a conventional mitochondrial carrier-like mechanism. *Biochimie* 134: 35-50.

Cristancho AG, Lazar MA (2011). Forming functional fat: a growing understanding of adipocyte differentiation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 12: 722-734.

Cuende J, Moreno S, Bolaños JP, Almeida A (2008). Retinoic acid downregulates Rae1 leading to APC(Cdh1) activation and neuroblastoma SH-SY5Y differentiation. *Oncogene* 27: 3339-3344.

Cunningham JT, Rodgers JT, Arlow DH, Vázquez F, Mootha VK, Puigserver P (2007). mTOR controls mitochondrial oxidative function through a YY1-PGC-1 $\alpha$  transcriptional complex. *Nature* 450: 736-740.

Cybulski N, Polak P, Auwerx J, Rüegg MA, Hall MN (2009). mTOR complex 2 in adipose tissue negatively controls whole-body growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106: 9902-9907.

Cypess AM, Chen YC, Sze C, Wang K, English J, Chan O, Holman AR, Tal I, Palmer MR, Kolodny GM, Kahn CR (2012). Cold but not sympathomimetics activates human brown adipose tissue *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 109: 10001-10005.

Cypess AM, Kahn CR (2010). Brown fat as a therapy for obesity and diabetes. *Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes Obes.* 17: 143-149.

Cypess AM, Lehman S, Williams G, Tal I, Rodman D, Goldfine AB, Kuo FC, Palmer EL, Tseng YH, Doria A *et al.* (2009). Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans. *N. Engl. J. Med.* 360: 1509-1517.

Cypess AM, Weiner LS, Roberts-Toler C *et al.* (2015). Activation of human brown adipose tissue by a  $\beta_3$ -adrenergic receptor agonist. *Cell Metab.* 21: 33-38.

Cypess AM, White AP, Vernochet C, Schulz TJ, Xue R, Sass CA, Huang TL, Roberts-Toler C, Weiner LS, Sze C *et al.* (2013). Anatomical localization, gene expression profiling and functional characterization of adult human neck brown fat. *Nat. Med.* 19: 635-639.

Cypess AM, Zhang H, Schulz TJ *et al.* (2011). Insulin/IGF-I regulation of necdin and brown adipocyte differentiation via CREB- and FoxO1- associated pathways. *Endocrinology* 152: 3680-3689.

Chaggar PS, Shaw SM, Williams SG (2009). Thiazolidinediones and heart failure. *Diabetes Vasc. Dis. Re.* 6: 146-152.

Chalhoub N, Baker SJ (2009). PTEN and the PI3-kinase pathway in cancer. *Annu. Rev. Pathol.* 4: 127-150.

Chan CB, De Leo D, Joseph JW *et al.* (2001). Increased uncoupling protein-2 levels in beta-cells are associated with impaired glucose-stimulated insulin secretion: mechanism of action. *Diabetes* 50: 1302-1310.

- Chan CB, MacDonald PE, Saleh MC *et al.* (1999). Overexpression of uncoupling protein 2 inhibits glucose-stimulated insulin secretion from rat islets. *Diabetes* 48: 1482-1486.
- Chan NC, Salazar AM, Pham AH, Sweredoski MJ, Kolawa NJ, Graham RL, Hess S, Chan DC (2011). Broad activation of the ubiquitin-proteasome system by Parkin is critical for mitophagy. *Hum. Mol. Genet.* 20: 1726-1737.
- Chang HY, Levasseur M, Jones KT (2004). Degradation of APCcdc20 and APCcdh1 substrates during the second meiotic division in mouse eggs. *J. Cell Sci.* 117: 6289-6296.
- Chang L, Barford D (2014). Insights into the anaphase-promoting complex: a molecular machine that regulates mitosis. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 29: 1-9.
- Chang L, Zhang Z, Yang J, McLaughlin SH, Barford D (2014). Molecular architecture and mechanism of the anaphase-promoting complex. *Nature* 513: 388-393.
- Chang L, Zhang Z, Yang J, McLaughlin SH, Barford D (2015). Atomic structure of the APC/C and its mechanism of protein ubiquitination. *Nature* 522: 450-454.
- Chavey C, Lagarrigue S, Annicotte JS, Fajas L (2013). Emerging roles of cell cycle regulators in adipocyte metabolism. In: Bastard JP, Fève B (Eds.) *Physiology and Physiopathology of Adipose Tissue*. Springer, chapter 3: 17-25.
- Cechi K, Carpentier AC, Richard D (2013). Understanding the brown adipocyte as a contributor to energy homeostasis. *Trends Endocrinol. Metab.* 24: 408-420.
- Cechi K, Nedergaard J, Richard D (2014). Brown adipose tissue as an anti-obesity tissue in humans. *Obes. Rev.* 15: 92-106.
- Chen H, Chan DC (2009). Mitochondrial dynamics- fusion, fission, movement, and mitophagy- in neurodegenerative diseases. *Hum. Mol. Genet.* 18: 169-176.
- Chen PL, Riley DJ, Chen Y, Lee WH (1996). Retinoblastoma protein positively regulates terminal adipocyte differentiation through direct interaction with C/EBPs. *Genes Dev.* 10: 2794-2804.
- Chen PL, Riley DJ, Chen Y, Lee WH (1996). Retinoblastoma protein directly interacts with and activates the transcription factor NF-IL6. *Genes Dev.* 10: 2794-2804.
- Cheng W, Zhu Z, Jin X, Chen L, Zhuang H, Li F (2012). Intense FDG activity in the brown adipose tissue in omental and mesenteric regions in a patient with malignant pheochromocytoma. *Clin. Nucl. Med.* 37: 514-515.
- Chi J, Cohen P (2016). The multifaceted roles of PRDM16: adipose biology and beyond. *Trends Endocrinol. Metab.* 27: 11-23.
- Cho HJ, Park J, Lee HW, Lee YS, Kim JB (2004). Regulation of adipocyte differentiation and insulin action with rapamycin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 321: 942-948.
- Choi BH, Pagano M, Huang C, Dai W (2014). Cdh1, a substrate-recruiting component of anaphase-promoting complex/cyclosome (APC/C) ubiquitin E3 ligase, specifically interacts with phosphatase and tensin homolog (PTEN) and promotes its removal from chromatin. *J. Biol. Chem.* 289: 17951-17959.
- Choi JH, Banks AS, Estall JL *et al.* (2010). Obesity-linked phosphorylation of PPAR $\gamma$  by cdk5 is a direct target of the anti-diabetic PPAR $\gamma$  ligands. *Nature* 466: 451-456.
- Choi JH, Banks AS, Estall JL, Kajimura S, Boström P, Laznik D, Ruas JL, Chalmers MJ, Kamenecka TM, Blüher M *et al.* (2010). Anti-diabetic drugs inhibit obesity-linked phosphorylation of PPAR $\gamma$  by Cdk5. *Nature* 466: 451-456.

## ***-Bibliografía-***

Choi JH, Banks AS, Kamenecka TM, Busby SA, Chalmers MJ, Kumar N, Kuruvilla DS, Shin Y, He Y, JBruning JB, Marciano DP, Cameron MD, Laznik D, Jurczak MJ, Schurer SC, Vidovic D, Shulman GI, Spiegelman BM, Griffin PR (2011). Antidiabetic actions of a non-agonist PPAR $\gamma$  ligand blocking Cdk5-mediated phosphorylation. *Nature* 477: 477-481.

Choi KO, Ghaddar B, Moya C, Shi H, Sridharan GV, Lee K, Jayarama A (2014). Analysis of transcription factor network underlying 3T3-L1 adipocyte differentiation. *PLoS ONE* 9: e100177.

Chondronikola M, Volpi E, Børsheim E, Porter C, Annamalai P, Enerbäck S, Lidell ME, Saraf MK, Labbe SM, Hurren NM, Yfanti C, Chao T, Andersen CR, Cesani F, Hawkins H, Sidossis LS (2014). Brown adipose tissue improves whole body glucose homeostasis and insulin sensitivity in humans. *Diabetes* 63: 4089-4099.

Chouchani ET, Kazak L, Jedrychowski MP *et al.* (2016). Mitochondrial ROS regulate thermogenic energy expenditure and sulfenylation of UCP1. *Nature* 532: 112-116.

Choy L, Derynck R (2003). Transforming growth factor- $\beta$  inhibits adipocyte differentiation by Smad3 interacting with CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP) and repressing C/EBP transactivation function. *J. Biol. Chem.* 278: 9609-9619.

Choy L, Skillington J, Derynck R (2000). Roles of autocrine TGF- $\beta$  receptor and Smad signaling in adipocyte differentiation. *J. Cell Biol.* 149: 667-682.

Christodoulides C, Lagathu C, Sethi JK, Vidal-Puig A (2009). Adipogenesis and WNT signalling. *Trends Endocrinol. Metab.* 20: 16-24.

Christoffolete MA, Linardi CC, De Jesús L, Eбина KN, Carvalho SD, Ribeiro MO *et al.* (2004). Mice with targeted disruption of the Dio2 gene have cold-induced overexpression of the uncoupling protein 1 gene but fail to increase brown adipose tissue lipogenesis and adaptive thermogenesis. *Diabetes* 53: 577-584.

Chu DT, Gawronska-Kozak B (2017). Brown and brite adipocytes: same function, but different origin and response. *Biochimie.* 138: 102-105.

Chu DT, Tao Y (2017). Human thermogenic adipocytes: a reflection on types of adipocyte, developmental origin, and potential application. *J. Physiol. Biochem.* 73: 1-4.

Dali-Youcef N, Matakı C, Coste A, Messaddeq N, Giroud S, Blanc S, Koehl C, Champy MF, Chambon P, Fajas L, Metzger D, Schoonjans K, Auwerx J (2007). Adipose tissue-specific inactivation of the retinoblastoma protein protects against diabetes because of increased energy expenditure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104: 10703-10708.

Daneschvar HL, Aronson MD, Smetana GW (2016). FDA-approved anti-obesity drugs in the United States. *Am. J. Med.* 129: 879.e1-6.

Dansinger ML, Gleason JA, Griffith JL, Selker HP, Schaefer EJ (2005). Comparison of the Atkins, Ornish, Weight Watchers, and Zone diets for weight loss and heart disease reduction: a randomised trial. *JAMA* 293: 43-53.

Darlington GJ, Ross SE, MacDougald OA (1998). The role of C/EBP genes in adipocyte differentiation. *J. Biol. Chem.* 273: 30057-30060.

Darville MI, Antoine IV, Mertens-Strijthagen JR, Dupriez VJ, Rousseau GG (1995). An E2F-dependent late-serum-response promoter in a gene that controls glycolysis. *Oncogene* 11: 1509-1517.

Davis KE, Moldes M, Farmer SR (2004). The forkhead transcription factor FoxC2 inhibits white adipocyte differentiation. *J. Biol. Chem.* 279: 42453-42461.



- de Almeida Brondani L, de Souza BM, Assmann TS *et al.* (2014). Association of the UCP polymorphisms with susceptibility to obesity: case-control study and meta-analysis. *Mol. Biol. Rep.* 41: 5053-5067.
- de Groot RP, Ballou LM, Sassone-Corsi P (1994). Positive regulation of the cAMP-responsive activator CREM by the p70 S6 kinase: an alternative route to mitogen-induced gene expression. *Cell* 79: 81-91.
- de Jesús LA, Carvalho SD, Ribeiro MO, Schneider M, Kim SW, Harney JW, Larsen PR, Bianco AC (2001). The type 2 iodothyronine deiodinase is essential for adaptive thermogenesis in brown adipose tissue. *J. Clin. Invest.* 108: 1379-1385.
- de Jong JM, Larsson O, Cannon B, Nedergaard J (2015). A stringent validation of mouse adipose tissue identity markers. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 308: 1085-1105.
- de Jong JMA, Wouters RTF, Boulet N, Cannon B, Nedergaard J, Petrovic N (2017). The  $\beta$ 3-adrenergic receptor is dispensable for browning of adipose tissues. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 312: 508-518.
- DeClerck YA (2016). Fat, calories, and cancer. *Cancer Res.* 76: 509-510.
- Delgado-Esteban M, García-Higuera I, Maestre C, Moreno S, Almeida A (2013). APC/C-Cdh1 coordinates neurogenesis and cortical size during development. *Nat. Commun.* 4: 2879.
- Dempersmier J, Sambeat A, Gulyaeva O, Paul SM, Hudak CS *et al.* (2015). Cold-inducible Zfp516 activates UCP1 transcription to promote browning of white fat and development of brown fat. *Mol. Cell* 57: 235-246.
- Denechaud PD, López-Mejía IC, Giral A, Lai Q, Blanchet E, Delacuisine B, Nicolay BN, Dyson NJ, Bonner C, Pattou F, Annicotte JS, Fajas L (2016). E2F1 mediates sustained lipogenesis and contributes to hepatic steatosis. *J. Clin. Invest.* 126: 137-150.
- Deng Y, Scherer PE (2010). Adipokines as novel biomarkers and regulators of the metabolic syndrome. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1212: 1-19.
- Deshaies RJ, Joazeiro CA (2009). RING domain E3 ubiquitin ligases. *Annu. Rev. Biochem.* 78: 399-434.
- Després JP (2006). Is visceral obesity the cause of the metabolic syndrome? *Ann. Med.* 38: 52-63.
- Després JP, Moorjani S, Lupien PJ, Tremblay A, Nadeau A, Bouchard C (1990). Regional distribution of body fat, plasma lipoproteins, and cardiovascular disease. *Arteriosclerosis* 10: 497-511.
- Díaz MB, Herzig S, Vegiopoulos A (2014). Thermogenic adipocytes: from cells to physiology and medicine. *Metabolism* 63: 1238-1249.
- Dimova DK, Dyson NJ (2005). The E2F transcriptional network: old acquaintances with new faces. *Oncogene* 24: 2810-2826.
- Divakaruni AS, Brand MD (2011). The regulation and physiology of mitochondrial proton leak. *Physiology* 26: 192-205.
- Dixon JB, Zimmet P, Alberti KG, Rubino F (2011). Bariatric surgery: an IDF statement for obese type 2 diabetes. *Surg. Obes. Relat. Dis.* 7: 433-447.
- Dodd GT, Decherf S, Loh K, Simonds SE, Wiede F, Balland E, Merry TL, Münzberg H, Zhang ZY, Kahn BB, Neel BG, Bence KK, Andrews ZB, Cowley MA, Tiganis T (2015). Leptin and insulin act on POMC neurons to promote the browning of white fat. *Cell* 160: 88-104.
- Dong JQ, Rossulek M, Somayaji VR, Baltrukonis D, Liang Y, Hudson K *et al.* (2015). Pharmacokinetics

## ***-Bibliografía-***

and pharmacodynamics of PF-05231023, a novel long-acting FGF21 mimetic, in a first-in-human study. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 80: 1051-1063.

Donzelli M, Squatrito M, Ganoth Dvora, Hershko A, Pagano M, Draetta GF (2002). Dual mode of degradation of Cdc25A phosphatase. *EMBO J.* 21: 4875-4884.

Dowell P, Otto TC, Adi S, Lane MD (2003). Convergence of peroxisome proliferator-activated receptor gamma and Foxo1 signaling pathways. *J. Biol. Chem.* 278: 45485-45491.

Düvel K, Yecies JL, Menon S, Raman P, Lipovsky AI *et al.* (2010). Activation of a metabolic gene regulatory network downstream of mTOR complex 1. *Mol. Cell* 39: 171-183.

Dyson NJ (1998). The regulation of E2F by pRB-family proteins. *Genes Dev.* 12: 2245-2262.

Echtay KS (2007). Mitochondrial uncoupling proteins. What is their physiological role? *Free Radic. Biol. Med.* 43: 1351-1371.

Echtay KS, Roussel D, St-Pierre J, Jekabsons MB *et al.* (2002). Superoxide activates mitochondrial uncoupling proteins. *Nature* 415: 96-99.

Eguchi J, Wang X, Yu S *et al.* (2011). Transcriptional control of adipose lipid handling by IRF4. *Cell Metab.* 13: 249-259.

Eguren M, Manchado E, Malumbres M (2011). Non-mitotic functions of the anaphase-promoting complex. *Semin. Cell Dev. Biol.* 22: 572-578.

Eguren M, Porlan E, Manchado E, García-Higuera I, Cañamero M, Fariñas I, Malumbres M (2013). The APC/C cofactor Cdh1 prevents replicative stress and p53-dependent cell death in neural progenitors. *Nat. Commun.* 4: 2880.

El-Chaâr D, Gagnon A, Sorisky A (2004). Inhibition of insulin signaling and adipogenesis by rapamycin: effect on phosphorylation of p70 S6 kinase vs eIF4E-BP1. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* 28: 191-198.

el-Deiry WS, Tokino T, Velculescu VE, Levy DB, Parsons R, Trent JM, Lin D, Mercer WE, Kinzler KW, Vogelstein B (1993). WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* 75: 817-825.

Elks ML, Manganiello VC (1985). Antilipolytic action of insulin: role of cAMP phosphodiesterase activation. *Endocrinology* 116: 2119-2121.

Ellis JM, Li LO, Wu PC, Koves TR, Ilkayeva O, Stevens RD, Watkins SM, Muoio DM, Coleman RA (2010). Adipose acyl-CoA synthetase-1 directs fatty acids toward beta-oxidation and is required for cold thermogenesis. *Cell Metab.* 12: 53-64.

Emmett MJ, Lim HW, Jager J, Richter HJ, Adlanmerini M, Peed LC, Briggs ER, Steger DJ, Ma T, Sims CA, Baur JA, Pei L, Won KJ, Seale P, Gerhart-hines Z, Lazar MA (2017). Histone deacetylase 3 prepares brown adipose tissue for acute thermogenic challenge. *Nature* 546: 544-548.

Enerbäck S, Jacobsson A, Simpson EM, Guerra C, Yamashita H, Harper ME, Kozak LP (1997). Mice lacking mitochondrial uncoupling protein are cold-sensitive but not obese. *Nature* 387: 90-94.

Engelbert D, Schnerch D, Baumgarten A, Wäsch R (2008). The ubiquitin ligase APC(Cdh1) is required to maintain genome integrity in primary human cells. *Oncogene* 27: 907-917.

English JT, Patel SK, Flanagan MJ (1973). Association of pheochromocytomas with brown fat tumors. *Radiology* 107: 279-281.

Entenmann G, Hauner H (1996). Relationship between replication and differentiation in cultured human adipocyte precursor cells. *Am. J. Physiol.* 270: 1011-1016.

- Esaki M, Ogura T (2012). Cdc48p/p97-mediated regulation of mitochondrial morphology is Vms1p-independent. *J. Struct. Biol.* 179: 112-120.
- Escobar-Henriques M, Langer T (2014). Dynamic survey of mitochondria by ubiquitin. *EMBO Rep.* 15: 231-243.
- Fagot-Campagna A (2000). Emergence of type 2 diabetes mellitus in children: epidemiological evidence. *J. Pediatr. Endocrinol. Metab.* 13: 1395-1402.
- Fajas (2003). Adipogenesis: a cross-talk between cell proliferation and cell differentiation. *Ann. Med.* 35: 79-85.
- Fajas L (2013). Re-thinking cell cycle regulators: the cross-talk with metabolism. *Front. Oncol.* 3: 4.
- Fajas L, Egler V, Reiter R, Hansen J, Kristiansen K, Debril MB, Miard S, Auwerx J (2002). The retinoblastoma-histone deacetylase 3 complex inhibits PPAR and adipocyte differentiation. *Dev. Cell* 3: 903-910.
- Fajas L, Landsberg RL, Huss-García Y, Sardet C, Lees JA, Auwerx J (2002). E2Fs regulate adipocyte differentiation. *Dev Cell.* 3: 39-49.
- Fan W, Imamura T, Sonoda N, Sears DD, Patsouris D, Kim JJ, Olefsky JM (2009). FOXO1 transrepresses peroxisome proliferator-activated receptor transactivation, coordinating an insulin-induced feed-forward response in adipocytes. *J. Biol. Chem.* 284: 12188-12197.
- Fantuzzi G (2005). Adipose tissue, adipokines, and inflammation. *J. Allergy Clin. Immunol.* 115: 911-919.
- Farmer SR (2005). Regulation of PPAR $\alpha$  activity during adipogenesis. *Int. J. Obes.* 29: 13-16.
- Farmer SR (2006). Transcriptional control of adipocyte formation. *Cell Metab.* 4: 263-273.
- Farmer SR (2008). Molecular determinants of brown adipocyte formation and function. *Genes Dev.* 22: 1269-1275.
- Fasshauer M, Klein J, Kriauciunas KM, Ueki K, Benito M, Kahn CR (2001). Essential role of insulin receptor substrate 1 in differentiation of brown adipocytes. *Mol. Cell Biol.* 21: 319-329.
- Faust IM, Johnson PR, Hirsch J (1977). Adipose tissue regeneration following lipectomy. *Science* 197: 391-393.
- Fedorenko A, Lishko PV, Kirichok Y (2012). Mechanism of fatty-acid-dependent UCP1 uncoupling in brown fat mitochondria. *Cell* 151: 400-413.
- Feige JN, Lagouge M, Canto C, Strehle A, Houten SM, Milne JC, Lambert PD, Feldman D (1978). Evidence that brown adipose tissue is a glucocorticoid target organ. *Endocrinology* 103: 2091-2097.
- Feldmann HM, Golozoubova V, Cannon B, Nedergaard J (2009). UCP1 ablation induces obesity and abolishes diet-induced thermogenesis in mice exempt from thermal stress by living at thermoneutrality. *Cell Metab.* 9: 203-209.
- Fernández de Mattos S, Lam EW, Tauler A (2002). An E2F-binding site mediates the activation of the proliferative isoform of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase by phosphatidylinositol 3-kinase. *Biochem. J.* 368: 283-291.
- Fernández-Veledo S, Vázquez-Carballo A, Vila-Bedmar R *et al* (2013). Role of energy- and nutrient-sensing kinases AMP-activated protein kinase (AMPK) and mammalian target of rapamycin (mTOR) in adipocyte differentiation. *IUBMB Life.* 65: 572-583.

## ***-Bibliografía-***

Ferrannini E, Galvan AQ, Gastaldelli A, Camastra S, Sironi AM, Toschi E, Baldi S, Frascerra S, Monzani F, Antonelli A *et al.* (1999). Insulin: new roles for an ancient hormone. *Eur. J. Clin. Invest.* 29: 842-852.

Festuccia WT, Oztezcan S, Laplante M, Berthiaume M, Michel C, Dohgu S, Denis RG, Brito MN, Brito NA *et al.* (2008). Peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$ -mediated positive energy balance in the rat is associated with reduced sympathetic drive to adipose tissues and thyroid status. *Endocrinology* 149: 2121-2130.

Fève B, Elhadri K, Quignard-Boulangé A, Pairault J (1994). Transcriptional down-regulation by insulin of the beta 3-adrenergic receptor expression in 3T3-F442A adipocytes: a mechanism for repressing the cAMP signaling pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 5677-5681.

Field BCT, Chaudhri OB, Bloom SR (2009). Obesity treatment: novel peripheral targets. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 68: 830-843.

Fingar DC, Richardson CJ, Tee AR, Cheatham L, Tsou C, Blenis J (2004). mTOR controls cell cycle progression through its cell growth effectors S6K1 and 4E-BP1/eukaryotic translation initiation factor 4E. *Mol. Cell Biol.* 24: 200-216.

Fisher FM, Kleiner S, Douris N, Fox EC, Mepani RJ, Verdeguer F, Wu J, Kharitonov A, Flier JS, Maratos-Flier E *et al.* (2012). FGF21 regulates PGC-1 $\alpha$  and browning of white adipose tissues in adaptive thermogenesis. *Genes Dev.* 26: 271-281.

Fleck SJ (1983). Body composition of elite American athletes. *Am. J. Sports Med.* 11: 398-403.

Flegal KM, Graubard BI, Williamson DF, Gail MH (2007). Cause-specific excess deaths associated with underweight, overweight, and obesity. *JAMA* 298: 2028-2037.

Flegal KM, Kit BK, Orpana H, Graubard BI (2013). Association of all-cause mortality with overweight and obesity using standard body mass index categories: a systematic review and meta-analysis. *JAMA* 309: 71-82.

Floyd S, Pines J, Lindon C (2008). APC/C-Cdh1 targets aurora kinase to control reorganization of the mitotic spindle at anaphase. *Curr. Biol.* 18: 1649-1658.

Floyd ZE, Stephens JM (2002). Interferon-gamma-mediated activation and ubiquitin-proteasome-dependent degradation of PPAR $\gamma$  in adipocytes. *J. Biol. Chem.* 277: 4062-4068.

Floyd ZE, Stephens JM (2012). Controlling a master switch of adipocyte development and insulin sensitivity: covalent modifications of PPAR $\gamma$ . *Biochim. Biophys. Acta.* 1822: 1090-1095.

Fonseca TL, Werneck-De-Castro JP, Castillo M, Bocco BM, Fernandes GW, McAninch EA *et al.* (2014). Tissue-specific inactivation of type 2 deiodinase reveals multilevel control of fatty acid oxidation by thyroid hormone in the mouse. *Diabetes* 63: 1594-1604.

Fontaine KR, Redden D T, Wang C, Westfall AJ, Allison DB (2003). Years of life lost due to obesity. *JAMA* 298: 187-193.

Forest C, Joffin N, Jaubert AM, Noirez P (2016). What induces watts in WAT? *Adipocyte* 5: 136-152.

Foukas LC, Bilanges B, Betti L *et al.* (2013). Long-term p110 $\alpha$  PI3K inactivation exerts a beneficial effect on metabolism. *EMBO Mol. Med.* 5: 563-571.

Friedman JM (2000). Obesity in the new millennium. *Nature* 404: 632-634.

Fromme T, Klingenspor M (2011). Uncoupling protein 1 expression and high-fat diets. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 300: 1-8.

Frontini A, Cinti S (2010). Distribution and development of brown adipocytes in the murine and human adipose organ. *Cell Metab.* 11: 253-256.

- Frontini A, Vitali A, Perugini J *et al.* (2013). White-to-brown transdifferentiation of omental adipocytes in patients affected by pheochromocytoma. *Biochim Biophys Acta* 1831: 950-959.
- Frühbeck G, Sesma P, Burrell MA (2009). PRDM16: the interconvertible adipo-myocyte switch. *Trends Cell Biol.* 19: 141-146.
- Frye JJ, Brown NG, Petzold G *et al.* (2013). Electron microscopy structure of human APC/C(CDH1)-EMI1 reveals multimodal mechanism of E3 ligase. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 20: 827-835.
- Fu AK, Hung KW, Fu WY *et al.* (2011). APC(Cdh1) mediates EphA4-dependent downregulation of AMPA receptors in homeostatic plasticity. *Nat. Neurosci.* 14: 181-189.
- Fu L, John LM, Adams SH, Yu XX, Tomlinson E *et al.* (2004). Fibroblast growth factor 19 increases metabolic rate and reverses dietary and leptin-deficient diabetes. *Endocrinology* 145: 2594-2603.
- Fu M, Rao M, Bouras T, Wang C, Wu K, Zhang X, Li Z, Yao TP, Pestell RG (2005). Cyclin D1 inhibits peroxisome proliferator-activated receptor gamma- mediated adipogenesis through histone deacetylase recruitment. *J. Biol. Chem.* 280: 16934-16941.
- Fuhrmann A, Lopes P, Sereno J, Pedro J, Espinoza DO, Pereira MJ, Reis F, Eriksson JW, Carvalho E (2014). Molecular mechanisms underlying the effects of cyclosporin A and sirolimus on glucose and lipid metabolism in liver, skeletal muscle and adipose tissue in an *in vivo* rat model. *Biochem. Pharmacol.* 88: 216-228.
- Fujita T, Liu W, Doihara H, Date H, Wan Y (2008). Dissection of the APCCdh1-Skp2 cascade in breast cancer. *Clin. Cancer Res.* 14: 1966-1975.
- Fujita T, Liu W, Doihara H, Wan Y (2008). Regulation of Skp2-p27 axis by the Cdh1/anaphase-promoting complex pathway in colorectal tumorigenesis. *Am. J. Pathol.* 173: 217-228.
- Fujiwara M, Marusawa H, Wang HQ, Iwai A, Ikeuchi K, Imai Y, Kataoka A, Nukina N, Takahashi R, Chiba T (2008). Parkin as a tumor suppressor gene for hepatocellular carcinoma. *Oncogene* 27: 6002-6011.
- Fukui Y, Masui S, Osada S, Umesono K, Motojima K (2000). A new thiazolidinedione, NC-2100, which is a weak PPAR- $\gamma$  activator, exhibits potent antidiabetic effects and induces uncoupling protein 1 in white adipose tissue of KKAy obese mice. *Diabetes* 49: 759-767.
- Fukushima H, Ogura K, Wan L *et al.* (2013). SCF-mediated Cdh1 degradation defines a negative feedback system that coordinates cell-cycle progression. *Cell Rep.* 4: 803-816.
- Gagnon A, Lau S, Sorisky A (2001). Rapamycin-sensitive phase of 3T3-L1 preadipocyte differentiation after clonal expansion. *J. Cell Physiol.* 189: 14-22.
- Gaich G, Chien JY, Fu H, Glass LC, Deeg MA, Holland WL *et al.* (2013). Effects of LY2405319, an FGF21 analog, in obese human subjects with type 2 diabetes. *Cell Metab.* 18: 333-40.
- Gao D, Inuzuka H, Korenjak M, Tseng A *et al.* (2009). Cdh1 regulates cell cycle through modulating the claspin/Chk1 and the Rb/E2F1 pathways. *Mol. Biol. Cell* 20: 3305-3316.
- Gao J, Serrero G (1999). Adipose differentiation related protein (ADRP) expressed in transfected COS-7 cells selectively stimulates long chain fatty acid uptake. *J. Biol. Chem.* 274: 16825-16830.
- Gao J, Ye H, Serrero G (2000). Stimulation of adipose differentiation related protein (ADRP) expression in adipocyte precursors by long-chain fatty acids. *J. Cell. Physiol.* 182: 297-302.
- Garami A, Zwartkuis FJT, Nobukuni T, Joaquín M, Rocco M *et al.* (2003). Insulin activation of Rheb, a mediator of mTOR/S6K/4E-BP signaling, is inhibited by TSC1 and 2. *Mol. Cell* 11: 1457-1466.

## ***-Bibliografía-***

García B, Obregón MJ (2002). Growth factor regulation of uncoupling protein-1 mRNA expression in brown adipocytes. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 282: 105-112.

García-Cao I, Song MS, Hobbs RM *et al.* (2012). Systemic elevation of PTEN induces a tumor-suppressive metabolic state. *Cell* 149: 49-62.

García-Casarrubios E, de Moura C, Arroba AI, Pescador N *et al.* (2016). Rapamycin negatively impacts insulin signaling, glucose uptake and uncoupling protein-1 in brown adipocytes. *Biochim. Biophys. Acta.* 1861: 1929-1941.

García-Higuera I, Manchado E, Dubus P, Cañamero M, Méndez J, Moreno S, Malumbres M (2008). Genomic stability and tumour suppression by the APC/C cofactor Cdh1. *Nat. Cell Biol.* 10: 802-811.

Garlid KD, Jaburek M, Jezek P (1998). The mechanism of proton transport mediated by mitochondrial uncoupling proteins. *FEBS Lett.* 438: 10-14.

Garlid KD, Orosz DE, Modriansky M, Vassanelli S, Jezek P (1996). On the mechanism of fatty acid-induced proton transport by mitochondrial uncoupling protein. *J. Biol. Chem.* 271: 2615-2620.

Garofalo RS, Orena SJ, Rafidi K, Torchia AJ *et al.* (2003). Severe diabetes, age-dependent loss of adipose tissue, and mild growth deficiency in mice lacking Akt2/PKB $\beta$ . *J. Clin. Invest.* 112: 197-208.

Garrel DR (1997). Glucocorticoids and energy expenditure: relevance to the regulation of energy balance in man. *Nutrition* 13: 482-483.

Garzón J, Rodríguez R, Kong Z, Chabes A, Rodríguez-Acebes S, Méndez J, Moreno S, García-Higuera I (2017). Shortage of dNTPs underlies altered replication dynamics and DNA breakage in the absence of the APC/C cofactor Cdh1. *Oncogene* 36: 5808-5818.

Gasparetti AL, de Souza CT, Pereira-da-Silva M, Oliveira RL, Saad MJ, Carneiro EM, Velloso LA (2003). Cold exposure induces tissue-specific modulation of the insulin-signalling pathway in *Rattus norvegicus*. *J. Physiol.* 552: 149-162.

Gauthier MS, Miyoshi H, Souza SC, Cacicedo JM, Saha AK, Greenberg AS, Ruderman NB (2008). AMP-activated protein kinase is activated as a consequence of lipolysis in the adipocyte: potential mechanism and physiological relevance. *J. Biol. Chem.* 283: 16514-16524.

Gayraud-Morel B, Chretien F, Flamant P, Gomes D, Zammit PS, Tajbakhsh S (2007). A role for the myogenic determination gene Myf5 in adult regenerative myogenesis. *Dev. Biol.* 312: 13-28.

Gegg ME, Cooper JM, Chau KY, Rojo M *et al.* (2010). Mitofusin 1 and mitofusin 2 are ubiquitinated in a PINK1/parkin-dependent manner upon induction of mitophagy. *Hum. Mol. Genet.* 19: 4861-4870.

Geisler S, Holmstrom KM, Skujat D, Fiesel FC, Rothfuss OC, Kahle PJ, Springer W (2010). PINK1/Parkin-mediated mitophagy is dependent on VDAC1 and p62/SQSTM1. *Nat. Cell Biol.* 12: 119-131.

George S, Rochford JJ, Wolfrum C, Gray SL, Schinner S, Wilson JC, Soos MA *et al.* (2004). A family with severe insulin resistance and diabetes due to a mutation in AKT2. *Science* 304: 1325-1328.

Georgia S, Bhushan A (2004). Beta cell replication is the primary mechanism for maintaining postnatal beta cell mass. *J. Clin. Invest.* 114: 963-968.

Gerin I, Bommer GT, Lidell ME *et al.* (2009). On the role of FOX transcription factors in adipocyte differentiation and insulin-stimulated glucose uptake. *J. Biol. Chem.* 284: 10755-10763.

Gesta S, Bluher M, Yamamoto Y, Norris AW, Berndt J, Kralisch S, Boucher J, Lewis C, Kahn CR (2006). Evidence for a role of developmental genes in the origin of obesity and body fat distribution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103: 6676-6681.

- Gesta S, Tseng YH, Kahn CR. (2007). Developmental origin of fat: tracking obesity to its source. *Cell* 131(2): 242-56.
- Gieffers A, Peters BH, Kramer ER, Dotti CG, Peters JM (1999). Expression of the CDH1-associated form of the anaphase-promoting complex in postmitotic neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 11317-11322.
- Gimeno RE, Moller DE (2014). FGF21-based pharmacotherapy - potential utility for metabolic disorders. *Trends Endocrinol. Metab.* 25: 303-311.
- Giralt M, Cairo M, Villarroya F (2016). Hormonal and nutritional signalling in the control of brown and beige adipose tissue activation and recruitment. *Best. Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 30: 515-525.
- Glauer L, Sonnay S, Stafa K, Moore DJ (2011). Parkin promotes the ubiquitination and degradation of the mitochondrial fusion factor mitofusin 1. *J. Neurochem.* 118: 636-645.
- Goglia F, Skulachev VP (2003). A function for novel uncoupling proteins: antioxidant defense of mitochondrial matrix by translocating fatty acid peroxides from the inner to the outer membrane leaflet. *FASEB J.* 17: 1585-1591.
- Golozoubova V, Cannon B, Nedergaard J (2006). UCP1 is essential for adaptive adrenergic nonshivering thermogenesis. *Am. J. Physiol.* 291: 350-357.
- Golozoubova V, Gullberg H, Matthias A, Cannon B, Vennstrom B, Nedergaard J (2004). Depressed thermogenesis but competent brown adipose tissue recruitment in mice devoid of all hormone-binding thyroid hormone receptors. *Mol. Endocrinol.* 18: 384-401.
- Golozoubova V, Hohtola E, Matthias A, Jacobsson A, Cannon B, Nedergaard J (2001). Only UCP1 can mediate adaptive nonshivering thermogenesis in the cold. *FASEB J.* 15: 2048-2050.
- Gong DW, He Y, Karas M, Reitman M (1997). Uncoupling protein-3 is a mediator of thermogenesis regulated by thyroid hormone,  $\beta$ 3-adrenergic agonists, and leptin. *J. Biol. Chem.* 272: 24129-24132.
- Gong DW, Monemdjou S, Gavrilova O *et al.* (2000). Lack of obesity and normal response to fasting and thyroid hormone in mice lacking uncoupling protein-3. *J. Biol. Chem.* 275: 16251-16257.
- Gospodarska E, Nowialis P, Kozak LP (2015). Mitochondrial turnover: a phenotype distinguishing brown adipocytes from interscapular brown adipose tissue and white adipose tissue. *J. Biol. Chem.* 290: 8243-8255.
- Granneman JG, Moore HP (2008). Location, location: protein trafficking and lipolysis in adipocytes. *Trends Endocrinol. Metab.* 19: 3-9.
- Granneman JG, Moore HP, Krishnamoorthy R, Rathod M (2009). Perilipin controls lipolysis by regulating the interactions of AB-hydrolase containing 5 (Abhd5) and adipose triglyceride lipase (Atgl). *J. Biol. Chem.* 284: 34538-34544.
- Graves RA, Tontonoz P, Platt KA, Ross SR, Spiegelman BM (1992). Identification of a fat cell enhancer: analysis of requirements for adipose tissue-specific gene expression. *J. Cell Biochem.* 49: 219-224.
- Green H, Kehinde O (1975). An established preadipose cell line and its differentiation in culture. II. Factors affecting the adipose conversion. *Cell* 5: 19-27.
- Greenberg AS, Egan JJ, Wek SA, Garty NB, Blanchette-Mackie EJ, Londos C (1991). Perilipin, a major hormonally regulated adipocyte-specific phosphoprotein associated with the periphery of lipid storage droplets. *J. Biol. Chem.* 266: 11341-11346.
- Gregoire FM, Smas CM, Sul HS (1998). Understanding adipocyte differentiation. *Physiol. Rev.* 78: 783-809.

## ***-Bibliografía-***

Grosskortenhaus R, Sprenger F (2002). Rca1 inhibits APC-Cdh1Fzr and is required to prevent cyclin degradation in G2. *Dev. Cell* 2: 29-40.

Grossmann ME, Yang DQ, Guo Z, Potter DA, Cleary MP (2015). Metformin treatment for the prevention and/or treatment of breast/mammary tumorigenesis. *Curr. Pharmacol. Rep.* 1: 312-323.

Grover GJ, Egan DM, Sleph PG, Beehler BC, Chiellini G, Nguyen NH, Baxter JD, Scanlan TS (2004). Effects of the thyroid hormone receptor agonist GC-1 on metabolic rate and cholesterol in rats and primates: selective actions relative to 3,5,3'-triiodo-L-thyronine. *Endocrinology* 145: 1656-1661.

Grundlingh J, Dargan PI, El-Zanfaly M, Wood DM (2011). 2,4-Dinitrophenol (DNP): a weight loss agent with significant acute toxicity and risk of death. *J. Med. Toxicol.* 7: 205-212.

Guerra C, Koza RA, Yamashita H, Walsh K, Kozak LP (1998). Emergence of brown adipocytes in white fat in mice is under genetic control. Effects on body weight and adiposity. *J. Clin. Investig.* 102: 412-420.

Guerra C, Navarro P, Valverde AM *et al.* (2001). Brown adipose tissue-specific insulin receptor knockout shows diabetic phenotype without insulin resistance. *J. Clin. Invest.* 108: 1205-1213.

Guertin DA, Sabatini DM (2007). Defining the role of mTOR in cancer. *Cancer Cell* 12: 9-22.

Gunawardana SC (2012). Therapeutic value of brown adipose tissue. *Adipocyte* 1: 250-255.

Guo L, Li X, Tang QQ (2015). Transcriptional regulation of adipocyte differentiation: a central role for CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP) $\beta$ . *J. Biol. Chem.* 290: 755-761.

Gupta RK, Mepani RJ, Kleiner S, Lo JC, Khandekar MJ, Cohen P, Frontini A, Bhowmick DC, Ye L, Cinti S, Spiegelman BM (2012). Zfp423 expression identifies committed preadipocytes and localizes to adipose endothelial and perivascular cells. *Cell Metab.* 15: 230-239.

Gustafson B, Hammarstedt A, Hedjazifar S, Hoffmann JM, Svensson PA, Grimsby J, Rondinone C, Smith U (2015). BMP4 and BMP antagonists regulate human white and beige adipogenesis. *Diabetes* 64: 1670-1681.

Haas B, Mayer P, Jennissen K, Scholz D, Berriel Diaz M *et al.* (2009). Protein kinase G controls brown fat cell differentiation and mitochondrial biogenesis. *Sci. Signal.* 2: ra78.

Haas B, Schlinkert P, Mayer P, Eckstein N (2012). Targeting adipose tissue. *Diabetol. Metab. Syndr.* 4: 43.

Hadi M, Chen CC, Whatley M, Pacak K, Carrasquillo JA (2007). Brown fat imaging with (18)F-6-fluorodopamine PET/CT, (18)F-FDG PET/CT, and (123)I-MIBG SPECT: a study of patients being evaluated for pheochromocytoma. *J. Nucl. Med.* 48: 1077-1083.

Hagen T, Lowell BB (2000). Chimeric proteins between UCP1 and UCP3: the middle third of UCP1 is necessary and sufficient for activation by fatty acids. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 276: 642-648.

Hagting A, Den Elzen N, Vodermaier HC *et al.* (2002). Human securin proteolysis is controlled by the spindle checkpoint and reveals when the APC/C switches from activation by Cdc20 to Cdh1. *J. Cell Biol.* 157: 1125-1137.

Hahn-Windgassen A, Nogueira V, Chen CC, Skeen JE, Sonenberg N *et al.* (2005). Akt activates the mammalian target of rapamycin by regulating cellular ATP level and AMPK activity. *J. Biol. Chem.* 280: 32081-32089.

Hakim-Weber R, Krogsdam AM, Jørgensen C, Fischer M, Prokesch A *et al.* (2011). Transcriptional regulatory program in wild-type and retinoblastoma gene-deficient mouse embryonic fibroblasts during



adipocyte differentiation. *BMC Res. Notes* 4: 157.

Hall JA, Ribich S, Christoffolete MA, Simovic G, Correa-Medina M, Patti ME, Bianco AC (2010). Absence of thyroid hormone activation during development underlies a permanent defect in adaptive thermogenesis. *Endocrinology* 151: 4573-4582.

Hallberg M, Morganstein DL, Kiskinis E, Shah K, Kralli A, *et al.* (2008). A functional interaction between RIP140 and PGC-1 $\alpha$  regulates the expression of the lipid droplet protein CIDEA. *Mol. Cell. Biol.* 28: 6785-6795.

Hamdy O, Porramatikul S, Al-Ozairi E (2006). Metabolic obesity: the paradox between visceral and subcutaneous fat. *Curr. Diabetes Rev.* 2: 367-373.

Hammond RA, Levine R (2010). The economic impact of obesity in the United States. *Diabetes Metab. Syndr. Obes.* 3: 285-295.

Han L, Wang P, Zhao G, Wang H, Wang M, Chen J, Tong T (2013). Upregulation of SIRT1 by 17 beta-estradiol depends on ubiquitin-proteasome degradation of PPAR-gamma mediated by NEDD4-1. *Protein Cell* 4: 310-321.

Hansen IR, Jansson KM, Cannon B, Nedergaard J (2014). Contrasting effects of cold acclimation versus obesogenic diets on chemerin gene expression in brown and white adipose tissues. *Biochim. Biophys. Acta* 1841: 1691-1699.

Hansen JB, Jorgensen C, Petersen RK, Hallenborg P, De Matteis R, *et al.* (2004). Retinoblastoma protein functions as a molecular switch determining white versus brown adipocyte differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101: 4112-4117.

Hansen JB, Kristiansen K (2006). Regulatory circuits controlling white versus brown adipocyte differentiation. *Biochem. J.* 398: 153-168.

Hansen JB, Petersen RK, Larsen BM, Bartkova J, Alsner J, Kristiansen K (1999). Activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma bypasses the function of the retinoblastoma protein in adipocyte differentiation. *J. Biol. Chem.* 274: 2386-2393.

Hanssen MJ, Hoeks J, Brans B, van der Lans AA, Schaart G, van den Driessche JJ, Jørgensen JA, Boekschoten MV, Hesselink MK, Havekes B, Kersten S, Mottaghy FM, van Marken Lichtenbelt WD, Schrauwen P (2015). Short-term cold acclimation improves insulin sensitivity in patients with type 2 diabetes mellitus. *Nat. Med.* 21: 863-865.

Håring H, Kirsch D, Obermaier B, Ermel B, Machicao F (1986). Decreased tyrosine kinase activity of insulin receptor isolated from rat adipocytes rendered insulin-resistant by catecholamine treatment *in vitro*. *Biochem. J.* 234: 59-66.

Harmey D, Smith A, Simanski S, Moussa CZ, Ayad NG (2009). The anaphase promoting complex induces substrate degradation during neuronal differentiation. *J. Biol. Chem.* 284: 4317-4323.

Harms M, Seale P (2013). Brown and beige fat: development, function and therapeutic potential. *Nat. Med.* 19: 1252-1263.

Harms MJ, Ishibashi J, Wang W, Lim HW *et al.* (2014). Prdm16 is required for the maintenance of brown adipocyte identity and function in adult mice. *Cell Metabolism* 19: 593-604.

Harper JA, Dickinson K, Brand MD (2001). Mitochondrial uncoupling as a target for drug development for the treatment of obesity. *Obes. Rev.* 2: 255-265.

Harper JW, Adami GR, Wei N, Keyomarsi K, Elledge SJ (1993). The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell* 75: 805-816.

## ***-Bibliografía-***

- Harper ME, Antoniou A, Villalobos-Menuey E *et al.* (2002). Characterization of a novel metabolic strategy used by drug-resistant tumor cells. *FASEB J.* 16: 1550-1557.
- Harper ME, Green K, Brand MD (2008). The efficiency of cellular energy transduction and its implications for obesity. *Annu. Rev. Nutr.* 28: 13-33.
- Harrington LS, Findlay GM, Gray A *et al.* (2004). The TSC1-2 tumor suppressor controls insulin-PI3K signaling via regulation of IRS proteins. *J. Cell Biol.* 166: 213-223.
- Haslam D (2007). Obesity: a medical history. *Obes. Rev.* 8: 31-36.
- Haslam DW, James WPT (2005). Obesity. *Lancet* 366: 1197-1209.
- Hasson SA, Kane LA, Yamano K *et al.* (2013). High-content genome-wide RNAi screens identify regulators of parkin upstream of mitophagy. *Nature* 504: 291-295.
- Haurer H, Schmid P, Pfeiffer EF (1987). Glucocorticoids and insulin promote the differentiation of human adipocyte precursor cells into fat cells. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 64: 832-835.
- Hauser S, Adelmant G, Sarraf P, Wright HM, Mueller E, Spiegelman BM (2000). Degradation of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma is linked to ligand-dependent activation. *J. Biol. Chem.* 275: 18527-18533.
- Hayward JS, Lisson PA (1992). Evolution of brown fat: its absence in marsupials and monotremes. *Can. J. Zool.* 70: 171-179.
- He W, Barak Y, Hevener A *et al.* (2003). Adipose-specific peroxisome proliferator-activated receptor gamma knockout causes insulin resistance in fat and liver but not in muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100: 15712-15717.
- Heaton GM, Wagenvoord RJ, Kemp Jr. A, Nicholls DG (1978). Brown-adipose-tissue mitochondria: photoaffinity labelling of the regulatory site of energy dissipation. *Eur. J. Biochem.* 82: 515-521.
- Heldmaier G (1971). Non-shivering thermogenesis and body size in mammals. *Z. Vgl. Physiol.* 73: 222-231.
- Helenius K, Yang Y, Alasaari J, Makela TP (2009). Mat1 inhibits peroxisome proliferator-activated receptor gamma-mediated adipocyte differentiation. *Mol. Cell. Biol.* 29: 315-323.
- Heo JM, Livnat-Levanon N, Taylor EB *et al.* (2010). A stress-responsive system for mitochondrial protein degradation. *Mol. Cell* 40: 465-480.
- Heo JM, Nielson JR, Dephore N, Gygi SP, Rutter J (2013). Intramolecular interactions control Vms1 translocation to damaged mitochondria. *Mol. Biol. Cell* 24: 1263-1273.
- Heo JM, Ordureau A, Paulo JA, Rinehart J, Harper JW (2015). The PINK1-PARKIN mitochondrial ubiquitylation pathway drives a program of OPTN/NDP52 recruitment and TBK1 activation to promote mitophagy. *Mol. Cell* 60: 7-20.
- Heo JM, Rutter J (2011). Ubiquitin-dependent mitochondrial protein degradation. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 43: 1422-1426.
- Hernández A, Obregón, MJ. (2000). Triiodothyronine amplifies the adrenergic stimulation of uncoupling protein expression in rat brown adipocytes. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 278: 769-777.
- Hernández TL, Kittelson JM, Law CW, Ketch LL, Stob NR, Lindstrom RC, Scherzinger A, Stamm ER, Eckel RH (2011). Fat redistribution following suction lipectomy: defense of body fat and patterns of restoration. *Obesity* 19: 1388-1395.

- Herrero-Méndez A, Almeida A, Fernández E, Maestre C, Moncada S, Bolaños JP (2009). The bioenergetic and antioxidant status of neurons is controlled by continuous degradation of a key glycolytic enzyme by APC/C-Cdh1. *Nat. Cell Biol.* 11: 747-752.
- Hicke L, Schubert HL, Hill CP (2005). Ubiquitin-binding domains. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6: 610-621.
- Higgins C, Chatterjee S, Cherington V (1996). The block of adipocyte differentiation by a C-terminally truncated, but not by full-length, simian virus 40 large tumor antigen is dependent on an intact retinoblastoma susceptibility protein family binding domain. *J. Virol.* 70: 745-752.
- Himms-Hagen J, Cui J, Danforth E Jr, Taatjes DJ, Lang SS, Waters BL, Claus TH (1994). Effect of CL-316,243, a thermogenic beta 3-agonist, on energy balance and brown and white adipose tissues in rats. *Am. J. Physiol.* 266: 1371-1382.
- Himms-Hagen J, Harper ME (2001). Physiological role of UCP3 may be export of fatty acids from mitochondria when fatty acid oxidation predominates: an hypothesis. *Exp. Biol. Med.* 226: 78-84.
- Himms-Hagen J, Melnyk A, Zingaretti MC, Ceresi E, Barbatelli G, Cinti S (2000). Multilocular fat cells in WAT of CL-316243-treated rats derive directly from white adipocytes. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 279: 670-681.
- Hinoi E, Nakamura Y, Takada S, Fujita H, Iezaki T, Hashizume S, Takahashi S, Odaka Y, Watanabe T, Yoneda Y (2014). Growth differentiation factor-5 promotes brown adipogenesis in systemic energy expenditure. *Diabetes* 63: 162-175.
- Hirono-Hara Y, Noji H, Nishiura M et al. (2001). Pause and rotation of F1-ATPase during catalysis. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 98: 13649-13654.
- Hirsch J, Batchelor B (1976). Adipose tissue cellularity in human obesity. *Clin. Endocrinol. Metab.* 5: 299-311.
- Hoerter J, González-Barroso MD, Couplan E et al. (2004). Mitochondrial uncoupling protein 1 expressed in the heart of transgenic mice protects against ischemic-reperfusion damage. *Circulation* 110: 528-533.
- Holt JE, Lane SIR, Jennings P, García-Higuera I, Moreno S, Jones KT (2012). APC<sup>FZR1</sup> prevents nondisjunction in mouse oocytes by controlling meiotic spindle assembly timing. *Mol. Biol. Cell* 23: 3970-3981.
- Holt JE, Pye V, Boon E, Stewart JL, García-Higuera I, Moreno S, Rodríguez R, Jones KT, McLaughlin EA (2014). The APC/C activator FZR1 is essential for meiotic prophase I in mice. *Development* 141: 1354-1365.
- Holt JE, Tran SM, Stewart JL, Minahan K, García-Higuera I, Moreno S, Jones KT (2011). The APC/C activator FZR1 coordinates the timing of meiotic resumption during prophase I arrest in mammalian oocytes. *Development* 138: 905-913.
- Holt JE, Weaver J, Jones KT (2010). Spatial regulation of APCCdh1-induced cyclin B1 degradation maintains G2 arrest in mouse oocytes. *Development* 137: 1297-1304.
- Holland WL, Adams AC, Brozinick JT et al. (2013). An FGF21-adiponectin-ceramide axis controls energy expenditure and insulin action in mice. *Cell Metab.* 17: 790-797.
- Homer H (2013). The APC/C in female mammalian meiosis I. *Reproduction* 146: 61-71.
- Hondares E, Mora O, Yubero P, Rodríguez de la Concepción M, Iglesias R, Giral M, Villarroya F (2006). Thiazolidinediones and rexinoids induce peroxisome proliferator-activated receptor-coactivator (PGC)-1 $\alpha$  gene transcription: an autoregulatory loop controls PGC-1 $\alpha$  expression in adipocytes via peroxisome proliferator-activated receptor-coactivation. *Endocrinology* 147: 2829-2838.

## ***-Bibliografía-***

Hondares E, Rosell M, González FJ, Giralt M, Iglesias R, Villarroya F (2010). Hepatic FGF21 expression is induced at birth via PPAR $\alpha$  in response to milk intake and contributes to thermogenic activation of neonatal brown fat. *Cell Metab.* 11: 206-212.

Horn SR, Thomenius MJ, Johnson ES, Freel CD *et al.* (2011). Regulation of mitochondrial morphology by APC/CCdh1-mediated control of Drp1 stability. *Mol. Biol. Cell.* 22: 1207-1216.

Hou L, Shi J, Cao L, Xu G, Hu C, Wang C (2017). Pig has no uncoupling protein 1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 487: 795-800.

Houde VP, Brule S, Festuccia WT, Blanchard PG, Bellmann K, Deshaies Y, Marette A (2010). Chronic rapamycin treatment causes glucose intolerance and hyperlipidemia by upregulating hepatic gluconeogenesis and impairing lipid deposition in adipose tissue. *Diabetes* 59: 1338-1348.

Hresko RC, Mueckler M (2005). mTOR.RICTOR is the Ser473 kinase for Akt/protein kinase B in 3T3-L1 adipocytes. *J. Biol. Chem.* 280: 40406-40416.

Hsieh MC, Das D, Sambandam N, Zhang MQ, Nahle Z (2008). Regulation of the PDK4 isozyme by the Rb-E2F1 complex. *J. Biol. Chem.* 283: 27410-27417.

Hsu JY, Reimann JD, Sorensen CS, Lukas J, Jackson PK (2002). E2F-dependent accumulation of hEmi1 regulates S phase entry by inhibiting APC(Cdh1). *Nat. Cell Biol.* 4: 358-366.

Hsu PP, Kang SA, Rameseder J *et al.* (2011). The mTOR-regulated phosphoproteome reveals a mechanism of mTORC1-mediated inhibition of growth factor signaling. *Science* 332: 1317-1322.

Hu D, Qiao X, Wu G, Wan Y (2011). The emerging role of APC/CCdh1 in development. *Semin. Cell Dev. Biol.* 22: 579-585.

Hu E, Tontonoz P, Spiegelman BM (1995). Transdifferentiation of myoblasts by the adipogenic transcription factors PPAR gamma and C/EBP alpha. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 9856-9860.

Huang H, Regan KM, Wang F, Wang D, Smith DI, van Deursen JM, Tindall DJ (2005). Skp2 inhibits FOXO1 in tumor suppression through ubiquitin-mediated degradation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102: 1649-1654.

Huang H, Song TJ, Li X, Hu L, He Q, Liu M, Lane MD, Tang QQ (2009). BMP signaling pathway is required for commitment of C3H10T1/2 pluripotent stem cells to the adipocyte lineage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106: 12670-12675.

Huang J, Ikeuchi Y, Malumbres M, Bonni A (2015). A Cdh1-APC/FMRP ubiquitin signaling link drives mGluR-dependent synaptic plasticity in the mammalian brain. *Neuron* 86: 726-739.

Huang K, Fingar DC (2014). Growing knowledge of the mTOR signaling network. *Semin. Cell Dev. Biol.* 36: 79-90.

Hudak CS, Sul HS (2013). Pref-1, a gatekeeper of adipogenesis. *Front. Endocrinol.* 4: 79.

Hughes J, Criscuolo F (2008). Evolutionary history of the UCP gene family: gene duplication and selection. *BMC Evol. Biol.* 8: 306.

Hung CM, Calejman CM, Sánchez-Gurmaches J *et al.* (2014). Rictor/mTORC2 loss in the Myf5 lineage reprograms brown fat metabolism and protects mice against obesity and metabolic disease. *Cell Rep.* 8: 256-271.

Hunt CR, Ro JH, Dobson DE, Min HY, Spiegelman BM (1986). Adipocyte P2 gene: developmental expression and homology of 5'-flanking sequences among fat cell-specific genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 3786-3790.

Hunter T (1993). Braking the cycle. *Cell* 75: 839-841.

Huot ME, Vogel G, Zabarauskas A, Ngo CT, Coulombe-Huntington J, Majewski J, Richard S (2012). The Sam68 STAR RNA-binding protein regulates mTOR alternative splicing during adipogenesis. *Mol. Cell* 46: 187-199.

Hupfeld CJ, Dalle S, Olefsky JM (2003). b-Arrestin 1 down-regulation after insulin treatment is associated with supersensitization of b2 adrenergic receptor Gas signalling in 3T3—L1 adipocytes. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 100: 161-166.

Hutley L, Shurety W, Newell F, McGeary R, Pelton N, Grant J, Herington A, Cameron D, Whitehead J, Prins J (2004). Fibroblast growth factor 1: a key regulator of human adipogenesis. *Diabetes* 53: 3097-3106.

Huynh MA, Stegmüller J, Litterman N, Bonni A (2009). Regulation of Cdh1-APC function in axon growth by Cdh1 phosphorylation. *J. Neurosci.* 29: 4322-4327.

Iankova I, Rk Petersen, Annicotte JS *et al.* (2006). PPAR{gamma} recruits the P-TEFb complex to activate transcription and promote adipogenesis. *Mol. Endocrinol.* 20: 1494-1505.

Ikeuchi Y, Stegmüller J, Netherton S *et al.* (2009). A SnoN-Ccd1 pathway promotes axonal morphogenesis in the mammalian brain. *J. Neurosci.* 29: 4312-4321.

Inoki K, Li Y, Xu T, Guan KL (2003). Rheb GTPase is a direct target of TSC2 GAP activity and regulates mTOR signaling. *Genes Dev.* 17: 1829-1834.

Inoki K, Li Y, Zhu T, Wu J, Guan KL (2002). TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTOR signalling. *Nat. Cell Biol.* 4: 648-657.

Inoue N, Yahagi N, Yamamoto T, Ishikawa M, Watanabe K, Matsuzaka T, Nakagawa Y *et al.* (2008). Cyclin-dependent kinase inhibitor, p21WAF1/CIP1, is involved in adipocyte differentiation and hypertrophy, linking to obesity, and insulin resistance. *J. Biol. Chem.* 283: 21220-21229.

Issad T, Combettes M, Ferre P (1995). Isoproterenol inhibits insulin-stimulated tyrosine phosphorylation of the insulin receptor without increasing its serine/threonine phosphorylation. *Eur. J. Biochem.* 234: 108-115.

Ivanova MV, Hoang T, McSorley FR, Krnac G, Smith MD, Jelokhani-Niaraki M (2010). A comparative study on conformation and ligand binding of the neuronal uncoupling proteins. *Biochemistry* 49: 512-521.

Jager S, Handschin C, St-Pierre J, Spiegelman BM (2007). AMP-activated protein kinase (AMPK) action in skeletal muscle via direct phosphorylation of PGC-1alpha. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104: 12017-12022.

Jaquenoud M, van Drogen F, Peter M (2002). Cell cycle-dependent nuclear export of Cdh1p may contribute to the inactivation of APC/C(Cdh1). *EMBO J.* 21: 6515-6526.

Jaspersen SL, Charles JF, Morgan DO (1999). Inhibitory phosphorylation of the APC regulator Hct1 is controlled by the kinase Cdc28 and the phosphatase Cdc14. *Curr. Biol.* 9: 227-236.

Jastroch M, Divakaruni AS, Mookerjee S, Treberg JR, Brand MD (2010). Mitochondrial proton and electron leaks. *Essays Biochem.* 47: 53-67.

Jastroch M, Withers KW, Taudien S *et al.* (2008). Marsupial uncoupling protein 1 sheds light on the evolution of mammalian nonshivering thermogenesis. *Physiol. Genomics.* 32: 161-169.

Jeanson Y, Carriere A, Casteilla L (2015). A new role for browning as a redox and stress adaptive me-

## ***-Bibliografía-***

chanism? *Front. Endocrinol.* 6: 158.

Jeanson Y, Ribas F, Galinier A, Arnaud E, Ducos M, Andre M, Chenouard V, Villarroya F, Casteilla L, Carriere A (2016). Lactate induces FGF21 expression in adipocytes through a p38-MAPK pathway. *Biochem. J.* 473: 685-692.

Jefcoate CR, Wang S, Liu X (2008). Methods that resolve different contributions of clonal expansion to adipogenesis in 3T3-L1 and C3H10T1/2 cells. *Methods Mol. Biol.* 456: 173-193.

Jeffery E, Berry R, Church CD *et al.* (2014). Characterization of Cre recombinase models for the study of adipose tissue. *Adipocyte* 3: 206-211.

Jeffery E, Church CD, Holtrup B, Colman L, Rodeheffer MS (2015). Rapid depot-specific activation of adipocyte precursor cells at the onset of obesity. *Nat. Cell Biol.* 17: 376-385.

Jespersen NZ, Larsen TJ, Peijs L, Daugaard S, Homøe P, Loft A, de Jong J, Mathur N, Cannon B, Nedergaard J, Pedersen BK, Møller K, Scheele C (2013). A classical brown adipose tissue mRNA signature partly overlaps with brite in the supraclavicular region of adult humans. *Cell Metab.* 17: 798-805.

Jezek P, Orosz DE, Modriansky M, Garlid KD (1994). Transport of anions and protons by the mitochondrial uncoupling protein and its regulation by nucleotides and fatty acids. A new look at old hypotheses. *J. Biol. Chem.* 269: 26184-26190.

Ji M, Li H, Suh HC, Klarmann KD, Yokota Y, Keller JR (2008). Id2 intrinsically regulates lymphoid and erythroid development via interaction with different target proteins. *Blood* 112: 1068-1077.

Ji P, Jiang H, Rekhtman K, Bloom J, Ichetovkin M, Pagano M, Zhu L (2004). An Rb-Skp2-p27 pathway mediates acute cell cycle inhibition by Rb and is retained in a partial-penetrance Rb mutant. *Mol. Cell* 16: 47-58.

Jiang G, Zhang BB (2002). Pi3-kinase and its up- and down-stream modulators as potential targets for the treatment of type II diabetes. *Front. Biosci.* 7: 903-907.

Jiménez M, Barbatelli G, Allevi R, Cinti S, Seydoux J, Giacobino JP, Muzzin P, Preitner F (2003). Beta 3-adrenoceptor knockout in C57BL/6J mice depresses the occurrence of brown adipocytes in white fat. *Eur. J. Biochem.* 270: 699-705.

Jing E, Gesta S, Kahn CR (2007). SIRT2 regulates adipocyte differentiation through FoxO1 acetylation/deacetylation. *Cell Metab.* 6: 105-114.

Johnson PF (2005). Molecular stop signs: regulation of cell-cycle arrest by C/EBP transcription factors. *J. Cell Sci.* 118: 2545-2555.

Jones JR, Barrick C, Kim KA, Lindner J, Blondeau B, Fujimoto Y *et al.* (2005). Deletion of PPAR $\gamma$  in adipose tissues of mice protects against high fat diet-induced obesity and insulin resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102: 6207-6212.

Joseph JW, Koshkin V, Saleh MC *et al.* (2004). Free fatty acid induced beta-cell defects are dependent on uncoupling protein 2 expression. *J. Biol. Chem.* 279: 51049-51056.

Joseph JW, Koshkin V, Zhang CY *et al.* (2002). Uncoupling protein 2 knockout mice have enhanced insulin secretory capacity after a high-fat diet. *Diabetes* 51: 3211-3219.

Joshi PV, Lele VR (2012). Unexpected visitor on FDG PET/CT—brown adipose tissue (BAT) in mesentery in a case of retroperitoneal extra-adrenal pheochromocytoma: is the BAT activation secondary to catecholamine-secreting pheochromocytoma? *Clin. Nucl. Med.* 37: 119-120.

Jost P, Fasshauer M, Kahn CR, Benito M, Meyer M, Ott V, Lowell BB, Klein HH, Klein J (2002). Atypical beta-adrenergic effects on insulin signaling and action in beta(3)-adrenoceptor-deficient brown

adipocytes. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 283: 146-153.

Joyner JM, Hutley LJ, Cameron DP (2000). Glucocorticoid receptors in human preadipocytes: regional and gender differences. *J. Endocrinol.* 166: 145-152.

Juo P, Kaplan JM (2004). The anaphase-promoting complex regulates the abundance of GLR-1 glutamate receptors in the ventral nerve cord of *C. elegans*. *Curr. Biol.* 14: 2057-2062.

Kaaks R, Lukanova A (2002). Effects of weight control and physical activity in cancer prevention: role of endogenous hormone metabolism. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 963: 268-281.

Kadereit B, Kumar P, Wang WJ, Miranda D, Snapp EL, Severina N, Torregroza I, Evans T, Silver DL (2008). Evolutionarily conserved gene family important for fat storage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105: 94-99.

Kahan S (2017). Quick takes: what you need to know about the 5 FDA-approved obesity drugs. *Medscape*.

Kahn SE, Hull RL, Utzschneider KM (2006). Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature* 444: 840-846.

Kajimura S, Seale P, Kubota K, Lunsford E, Frangioni JV, Gygi SP, Spiegelman BM (2009). Initiation of myoblast to brown fat switch by a PRDM16-C/EBP-beta transcriptional complex. *Nature* 460: 1154-1158.

Kajimura S, Seale P, Spiegelman BM (2010). Transcriptional control of brown fat development. *Cell Metab.* 11: 257-262.

Kajimura S, Seale P, Tomaru T, Erdjument-Bromage H, Cooper MP, Ruas JL, Chin S, Tempst P, Lazar MA, Spiegelman BM (2008). Regulation of the brown and white fat gene programs through a PRDM16/CtBP transcriptional complex. *Genes Dev.* 22: 1397-1409.

Kajimura S, Spiegelman BM, Seale P (2015). Brown and beige fat: physiological roles beyond heat generation. *Cell Metab.* 22: 546-559.

Kalinovich AV, Shabalina IG (2015). Novel mitochondrial cationic uncoupler C4R1 is an effective treatment for combating obesity in mice. *Biochem.* 80: 620-628.

Kallen CB, Lazar MA (1996). Antidiabetic thiazolidinediones inhibit leptin (ob) gene expression in 3T3-L1 adipocytes. *P. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 5793-5796.

Kang S, Kong X, Rosen ED (2014). Adipocyte-specific transgenic and knockout models. *Methods Enzymol.* 537: 1-16.

Karbowski M, Youle RJ (2011). Regulating mitochondrial outer membrane proteins by ubiquitination and proteasomal degradation. *Curr. Opin. Cell Biol.* 23: 476-482.

Kaser M, Langer T (2000). Protein degradation in mitochondria. *Semin. Cell Dev. Biol.* 11: 181-190.

Kato JY, Matsuoka M, Polyak K, Massagué J, Sherr CJ (1994). Cyclic AMP-induced G1 phase arrest mediated by an inhibitor (p27Kip1) of cyclin-dependent kinase 4 activation. *Cell* 79: 487-496.

Kawai M, Rosen CJ (2010). The IGF-I regulatory system and its impact on skeletal and energy homeostasis. *J. Cell. Biochem.* 111: 14-19.

Kazak L, Chouchani ET, Jedrychowski MP, Erickson BK, Shinoda K, Cohen P, Vetrivela R, Lu GZ, Laznik-Bogoslavski D, Hasenfuss S *et al.* (2015). A creatine-driven substrate cycle enhances energy expenditure and thermogenesis in beige fat. *Cell* 163: 643-655.

## ***-Bibliografía-***

Keipert S, Jastroch M (2014). Brite/beige fat and UCP1 - is it thermogenesis? *Biochimica et Biophysica Acta* 1837: 1075-1082.

Kershaw EE, Flier JS (2004). Adipose tissue as an endocrine organ. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 89: 2548-2556.

Khaminets A, Behl C, Dikic I (2016). Ubiquitin-dependent and independent signals in selective autophagy. *Trends Cell Biol.* 26: 6-16.

Kiefer FW, Vernochet C, O'Brien P, Spoerl S, Brown JD, Nallamshetty S, Zeyda M, Stulnig TM, Cohen DE, Kahn CR, Plutzky J (2012). Retinaldehyde dehydrogenase 1 regulates a thermogenic program in white adipose tissue. *Nat. Med.* 18: 918-925.

Kilroy G, Kirk-Ballard H, Carter LE, Floyd ZE (2012). The ubiquitin ligase Siah2 regulates PPAR gamma activity in adipocytes. *Endocrinology* 153: 1206-1218.

Kilroy GE, Zhang X, Floyd ZE (2009). PPAR-gamma AF-2 domain functions as a component of a ubiquitin-dependent degradation signal. *Obesity* 17: 665-673.

Kim JE, Chen J (2004). Regulation of peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  activity by mammalian target of rapamycin and amino acids in adipogenesis. *Diabetes* 53: 2748-2756.

Kim JH, Park KW, Lee EW, Jang WS, Seo J, Shin S, Hwang KA, Song J (2014). Suppression of PPAR gamma through MKRN1-mediated ubiquitination and degradation prevents adipocyte differentiation. *Cell Death Differ.* 21: 594-603.

Kim JH, Shin S, Seo J, Lee EW, Jeong M, Lee M, Han HJ, Song J (2017). C-terminus of HSC70-interacting protein (CHIP) inhibits adipocyte differentiation via ubiquitin- and proteasome-mediated degradation of PPAR $\gamma$ . *Scientific Reports* 7: 40023.

Kim JY, van de Wall E, Laplante M, Azzara A, Trujillo ME, Hofmann SM, Schraw T, Durand JL *et al.* (2007). Obesity-associated improvements in metabolic profile through expansion of adipose tissue. *J. Clin. Invest.* 117: 2621-2637.

Kim TY, Kim MY, Jo SH, Park JM, Ahn YH (2013). Modulation of the transcriptional activity of peroxisome proliferator-activated receptor gamma by protein-protein interactions and post-translational modifications. *Yonsei Med. J.* 54: 545-559.

Kir S, White JP, Kleiner S, Kazak L, Cohen P, Baracos VE, Spiegelman BM (2014). Tumour-derived PTH-related protein triggers adipose tissue browning and cancer cachexia. *Nature* 513: 100-104.

Kiskinis E, Hallberg M, Christian M *et al.* (2007). RIP140 directs histone and DNA methylation to silence Ucp1 expression in white adipocytes. *EMBO J.* 26: 4831-4871.

Kissebah AH, Krakower GR (1994). Regional adiposity and morbidity. *Physiol. Rev.* 74: 761-811.

Klaus S, Casteilla L, Bouillaud F, Ricquier D (1991). The uncoupling protein UCP: a membranous mitochondrial ion carrier exclusively expressed in brown adipose tissue. *Int. J. Biochem.* 23: 791-801.

Klein HH, Matthaei S, Drenkhan M, Ries W, Scriba PC (1991). The relationship between insulin binding, insulin activation of insulin-receptor tyrosine kinase, and insulin stimulation of glucose uptake in isolated rat adipocytes. Effects of isoprenaline. *Biochem. J.* 274: 787-792.

Klein J, Fasshauer M, Benito M, Kahn CR (2000). Insulin and the beta3-adrenoceptor differentially regulate uncoupling protein-1 expression. *Mol. Endocrinol.* 14: 764-773.

Klein J, Fasshauer M, Ito M, Lowell BB, Benito M, Kahn CR (1999). beta(3)-adrenergic stimulation di-



fferentially inhibits insulin signaling and decreases insulin-induced glucose uptake in brown adipocytes. *J. Biol. Chem.* 274: 34795-34802.

Kleiner S, Mepani RJ, Laznik D, Ye L, Jurczak MJ *et al.* (2012). Development of insulin resistance in mice lacking PGC-1 $\alpha$  in adipose tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 109: 9635-9640.

Klemm DJ, Leitner JW, Watson P, Nesterova A, Reusch JE, Goalstone ML, Draznin B (2001). Insulin-induced adipocyte differentiation. Activation of CREB rescues adipogenesis from the arrest caused by inhibition of prenylation. *J. Biol. Chem.* 276: 28430-28435.

Klieverik LP, Coomans CP, Enderit E, Sauerwein HP, Havekes LM, Voshol PJ, Rensen PC, Romijn JA, Kalsbeek A, Fliers E (2009). Thyroid hormone effects on whole-body energy homeostasis and tissue-specific fatty acid uptake *in vivo*. *Endocrinology* 150: 5639-5648.

Klingenberg M, Huang SG (1999). Structure and function of the uncoupling protein from brown adipose tissue. *Biochim. Biophys. Acta* 1415: 271-296.

Klitgaard HM, Dirks HB Jr, Garlick WR, Barker SB (1952). Protein-bound iodine in various tissues after injection of elemental iodine. *Endocrinology* 50: 170-173.

Knight ZA, González B, Feldman ME, Zunder ER *et al.* (2006). A pharmacological map of the PI3-K family defines a role for p110 $\alpha$  in insulin signaling. *Cell* 125: 733-747.

Kobayashi N, Ueki K, Okazaki Y *et al.* (2011). Blockade of class IB phosphoinositide-3 kinase ameliorates obesity-induced inflammation and insulin resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 108: 5753-5758.

Kohn AD, Summers SA, Birnbaum MJ, Roth RA (1996). Expression of a constitutively active Akt Ser/Thr kinase in 3T3-L1 adipocytes stimulates glucose uptake and glucose transporter 4 translocation. *J. Biol. Chem.* 271: 31372-31378.

Kolditz CI, Langin D (2010). Adipose tissue lipolysis. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* 13: 377-381.

Komander D, Rape M (2012). The ubiquitin code. *Annu. Rev. Biochem.* 81: 203-229.

Kong X, Banks A, Liu T, Kazak L *et al.* (2014). IRF4 is a key thermogenic transcriptional partner of PGC-1 $\alpha$ . *Cell* 158: 69-83.

Konige M, Wang H, Sztalryd C (2014). Role of adipose specific lipid droplet proteins in maintaining whole body energy homeostasis. *Biochim. Biophys. Acta.* 1842: 393-401.

Konishi M, Mikami T, Yamasaki M, Miyake A, Itoh N (2000). Fibroblast growth factor-16 is a growth factor for embryonic brown adipocytes. *J. Biol. Chem.* 275: 12119-12122.

Konishi Y, Stegmüller J, Matsuda T, Bonni S, Bonni A (2004). Cdh1-APC controls axonal growth and patterning in the mammalian brain. *Science* 303: 1026-1030.

Kopecky J, Clarke G, Enerbäck S, Spiegelman B, Kozak LP (1995). Expression of the mitochondrial uncoupling protein gene from the aP2 gene promoter prevents genetic obesity. *J. Clin. Invest.* 96: 2914-2923.

Kopelman PG (2000). Obesity as a medical problem. *Nature* 404: 635-643.

Kozak LP (2011). The genetics of brown adipocyte induction in white fat depots. *Front. Endocrinol.* 2: 64.

Kozak LP, Harper ME (2000). Mitochondrial uncoupling proteins in energy expenditure. *Annu. Rev. Nutr.* 20: 339-363.

## ***-Bibliografía-***

Kozak LP, Koza RA, Anunciado-Koza R (2010). Brown fat thermogenesis and body weight regulation in mice: relevance to humans. *International Journal of Obesity* 34: 23-27.

Kozak UC, Kopecky J, Teisinger J, Enerback S, Boyer B, Kozak LP (1994). An upstream enhancer regulating brown-fat-specific expression of the mitochondrial uncoupling protein gene. *Mol. Cell. Biol.* 14: 59-67.

Kral JG, Naslund E (2007). Surgical treatment of obesity. *Nat. Clin. Pract. Endocrinol. Metab.* 3: 574-583.

Kramarova TV, Shabalina IG, Andersson U, Westerberg R, Carlberg I *et al.* (2008). Mitochondria ATP synthase levels in brown adipose tissue are governed by the c-Fo subunit P1 isoform. *FASEB J.* 22: 55-63.

Krauss S, Zhang CY, Lowell BB (2002). A significant portion of mitochondrial proton leak in intact thymocytes depends on expression of UCP2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 118-122.

Krauss S, Zhang CY, Lowell BB (2005). The mitochondrial uncoupling-protein homologues. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6: 248-261.

Kritchevsky D, Klurfeld DM (1986). Influence of caloric intake on experimental carcinogenesis: a review. *Adv. Exp. Med. Biol.* 206: 55-68.

Krotkiewski M, Björntorp P, Sjöström L, Smith U (1983). Impact of obesity on metabolism in men and women. Importance of regional adipose tissue distribution. *J. Clin. Invest.* 72: 1150-1162.

Krueger KC, Costa MJ, Du H, Feldman BJ (2014). Characterization of cre recombinase activity for *in vivo* targeting of adipocyte precursor cells. *Stem Cell Reports* 3: 1147-1158.

Kruglikov IL, Scherer PE (2016). Dermal adipocytes: from irrelevance to metabolic targets? *Trends Endocrinol Metab.* 27(1): 1-10.

Kumar A, Lawrence JC Jr., Jung DY *et al.* (2010). Fat cell-specific ablation of rictor in mice impairs insulin-regulated fat cell and whole-body glucose and lipid metabolism. *Diabetes* 59: 1397-1406.

Kumar MV, Scarpace PJ (1998). Differential effects of retinoic acid on uncoupling protein-1 and leptin gene expression. *J. Endocrinol.* 157: 237-243.

Kunji ERS (2004). The role and structure of mitochondrial carriers. *FEBS Lett.* 564: 239-244.

Kurat CF, Wolinski H, Petschnigg J *et al.* (2009). Cdk1/Cdc28-dependent activation of the major triacylglycerol lipase Tgl4 in yeast links lipolysis to cell-cycle progression. *Mol. Cell* 33: 53-63.

Kurlawalla-Martínez C, Stiles B, Wang Y, Devaskar SU, Kahn BB, Wu H (2005). Insulin hypersensitivity and resistance to streptozotocin-induced diabetes in mice lacking PTEN in adipose tissue. *Mol. Cell Biol.* 25: 2498-24510.

Kushner JA, Ciemerych MA, Sicinska E, Wartschow LM, Teta M, Long SY *et al.* (2005). Cyclins D2 and D1 are essential for postnatal pancreatic beta-cell growth. *Mol. Cell. Biol.* 25: 3752-3762.

Kwan KM (2002). Conditional alleles in mice: practical considerations for tissue-specific knockouts. *Genesis* 32: 49-62.

Labbé SM, Caron A, Bakan I, Laplante M, Carpentier AC, Lecomte R, Richard D (2015). *In vivo* measurement of energy substrate contribution to cold-induced brown adipose tissue thermogenesis. *FASEB J.* 29: 2046-2058.

Labbé SM, Caron A, Lanfray D, Monge-Rofarello B, Bartness TJ, Richard D (2015). Hypothalamic con-

- trol of brown adipose tissue thermogenesis. *Front. Syst. Neurosci.* 9: 150.
- Lafontan M, Berlan M (1993). Fat cell adrenergic receptors and the control of white and brown fat cell function. *J. Lipid Res.* 34: 1057-1091.
- Lafontan M, Moro C, Berlan M, Crampes F, Sengenès C, Galitzky J (2008). Control of lipolysis by natriuretic peptides and cyclic GMP. *Trends Endocrinol. Metab.* 19: 130-137.
- Lahesmaa M, Orava J, Schalin-Jantti C, Soinio M, Hannukainen JC, Noponen T *et al.* (2014). Hyperthyroidism increases brown fat metabolism in humans. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 99: 28-35.
- Lalioi V, Muruais G, Dinarina A *et al.* (2009). The atypical kinase Cdk5 is activated by insulin, regulates the association between GLUT4 and E-Syt1, and modulates glucose transport in 3T3-L1 adipocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106: 4249-4253.
- Landsberg RL, Sero JE, Danielian PS *et al.* (2003). The role of E2F4 in adipogenesis is independent of its cell cycle regulatory activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100: 2456-2461.
- Langin D (2006). Control of fatty acid and glycerol release in adipose tissue lipolysis. *C. R. Biol.* 329: 598-607.
- Lapice E, Monticelli A, Cocozza S, Pinelli M *et al.* (2014). The energy intake modulates the association of the -55CT polymorphism of UCP3 with body weight in type 2 diabetic patients. *Int. J. Obes.* 38: 873-877.
- Laplante M, Horvat S, Festuccia WT, Birsoy K, Prevorsek Z, Efeyan A, Sabatini DM (2012). DEPTOR cell-autonomously promotes adipogenesis, and its expression is associated with obesity. *Cell Metab.* 16: 202-212.
- Laplante M, Sabatini DM (2009). An emerging role of mTOR in lipid biosynthesis. *Curr. Biol.* 19: 1046-1052.
- Laplante M, Sabatini DM (2009). mTOR signaling at a glance. *J. Cell Sci.* 122: 3589-3594.
- Laplante M, Sabatini DM (2012). mTOR signaling in growth control and disease. *Cell* 149: 274-293.
- Larsen TM, Toubro S, van Baak MA, Gottesdiener KM, Larson P, Saris WH, Astrup A (2002). Effect of a 28-d treatment with L-796568, a novel beta(3)-adrenergic receptor agonist, on energy expenditure and body composition in obese men. *Am. J. Clin. Nutr.* 76: 780-788.
- Larson KA, Anderson DB (1978). The effects of lipectomy on remaining adipose tissue depots in the Sprague Dawley rat. *Growth.* 42: 469-477.
- Lasorella A, Stegmüller J, Guardavaccaro D *et al.* (2006). Degradation of Id2 by the anaphase-promoting complex couples cell cycle exit and axonal growth. *Nature* 442: 471-474.
- Lass A, Zimmermann R, Haemmerle G *et al.* (2006). Adipose triglyceride lipase-mediated lipolysis of cellular fat stores is activated by CGI-58 and defective in Chanarin–Dorfman Syndrome. *Cell Metabolism* 3: 309-319.
- Lass A, Zimmermann R, Oberer M, Zechner R (2011). Lipolysis – a highly regulated multi-enzyme complex mediates the catabolism of cellular fat stores. *Prog. Lipid Res.* 50: 14-27.
- Laustsen PG, Michael MD, Crute BE, Cohen SE *et al.* (2002). Lipoatrophic diabetes in *Irs1<sup>-/-</sup>/Irs3<sup>-/-</sup>* double knockout mice. *Genes Dev.* 16: 3213-3222.
- Lavik PS, Baumann CA (1943). Further studies on the tumor-promoting action of fat. *Cancer Res.* 3: 749-756.

## ***-Bibliografía-***

Lazarou M, Jin SM, Kane LA, Youle RJ (2012). Role of PINK1 binding to the TOM complex and alternate intracellular membranes in recruitment and activation of the E3 ligase Parkin. *Dev. Cell* 22: 320-333.

Lazarou M, Sliter DA, Kane LA, Sarraf SA *et al.* (2015). The ubiquitin kinase PINK1 recruits autophagy receptors to induce mitophagy. *Nature* 524: 309-314.

Le Bacquer O, Petroulakis E, Pagliarunga S, Poulin F, Richard D, Cianflone K, Sonenberg N (2007). Elevated sensitivity to diet-induced obesity and insulin resistance in mice lacking 4E-BP1 and 4E-BP2. *J. Clin. Invest.* 117: 387-396.

LeBlanc ES, O'Connor E, Whitlock PD, Patnode CD, Kapka T (2011). Effectiveness of primary care-relevant treatments for obesity in adults: a systematic evidence review for the U. S. Preventive Services Task Force. *Ann. Int. Med.* 155: 434-447.

Ledesma A, de Lacoba MG, Rial E (2002). The mitochondrial uncoupling proteins. *Genome Biology* 3: 3015.1-3015.9.

Lee J, Choi J, Aja S, Scafidi S, Wolfgang MJ (2016). Loss of adipose fatty acid oxidation does not potentiate obesity at thermoneutrality. *Cell Reports* 14: 1-9.

Lee J, Ellis JM, Wolfgang MJ (2015). Adipose fatty acid oxidation is required for thermogenesis and potentiates oxidative stress-induced inflammation. *Cell Rep.* 10: 266-279.

Lee JE, Ge K (2014). Transcriptional and epigenetic regulation of PPAR $\gamma$  expression during adipogenesis. *Cell & Bioscience* 4: 29.

Lee JT, Shan J, Zhong J, Li M, Zhou B, Zhou A *et al.* (2013). RFP-mediated ubiquitination of PTEN modulates its effect on AKT activation. *Cell Res.* 23: 552-564.

Lee JY, Takahashi N, Yasubuchi M, Kim YI, Hashizaki H, Kim MJ, Sakamoto T, Goto T, Kawada T (2011). Triiodothyronine induces UCP1 expression and mitochondrial biogenesis in human adipocytes. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 302: 463-472.

Lee KY, Russell SJ, Ussar S *et al.* (2013). Lessons on conditional gene targeting in mouse adipose tissue. *Diabetes* 62: 864-874.

Lee MJ, Gong DW, Burkey BF, Fried SK (2011). Pathways regulated by glucocorticoids in omental and subcutaneous human adipose tissues: a microarray study. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 300: 571-580.

Lee MJ, Pramyothin P, Karastergiou K, Fried SK (2014). Deconstructing the roles of glucocorticoids in adipose tissue biology and the development of central obesity. *Biochimica et Biophysica Acta* 1842: 473-481.

Lee MJ, Wu Y, Fried SK (2012). Adipose tissue heterogeneity: implication of depot differences in adipose tissue for obesity complications. *Mol. Aspects Med.* 34: 1-11.

Lee P, Werner CD, Kebebew E, Celi FS (2014). Functional thermogenic beige adipogenesis is inducible in human neck fat. *Int. J. Obes.* 38: 170-176.

Lee RJ, Liu CW, Harty C *et al.* (2004). Uncoupling retro-translocation and degradation in the ER-associated degradation of a soluble protein. *EMBO J.* 23: 2206-2215.

Lee SB, Kim JJ, Nam HJ, Gao B *et al.* (2015). Parkin regulates mitosis and genomic stability through Cdc20/Cdh1. *Mol. Cell.* 60: 21-34.

Lee Y, Dominy JE, Choi YJ, Jurczak M, Tolliday N, Camporez JP, Chim H, Lim JH, Ruan HB, Yang X, Vázquez F, Sicinski P, Shulman GI, Puigserver P (2014). Cyclin D1-Cdk4 controls glucose metabolism independently of cell cycle progression. *Nature* 510: 547-551.

- Lee YH, Jung YS, Choi D (2014). Recent advance in brown adipose physiology and its therapeutic potential. *Exp. Mol. Med.* 46: e78.
- Lee YH, Mottillo EP, Granneman JG (2014). Adipose tissue plasticity from WAT to BAT and in between. *Biochim. Biophys. Acta.* 1842: 358-369.
- Lee YH, Petkova AP, Konkar AA, Granneman JG (2015). Cellular origins of cold-induced brown adipocytes in adult mice. *FASEB J.* 29: 286-299.
- Lee YH, Petkova AP, Mottillo EP, Granneman JG (2012). *In vivo* identification of bipotential adipocyte progenitors recruited by  $\beta$ 3-adrenoceptor activation and high-fat feeding. *Cell Metab.* 15: 480-491.
- Lefterova MI, Haakonsson AK, Lazar MA, Mandrup S (2014). PPAR $\gamma$  and the global map of adipogenesis and beyond. *Trends Endocrinol. Metab.* 25: 293-302.
- Lefterova MI, Lazar MA (2009). New developments in adipogenesis. *Trends in Endocrinology and Metabolism* 20: 107-114.
- Lefterova MI, Zhang Y, Steger DJ, Schupp M, Schug J, Cristancho A, Feng D, Zhuo D, Stoeckert CJ, Jr Liu XS *et al.* (2008). PPAR $\gamma$  and C/EBP factors orchestrate adipocyte biology via adjacent binding on a genome-wide scale. *Genes Dev.* 22: 2941-2952.
- Lehmann G, Udasin RG, Ciechanover A (2016). On the linkage between the ubiquitin-proteasome system and the mitochondria. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 473: 80-86.
- Lehmann G, Ziv T, Braten O, Admon A, Udasin RG, Ciechanover A (2016). Ubiquitination of specific mitochondrial matrix proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 475: 13-18.
- Lehmann JM, Moore LB, Smith-Oliver TA, Wilkison WO, Willson TM, Kliewer SA (1995). An antidiabetic thiazolidinedione is a high-affinity ligand for peroxisome proliferator-activated receptor gamma (Ppar $\gamma$ ). *J. Biol. Chem.* 270: 12953-12956.
- Lehr L, Canola K, Asensio C, Jiménez M, Kuehne F, Giacobino JP, Muzzin P (2006). The control of UCP1 is dissociated from that of PGC-1 $\alpha$  or of mitochondriogenesis as revealed by a study using beta-less mouse brown adipocytes in culture. *FEBS Lett.* 580: 4661-4666.
- Lehrke M, Lazar MA (2005). The many faces of PPAR $\gamma$ . *Cell* 123: 993-999.
- Lelliott C, Vidal-Puig A (2004). Lipotoxicity, an imbalance between lipogenesis de novo and fatty acid oxidation. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* 28: 22-28.
- Leonardsson G, Steel JH, Christian M, Pocock V, Milligan S *et al.* (2004). Nuclear receptor corepressor RIP140 regulates fat accumulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101: 8437-8442.
- Lepper C, Fan CM (2010). Inducible lineage tracing of Pax7-descendant cells reveals embryonic origin of adult satellite cells. *Genesis* 48: 424-436.
- Leslie NR, Kriplani N, Hermida MA, Álvarez-García V, Wise HM (2016). The PTEN protein: cellular localization and post-translational regulation. *Biochem. Soc. Trans.* 44: 273-278.
- Li H, Cheng Y, Wu W, Liu Y, Wei N, Feng X, Xie Z, Feng Y (2014). SRSF10 regulates alternative splicing and is required for adipocyte differentiation. *Mol. Cell. Biol.* 34: 2198-2207.
- Li M, Shin YH, Hou L, Huang X, Wei Z, Klann E, Zhang P (2008). The adaptor protein of the anaphase promoting complex Cdh1 is essential in maintaining replicative lifespan and in learning and memory. *Nat. Cell Biol.* 10: 1083-1089.

## ***-Bibliografía-***

- Li M, Zhang P (2009). The function of APC/CCdh1 in cell cycle and beyond. *Cell Div.* 4:2.
- Li W, Wu G, Wan Y (2007). The dual effects of Cdh1/APC in myogenesis. *FASEB J.* 21: 3606-3617.
- Li X, Kim JW, Grønborg M, Urlaub H, Lane MD, Tang QQ (2007). Role of cdk2 in the sequential phosphorylation/activation of C/EBP during adipocyte differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104: 11597-11602.
- Lidell ME, Betz MJ, Leinhard OD, Heglind M, Elander L, Slawik M, Mussack T *et al.* (2013). Evidence for two types of brown adipose tissue in humans. *Nat. Med.* 19: 631-634.
- Lilja L, Yang SN, Webb DL, Juntti-Berggren L, Berggren PO, Bark C (2001). Cyclin-dependent kinase 5 promotes insulin exocytosis. *J. Biol. Chem.* 276: 34199-34205.
- Lin CS, Hackenberg H, Klingenberg EM (1980). The uncoupling protein from brown adipose tissue mitochondria is a dimer. A hydrodynamic study. *FEBS Lett.* 113: 304-306.
- Lin CS, Xin ZC, Deng CH, Ning H, Lin G, Lue TF (2010). Defining adipose tissue-derived stem cells in tissue and in culture. *Histol. Histopathol.* 25: 807-815.
- Lin J, Cao C, Tao C, Ye R *et al.* (2017). Cold adaptation in pigs depends on UCP3 in beige adipocytes. *J. Mol. Cell Biol.*: 1-12.
- Lin J, Della-Fera MA, Li C *et al.* (2003). p27 knockout mice: reduced myostatin in muscle and altered adipogenesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 300: 938-942.
- Lin J, Wu PH, Tarr PT, Lindenberg KS, St-Pierre J *et al.* (2004). Defects in adaptive energy metabolism with CNS-linked hyperactivity in PGC-1 $\alpha$  null mice. *Cell* 119: 121-135.
- Lin JZ, Martagón AJ, Cimini SL, González DD, Tinkey DW, Biter A, Baxter JD, Webb P, Gustafsson JA, Hartig SM *et al.* (2015). Pharmacological activation of thyroid hormone receptors elicits a functional conversion of white to brown fat. *Cell Rep.* 13: 1528-1537.
- Ling Q, Jarvis P (2013). Dynamic regulation of endosymbiotic organelles by ubiquitination. *Trends Cell Biol.* 23: 399-408.
- Lionaki E, Markaki M, Palikaras K, Tavernarakis N (2015). Mitochondria, autophagy and age-associated neurodegenerative diseases: new insights into a complex interplay. *Biochim. Biophys. Acta* 1847: 1412-1423.
- Listovsky T, Oren YS, Yudkovsky Y, Mahbubani HM, Weiss AM, Lebediker M, Brandeis M (2004). Mammalian Cdh1/Fzr mediates its own degradation. *EMBO J.* 23: 1619-1626.
- Liu D, Bordicchia M, Zhang C, Fang H *et al.* (2016). Activation of mTORC1 is essential for  $\beta$ -adrenergic stimulation of adipose browning. *J. Clin. Invest.* 126: 1704-1716.
- Liu J, Wan L, Jing Liu J, Yuan Z *et al.* (2016). Cdh1 inhibits WWP2-mediated ubiquitination of PTEN to suppress tumorigenesis in an APC-independent manner. *Cell Discovery* 2: 15044.
- Liu X, Cervantes C, Liu F (2017). Common and distinct regulation of human and mouse brown and beige adipose tissues: a promising therapeutic target for obesity. *Protein Cell* 8: 446-454.
- Liu X, Rossmeisl M, McClaine J, Riachi M, Harper ME, Kozak LP (2003). Paradoxical resistance to diet-induced obesity in UCP1-deficient mice. *J. Clin. Invest.* 111: 399-407.
- Livnat-Levanon N, Glickman MH (2011). Ubiquitin-proteasome system and mitochondria – reciprocity. *Biochim. Biophys. Acta* 1809: 80-87.

- Lockie SH, Stefanidis A, Oldfield BJ, Pérez-Tilve D (2013). Brown adipose tissue thermogenesis in the resistance to and reversal of obesity. *Adipocyte* 2: 196-200.
- Loft A, Forss I, Siersbæk MS, Schmidt SF, Larsen AS *et al.* (2015). Browning of human adipocytes requires KLF11 and reprogramming of PPAR $\gamma$  superenhancers. *Genes Dev.* 29: 7-22.
- Lombardi A, Busiello RA, Napolitano L *et al.* (2010). UCP3 translocates lipid hydroperoxide and mediates lipid hydroperoxide-dependent mitochondrial uncoupling. *J. Biol. Chem.* 285: 16599-16605.
- Lombardi A, Grasso P, Moreno M *et al.* (2008). Interrelated influence of superoxides and free fatty acids over mitochondrial uncoupling in skeletal muscle. *Biochim. Biophys. Acta* 1777: 826-833.
- Loncar D (1991). Convertible adipose tissue in mice. *Cell Tissue Res.* 266: 149-161.
- Loncar D, Bedrica L, Mayer J, Cannon B, Nedergaard J, Afzelius BA *et al.* (1986). The effect of intermittent cold treatment on the adipose tissue of the cat. Apparent transformation from white to brown adipose tissue. *J. Ultrastruct. Mol. Struct. Res.* 97: 119-129.
- Long JZ, Svensson KJ, Tsai L, Zeng X, Roh HC, Kong X, Rao RR, Lou J, Lokurkar I, Baur W, Castellot JJ Jr, Rosen ED, Spiegelman BM (2014). A smooth muscle-like origin for beige adipocytes. *Cell Metab.* 19: 810-820.
- Longo KA, Wright WS, Kang S *et al.* (2004). Wnt10b inhibits development of white and brown adipose tissues. *J. Biol. Chem.* 279: 35503-35509.
- Lopes PC, Fuhrmann A, Sereno J, Pereira MJ *et al.* (2013). Effects of cyclosporine and sirolimus on insulin-stimulated glucose transport and glucose tolerance in a rat model. *Transplant. Proc.* 45: 1142-1148.
- Lopes PC, Fuhrmann A, Sereno J, Espinoza DO *et al.* (2014). Short and long term *in vivo* effects of Cyclosporine A and Sirolimus on genes and proteins involved in lipid metabolism in Wistar rats. *Metabolism* 63: 702-715.
- López M, Varela L, Vázquez MJ, Rodríguez-Cuenca S, González CR, Velagapudi VR, Morgan DA, Schoenmakers E *et al.* (2010). Hypothalamic AMPK and fatty acid metabolism mediate thyroid regulation of energy balance. *Nat. Med.* 16: 1001-1008.
- López-Mejía IC, Fajas L (2015). Cell cycle regulation of mitochondrial function. *Curr. Opin. Cell Biol.* 33: 19-25.
- Lowe CE, O'Rahilly S, Rochford JJ (2011). Adipogenesis at a glance. *Journal of Cell Science* 124: 2681-2686.
- Lukas C, Sorensen CS, Kramer E, Santoni-Rugiu E, Lindeneg C, Peters JM, Bartek J, Lukas J (1999). Accumulation of cyclin B1 requires E2F and cyclin-A-dependent rearrangement of the anaphase-promoting complex. *Nature* 401: 815-818.
- Lumeng CN, Deyoung SM, Saltiel AR (2007). Macrophages block insulin action in adipocytes by altering expression of signaling and glucose transport proteins. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 292: 166-174.
- Lynes MD, Schulz TM, Pan AJ, Tseng YH (2015). Disruption of insulin signaling in Myf5-expressing progenitors leads to marked paucity of brown fat but normal muscle development. *Endocrinology* 156: 1637-1647.
- MacLaren W, Cui W, Cianflone K (2008). Adipokines and the immune system: an adipocentric view. *Adv. Exp. Med. Biol.* 632: 1-21.
- Machida YJ, Dutta A (2007). The APC/C inhibitor, Emi1, is essential for prevention of rereplication. *Ge-*

## ***-Bibliografía-***

*nes Dev.* 21: 184-194.

Maddika S, Kavela S, Rani N, Palicharla VR, Pokorny JL, Sarkaria JN *et al.* (2011). WWP2 is an E3 ubiquitin ligase for PTEN. *Nat. Cell Biol.* 13: 728-733.

Madsen L, Pedersen LM, Lillefosse HH, Fjaere E, Bronstad I *et al.* (2010). UCP1 induction during recruitment of brown adipocytes in white adipose tissue is dependent on cyclooxygenase activity. *PLoS One* 5: e11391.

Maeda K, Okubo K, Shimomura I, Funahashi T, Matsuzawa Y, Matsubara K (1996). cDNA cloning and expression of a novel adipose specific collagen-like factor, apM1 (adipose most abundant gene transcript 1). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 221: 286-289.

Maehama T, Dixon JE (1998). The tumor suppressor, PTEN/MMAC1, dephosphorylates the lipid second messenger, phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate. *J. Biol. Chem.* 273: 13375-13378.

Maestre C, Delgado-Esteban M, Gómez-Sánchez JC, Bolaños JP, Almeida A (2008). Cdk5 phosphorylates Cdh1 and modulates cyclin B1 stability in excitotoxicity. *EMBO J.* 27: 2736-2745.

Magdalon J, Chimin P, Belchior T, Neves RX, Vieira-Lara MA (2016). Constitutive adipocyte mTORC1 activation enhances mitochondrial activity and reduces visceral adiposity in mice. *Biochim. Biophys. Acta.* 1861: 430-438.

Magnuson B, Ekim B, Fingar DC (2012). Regulation and function of ribosomal protein S6 kinase (S6K) within mTOR signalling networks. *Biochem. J.* 441: 1-21.

Malik M, van Gelderen EM, Lee JH, Kowalski DL, Yen M, Goldwater R, Mujais SK, Schaddelee MP, de Koning P, Kaibara A *et al.* (2012). Proarrhythmic safety of repeat doses of mirabegron in healthy subjects: a randomized, double-blind, placebo-, and active-controlled thorough QT study. *Clin. Pharmacol. Ther.* 92: 696-706.

Malumbres M, Barbacid M (2005). Mammalian cyclin-dependent kinases. *Trends Biochem. Sci.* 30: 630-641.

Manchado E, Eguren M, Malumbres M (2010). The anaphase-promoting complex/cyclosome (APC/C): cell-cycle-dependent and -independent functions. *Biochem. Soc. Trans.* 38: 65-71.

Manganiello VC, Smith CJ, Degerman E, Vasta V, Tornqvist H, Belfrage P (1991). Molecular mechanisms involved in the antilipolytic action of insulin: phosphorylation and activation of a particulate adipocyte cAMP phosphodiesterase. *Adv. Exp. Med. Biol.* 293: 239-248.

Manning BD, Tee AR, Logsdon MN, Blenis J, Cantley LC (2002). Identification of the tuberous sclerosis complex-2 tumor suppressor gene product tuberlin as a target of the phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway. *Mol. Cell* 10: 151-162.

Manolopoulos KN, Karpe F, Frayn KN (2010). Gluteofemoral body fat as a determinant of metabolic health. *Int. J. Obes.* 34: 949-959.

Marangos P, Verschuren EW, Chen R, Jackson PK, Carroll J (2007). Prophase I arrest and progression to metaphase I in mouse oocytes are controlled by Emi1-dependent regulation of APC(Cdh1). *J. Cell Biol.* 176: 65-75.

Margineantu DH, Emerson CB, Díaz D, Hockenbery DM (2007). Hsp90 inhibition decreases mitochondrial protein turnover. *PLoS One* 2: e1066.

Márquez MP, Alencastro F, Madrigal A *et al.* (2017). The role of cellular proliferation in adipogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev.* 26: 1578-1595.



- Marsili A, Aguayo-Mazzucato C, Chen T, Kumar A, Chung M, Lunsford EP *et al.* (2011). Mice with a targeted deletion of the type 2 deiodinase are insulin resistant and susceptible to diet induced obesity. *PLoS ONE* 6: e20832.
- Martens K, Bottelbergs A, Baes M (2010). Ectopic recombination in the central and peripheral nervous system by aP2/FABP4-Cre mice: implications for metabolism research. *FEBS Lett.* 584: 1054-1058.
- Martínez JS, Jeong DE, Choi E, Billings BM, Hall MC (2006). Acm1 is a negative regulator of the CDH1-dependent anaphase-promoting complex/cyclosome in budding yeast. *Mol. Cell Biol.* 26: 9162-9176.
- Martínez-De-Mena R, Obregón MJ (2014). T3 regulated genes in brown adipocytes (P200). *Eur. Thyroid J.* 3: 167.
- Masuzaki H, Paterson J, Shinyama H *et al.* (2001). A transgenic model of visceral obesity and the metabolic syndrome. *Science* 294: 2166-2170.
- Mataki C, Elliott PJ, Auwerx J (2008). Specific SIRT1 activation mimics low energy levels and protects against diet-induced metabolic disorders by enhancing fat oxidation. *Cell Metab.* 8: 347-358.
- Matsushime H, Ewen ME, Strom DK, Kato JY, Hanks SK, Rousel MF, Sherr CJ (1992). Identification and properties of an atypical catalytic subunit (p34PSK-J3/cdk4) for mammalian D type G1 cyclins. *Cell* 71: 323-334.
- Matthias A, Ohlson KB, Fredriksson JM, Jacobsson A, Nedergaard J, Cannon B (2000). Thermogenic responses in brown fat cells are fully UCP1-dependent. UCP2 or UCP3 do not substitute for UCP1 in adrenergically or fatty acid-induced thermogenesis. *J. Biol. Chem.* 275: 25073-25081.
- Mattson MP (2010). Perspective: does brown fat protect against diseases of aging? *Ageing Research Reviews* 9: 69-76.
- Mayer TU, Braun T, Jentsch S (1998). Role of the proteasome in membrane extraction of a short-lived ER-transmembrane protein. *EMBO J.* 17: 3251-3257.
- Mayr B, Montminy M (2001). Transcriptional regulation by the phosphorylation-dependent factor CREB. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 2: 599-609.
- McLean JR, Chaix D, Ohi MD, Gould KL (2011). State of the APC/C: organization, function, and structure. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 46: 118-136.
- McQuaid SE, Humphreys SM, Hodson L, Fielding BA, Karpe F, Frayn KN (2010). Femoral adipose tissue may accumulate the fat that has been recycled as VLDL and nonesterified fatty acids. *Diabetes* 59: 2465-2473.
- McWilliams TG, Muqit MM (2017). PINK1 and Parkin: emerging themes in mitochondrial homeostasis. *Curr. Opin. Cell Biol.* 45: 83-91.
- Medema RH, Kops GJ, Bos JL, Burgering BM (2000). AFX-like forkhead transcription factors mediate cell-cycle regulation by Ras and PKB through p27kip1. *Nature* 404: 782-787.
- Medina-Gómez G, Calvo RM, Obregón MJ (2008). Thermogenic effect of triiodothyroacetic acid at low doses in rat adipose tissue without adverse side effects in the thyroid axis. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 294: 688-697.
- Medina-Gómez G, Hernández A, Calvo RM, Martín E, Obregón MJ (2003). Potent thermogenic action of triiodothyroacetic acid in brown adipocytes. *Cell Mol. Life Sci.* 60: 1957-1967.
- Meisinger C, Döring A, Thorand B, Heier M, Löwel H (2006). **Body fat distribution and risk of type 2 diabetes in the general population: are there differences between men and women? The MONICA/KORA Augsburg Cohort Study.** *Am. J. Clin. Nutr.* 84: 483-489.

## ***-Bibliografía-***

- Melicow MM (1957). Hibernating fat and pheochromocytoma. *AMA Arch. Pathol.* 63: 367-372.
- Melnikova I, Wages D (2006). Anti-obesity therapies. *Nat. Rev. Drug Discov.* 5: 369-370.
- Menghini R, Marchetti V, Cardellini M, Hribal ML, Mauriello A, Lauro D, Sbraccia P, Lauro R, Federici M (2005). Phosphorylation of GATA2 by Akt increases adipose tissue differentiation and reduces adipose tissue-related inflammation: a novel pathway linking obesity to atherosclerosis. *Circulation* 111: 1946-1953.
- Mensink M, Hesselink MK, Borghouts LB *et al.* (2007). Skeletal muscle uncoupling protein-3 restores upon intervention in the prediabetic and diabetic state: implications for diabetes pathogenesis? *Diabetes Obes. Metab.* 9: 594-596.
- Mercader J, Palou A, Bonet ML (2010). Induction of uncoupling protein-1 in mouse embryonic fibroblast-derived adipocytes by retinoic acid. *Obesity* 18: 655-662.
- Mercader J, Ribot J, Murano I *et al.* (2006). Remodeling of white adipose tissue after retinoic acid administration in mice. *Endocrinology* 147: 5325-5332.
- Mercader J, Ribot J, Murano I, Feddersen S, Cinti S, Madsen L, Kristiansen K, Bonet ML, Palou A (2009). Haploinsufficiency of the retinoblastoma protein gene reduces diet-induced obesity, insulin resistance, and hepatosteatosis in mice. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 297: 184-193.
- Meyer CW, Willershauer M, Jastroch M, Rourke BC, Fromme T, Oelkrug R, Heldmaier G, Klingenspor M (2010). Adaptive thermogenesis and thermal conductance in wild-type and UCP1-KO mice. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 299: 1396-1406.
- Meyer H, Bug M, Bremer S (2012). Emerging functions of the VCP/p97 AAA- ATPase in the ubiquitin system. *Nat. Cell Biol.* 14: 117-123.
- Meza-Gutiérrez F, Hundley FV, Toczyski DP (2015). Parallel Parkin: Cdc20 takes a new partner. *Mol. Cell.* 60: 3-4.
- Miard S, Fajas L (2005). Atypical transcriptional regulators and cofactors of PPARc. *International Journal of Obesity* 29: 10-12.
- Miki H, Yamauchi T, Suzuki R, Komeda K, Tsuchida A, Kubota N, Terauchi Y, Kamon J, Kaburagi Y, Matsui J *et al.* (2001). Essential role of insulin receptor substrate 1 (IRS-1) and IRS-2 in adipocyte differentiation. *Mol. Cell Biol.* 21: 2521-2532.
- Miller JJ, Summers MK, Hansen DV, Nachury MV, Lehman NL, Loktev A, Jackson PV (2006). Emi1 stably binds and inhibits the anaphase-promoting complex/cyclosome as a pseudosubstrate inhibitor. *Genes Dev.* 20: 2410-2420.
- Minard AY, Tan SX, Yang P, Fazakerley DJ *et al.* (2016). mTORC1 is a major regulatory node in the FGF21 signaling network in adipocytes. *Cell Reports* 17: 29-36.
- Miner JL (2004). The adipocyte as an endocrine cell. *J. Anim. Sci.* 82: 935-941.
- Mitschke MM, Hoffmann LS, Gnad T, Scholz D, Kruihoff K *et al.* (2013). Increased cGMP promotes healthy expansion and browning of white adipose tissue. *FASEB J.* 27: 1621-1630.
- Miwa H, Era T (2015). Generation and characterization of PDGFRa-GFPCreERT2 knock-in mouse line. *Genesis* 53: 329-336.
- Moazed B, Desautels M (2002). Differentiation-dependent expression of cathepsin D and importance of lysosomal proteolysis in the degradation of UCP1 in brown adipocytes. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*

80: 515-525.

Moldes M, Zuo Y, Morrison RF, Silva D, Park BH, Liu J, Farmer SR (2003). Peroxisome-proliferator-activated receptor  $\gamma$  suppresses Wnt/ $\beta$ -catenin signalling during adipogenesis. *Biochem. J.* 376: 607-613.

Mookerjee SA, Brand MD (2011). Characteristics of the turnover of uncoupling protein 3 by the ubiquitin proteasome system in isolated mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta.* 1807: 1474-1481.

Moreno-Navarrete JM, Fernández-Real JM (2012). Adipocyte Differentiation. In ME Symonds (Ed) *Adipose tissue biology*. Springer.

Morrison RF, Farmer SR (1999). Role of PPAR $\gamma$  in regulating a cascade expression of cyclin-dependent kinase inhibitors, p18(INK4c) and p21(Waf1/Cip1), during adipogenesis. *J. Biol. Chem.* 274: 17088-17097.

Morrison SF, Madden CJ, Tupone D (2012). Central control of brown adipose tissue thermogenesis. *Front. Endocrinol.* 2012; 3: 00005.

Mottillo EP, Desjardins EM, Crane JD, Smith BK *et al.* (2016). Lack of adipocyte AMPK exacerbates insulin resistance and hepatic steatosis through brown and beige adipose tissue function. *Cell Metabolism* 24: 118-129.

Mullican SE, Tomaru T, Gaddis CA, Peed LC, Sundaram A, Lazar MA (2013). A novel adipose-specific gene deletion model demonstrates potential pitfalls of existing methods. *Mol. Endocrinol.* 27: 127-134.

Mullins GR, Wang L, Raje V *et al.* (2014). Catecholamine-induced lipolysis causes mTOR complex dissociation and inhibits glucose uptake in adipocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 111: 17450-17455.

Munekata K, Sakamoto K (2009). Forkhead transcription factor Foxo1 is essential for adipocyte differentiation. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* 45: 642-651.

Muruáis G, Lalioti V, Sandoval IV (2009). The Cdk5 inhibitor roscovitine strongly inhibits glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes without altering GLUT4 translocation from internal pools to the cell surface. *J. Cell Physiol.* 220: 238-244.

Musa CV, Mancini A, Alfieri A, Labruna G *et al.* (2012). Four novel UCP3 gene variants associated with childhood obesity: effect on fatty acid oxidation and on prevention of triglyceride storage. *Int. J. Obes.* 36: 207-217.

Musacchio A, Salmon ED (2007). The spindle-assembly checkpoint in space and time. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8: 379-393.

Muzik O, Mangner TJ, Granneman JG (2012). Assessment of oxidative metabolism in brown fat using PET imaging. *Front. Endocrinol.* 3: 15.

Myung J, Kim KM, Crews CM (2001). The ubiquitin-proteasome pathway and proteasome inhibitors. *Med. Res. Rev.* 21: 245-273.

Naaz A, Holsberger DR, Iwamoto GA *et al.* (2004). Loss of cyclin-dependent kinase inhibitors produces adipocyte hyperplasia and obesity. *Faseb. J.* 18: 1925-1927.

Nabben M, Hoeks J, Briede JJ, Glatz JF *et al.* (2008). The effect of UCP3 overexpression on mitochondrial ROS production in skeletal muscle of young versus aged mice. *FEBS Lett.* 582: 4147-4152.

Nabben M, Hoeks J, Moonen-Kornips E, van Beurden D *et al.* (2011). Significance of uncoupling protein 3 in mitochondrial function upon mid- and long-term dietary high-fat exposure. *FEBS Lett.* 585: 4010-4017.

Nakae J, Cao Y, Oki M, Orba Y, Sawa H, Kiyonari H, Iskandar K, Suga K, Lombes M, Hayashi Y (2008).

## ***-Bibliografía-***

Forkhead transcription factor FoxO1 in adipose tissue regulates energy storage and expenditure. *Diabetes* 57: 563-576.

Nakae J, Kitamura T, Kitamura Y, Biggs WH 3rd, Arden KC, Accili D (2003). The forkhead transcription factor Foxo1 regulates adipocyte differentiation. *Dev. Cell* 4: 119-129.

Nakayama K, Nagahama H, Minamishima YA *et al.* (2004). Skp2-mediated degradation of p27 regulates progression into mitosis. *Dev. Cell* 6: 661-672.

Nakayama KI, Nakayama K (2005). Regulation of the cell cycle by SCF-type ubiquitin ligases. *Semin. Cell Dev. Biol.* 16: 323-333.

Nam M, Lee WH, Bae EJ, Kim SG (2008). Compound C inhibits clonal expansion of preadipocytes by increasing p21 level irrespectively of AMPK inhibition. *Arch. Biochem. Biophys.* 479: 74-81.

Naoe H, Araki K, Nagano O *et al.* (2010). The anaphase-promoting complex/cyclosome activator Cdh1 modulates Rho GTPase by targeting p190 RhoGAP for degradation. *Mol. Cell Biol.* 30: 3994-4005.

Narendra D, Tanaka A, Suen DF, Youle RJ (2008). Parkin is recruited selectively to impaired mitochondria and promotes their autophagy. *J. Cell Biol.* 183: 795-803.

Narendra NP, Jin SM, Tanaka A *et al.* (2010). PINK1 is selectively stabilized on impaired mitochondria to activate Parkin. *PLoS Biol.* 8: e1000298.

Nedergaard J, Bengtsson T, Cannon B (2007). Unexpected evidence for active brown adipose tissue in adult humans. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 293: 444-452.

Nedergaard J, Cannon B (2003). The 'novel' 'uncoupling' proteins UCP2 and UCP3: what do they really do? Pros and cons for suggested functions. *Exp. Physiol.* 88: 65-84.

Nedergaard J, Cannon B (2014). The browning of white adipose tissue: some burning issues. *Cell Metab.* 20: 396-407.

Nelson VL, Jiang YP, Dickman KG, Ballou LM, Lin RZ (2014). Adipose tissue insulin resistance due to loss of PI3K p110 leads to decreased energy expenditure and obesity. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 306: 1205-1216.

Nevins JR (1992). E2F: a link between the Rb tumor suppressor protein and viral oncoproteins. *Science* 258: 424-429.

Nguyen DX, McCance DJ (2005). Role of the retinoblastoma tumor suppressor protein in cellular differentiation. *J. Cell Biochem.* 94: 870-879.

Nicklas BJ, Penninx BW, Ryan AS, Berman DM, Lynch NA, Dennis KE (2003). Visceral adipose tissue cutoffs associated with metabolic risk factors for coronary heart disease in women. *Diabetes Care* 26: 1413-1420.

Nicolay BN, Dyson NJ (2013). The multiple connections between pRB and cell metabolism. *Current Opinion in Cell Biology* 25: 1-6.

Nicholls DG (2006). The physiological regulation of uncoupling proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 1757: 459-466.

Nicholls DG, Bernson VS, Heaton GM (1978). The identification of the component in the inner membrane of brown adipose tissue mitochondria responsible for regulating energy dissipation. *Experientia Suppl.* 32: 89-93.

Nicholls DG, Locke RM (1984). Thermogenic mechanisms in brown fat, *Physiol. Rev.* 64: 1-64.

Nicholls DG, Rial E (2016). A novel regulatory mechanism for the brown-fat uncoupling protein? *Nat. Struct. Mol. Biol.* 23: 364-365.

Nielsen R, Pedersen TA, Hagenbeek D, Moulos P, Siersbaek R, Megens E, Denissov S, Borgesen M, Francoijs KJ, Mandrup S *et al.* (2008). Genome-wide profiling of PPARgamma: RXR and RNA polymerase II occupancy reveals temporal activation of distinct metabolic pathways and changes in RXR dimer composition during adipogenesis. *Genes Dev.* 22: 2953-2967.

Nielsen TS, Jessen N, Jørgensen JO, Møller N, Lund S (2014). Dissecting adipose tissue lipolysis: molecular regulation and implications for metabolic disease. *J. Mol. Endocrinol.* 52: 199-222.

Niemelä S, Miettinen S, Sarkanen JR, Ashammakhi N (2008). Adipose tissue and adipocyte differentiation: molecular and cellular aspects and tissue engineering applications. In Ashammakhi N, Reis R, Chiellini F (Eds.) *Topics in tissue engineering*, chapter 4: 1-26.

Noda A, Ning Y, Venable SF, Pereira-Smith OM, Smith JR (1994). Cloning of senescent cell-derived inhibitors of DNA synthesis using an expression screen. *Exp. Cell Res.* 211: 90-98.

Nogueira V, Sundararajan D, Kwan JM, Peng XD *et al.* (2012). Akt-dependent Skp2 mRNA translation is required for exiting contact inhibition, oncogenesis, and adipogenesis. *EMBO J.* 31: 1134-1146.

Ntambi JM, Kim YC (2000). Adipocyte differentiation and gene expression. *J. Nutr.* 130: 3122-3126.

Oakes ND, Thalen PG, Jacinto SM, Ljung B (2001). Thiazolidinediones increase plasma-adipose tissue FFA exchange capacity and enhance insulin-mediated control of systemic FFA availability. *Diabetes* 50: 1158-1165.

Oberkofler H, Dallinger G, Liu YM, Hell E, Krempler F, Patsch W (1997). Uncoupling protein gene: quantification of expression levels in adipose tissues of obese and non-obese humans. *J. Lipid. Res.* 38: 2125-2133.

Obermaier B, Ermel B, Kirsch D, Mushack J, Rattenhuber E, Biemer E, Machicao F, Haring HU (1987). Catecholamines and tumour promoting phorbol esters inhibit insulin receptor kinase and induce insulin resistance in isolated human adipocytes. *Diabetologia* 30: 93-99.

Obregón MJ (2014). Adipose tissues and thyroid hormones. *Front Physiol.* 5: 479.

Ohno H, Shinoda K, Spiegelman BM, Kajimura S (2012). PPARgamma agonists induce a white-to-brown fat conversion through stabilization of PRDM16 protein. *Cell Metab.* 15: 395-404.

Okada M, Sakai T, Nakamura T, Tamamori-Adachi M, Kitajima S, Matsuki Y *et al.* (2009). Skp2 promotes adipocyte differentiation via a p27Kip1-independent mechanism in primary mouse embryonic fibroblasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 379: 249-254.

Olsen JM, Sato M, Dallner OS *et al.* (2014). Glucose uptake in brown fat cells is dependent on mTOR complex 2-promoted GLUT1 translocation. *J. Cell Biol.* 207: 365-374.

Olshansky SJ, Passaro DJ, Hershow RC, Layden J, Carnes BA, Brody J, Hayflick L, Butler RN, Allison DB, Ludwig DS (2005). A potential decline in life expectancy in the United States in the 21st century. *N. Engl. J. Med.* 352: 1138-1145.

Omar B, Zmuda-Trzebiatowska E, Manganiello V, Göransson O, Degerman E (2009). Regulation of AMP-activated protein kinase by cAMP in adipocytes: roles for phosphodiesterases, protein kinase B, protein kinase A, Epac and lipolysis. *Cell. Signal.* 21: 760-766.

Omran Z (2017). Obesity: current treatment and future horizons. *Mini Rev. Med. Chem.* 17: 51-61.

Oppenheimer JH, Schwartz HL, Lane JT, Thompson MP (1991). Functional relationship of thyroid hor-

## ***-Bibliografía-***

mone-induced lipogenesis, lipolysis, and thermogenesis in the rat. *J. Clin. Invest.* 87: 125-132.

Orgel E, Tucci J, Alhushki W, Malvar J, Sposto R, Fu CH, *et al.* (2014). Obesity is associated with residual leukemia following induction therapy for child-hood B-precursor acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 124: 3932-3938.

Ortega FJ, Mayas D, Moreno-Navarrete JM, Catalán V, Gómez-Ambrosi J, Esteve E, J. Rodríguez-Hermosa I, Ruiz B, Ricart W, Peral B *et al.* (2010). The gene expression of the main lipogenic enzymes is downregulated in visceral adipose tissue of obese subjects. *Obesity* 18: 13-20.

Ortega-Molina A, Efeyan A, López-Guadamillas E *et al.* (2012). Pten positively regulates brown adipose function, energy expenditure, and longevity. *Cell Metab.* 15: 382-394.

Ortega-Molina A, López-Guadamillas E, Mattison JA *et al.* (2015). Pharmacological inhibition of PI3K reduces adiposity and metabolic syndrome in obese mice and rhesus monkeys. *Cell Metab.* 21: 558-570.

Ortega-Molina A, Manuel Serrano M (2013). PTEN in cancer, metabolism, and aging. *Trends Endocrinol. Metab.* 24: 184-189.

Ost M, Keipert S, Klaus S (2017). Targeted mitochondrial uncoupling beyond UCP1 - The fine line between death and metabolic health. *Biochimie.* 134: 77-85.

Ottaviani E, Malagoli D, Franceschi C (2011). The evolution of the adipose tissue: a neglected enigma. *Gen. Comp. Endocrinol.* 174: 1-4.

Otto TC, Lane MD (2005). Adipose development: from stem cell to adipocyte. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 40: 229-242.

Ouellet V, Labbé SM, Blondin DP, Phoenix S, Guérin B, Haman F, Turcotte EE, Richard D, Carpentier AC (2012). Brown adipose tissue oxidative metabolism contributes to energy expenditure during acute cold exposure in humans. *J. Clin. Invest.* 122: 545-552.

Ouellet V, Routhier-Labadie A, Bellemare W, Lakhali-Chaieb L, Turcotte E, Carpentier AC, Richard D (2011). Outdoor temperature, age, sex, body mass index, and diabetic status determine the prevalence, mass, and glucose-uptake of 18F-FDG- detected BAT in humans. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 96: 192-199.

Pagano M, Tam SW, Theodoras AM, Beer-Romero P, Del Sal G, Chau V, Yew PR, Draetta GF, Rolfe M (1995). Role of the ubiquitin-proteasome pathway in regulating abundance of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27. *Science* 269: 682-685.

Pal A, Barber TM, Van de Bunt M *et al.* (2012). PTEN mutations as a cause of constitutive insulin sensitivity and obesity. *N. Engl. J. Med.* 367: 1002-1011.

Palmer CS, Osellame LD, Stojanovski D, Ryan MT (2011). The regulation of mitochondrial morphology: intricate mechanisms and dynamic machinery. *Cell Signal.* 23: 1534-1545.

Pantoja C, Huff TJ, Yamamoto KR (2008). Glucocorticoid signaling defines a novel commitment state during adipogenesis *in vitro*. *Mol. Biol. Cell* 19: 4032-4041.

Park BO, Ahrends R, Teruel MN (2012). Consecutive positive feedback loops create a bistable switch that controls preadipocyte-to-adipocyte conversion. *Cell Reports* 2: 976-990.

Park JW, Jung KH, Lee JH, Quach CHT, Moon SH, Cho YS *et al.* (2015). F-18-FDG PET/CT monitoring of beta-3 agonist-stimulated brown adipocyte recruitment in white adipose tissue. *J. Nuclear Med.* 56: 153-158.

- Park YK, Ge K (2017). Glucocorticoid receptor accelerates, but is dispensable for, adipogenesis. *Mol. Cell. Biol.* 37: e00260-16.
- Parker N, Crichton PG, Vidal-Puig AJ, Brand MD (2009). Uncoupling protein-1 (UCP1) contributes to the basal proton conductance of brown adipose tissue mitochondria. *J. Bioenerg. Biomembr.* 41: 335-342.
- Patel YM, Lane MD (2000). Mitotic clonal expansion during preadipocyte differentiation: calpain-mediated turnover of p27. *J. Biol. Chem.* 275: 17653-17660.
- Patil M, Sharma BK, Elattar S, Chang J, Kapil S, Yuan J, Satyanarayana A (2017). Id1 promotes obesity by suppressing brown adipose thermogenesis and white adipose browning. *Diabetes* 66: 1611-1625.
- Pauklin S, Vallier L (2013). The cell-cycle state of stem cells determines cell fate propensity. *Cell* 155: 135-147.
- Pebay-Peyroula E, Dahout-González C, Kahn R, Trézéguet V, Lauquin GJ, Brandolin G (2003). Structure of mitochondrial ADP/ATP carrier in complex with carboxyatractyloside. *Nature* 426: 39-44.
- Peckett AJ, Wright DC, Riddell MC (2011). The effects of glucocorticoids on adipose tissue lipid metabolism. *Metabolism* 60: 1500-1510.
- Pecqueur C, Couplan E, Bouillaud F, Ricquier D (2001). Genetic and physiological analysis of the role of uncoupling proteins in human energy homeostasis. *J. Mol. Med.* 79: 48-56.
- Peirce V, Carobbio S, Vidal-Puig A (2014). The different shades of fat. *Nature* 510: 76-83.
- Penas C, Ramachandran V, Ayad NG (2012). The APC/C ubiquitin ligase: from cell biology to tumorigenesis. *Front. Oncol.* 1: 60.
- Peng XD, Xu PZ, Chen ML, Hahn-Windgassen A, Skeen J *et al.* (2003). Dwarfism, impaired skin development, skeletal muscle atrophy, delayed bone development, and impeded adipogenesis in mice lacking Akt1 and Akt2. *Genes Dev.* 17: 1352-1365.
- Peng XR, Gennemark P, O'Mahony G, Bartsaghi S (2015). Unlock the thermogenic potential of adipose tissue: pharmacological modulation and implications for treatment of diabetes and obesity. *Front. Endocrinol.* 6: 174.
- Pereira MJ, Palming J, Rizell M, Aureliano M *et al.* (2012). mTOR inhibition with rapamycin causes impaired insulin signalling and glucose uptake in human subcutaneous and omental adipocytes. *Mol. Cell. Endocrinol.* 355: 96-105.
- Pérez MR, Medina-Gómez G (2011). Obesidad, adipogénesis y resistencia a la insulina. *Endocrinol. Nutr.* 58: 360-369.
- Perino A, Beretta M, Kilic A *et al.* (2014). Combined inhibition of PI3Kb and PI3Kg reduces fat mass by enhancing a-MSH-dependent sympathetic drive. *Sci. Signal.* 7: ra110.
- Perk J, Iavarone A, Benezra R (2005). Id family of helix-loop-helix proteins in cancer. *Nat. Rev. Cancer* 5: 603-614.
- Perren A, Komminoth P, Saremaslani P, Matter C, Feurer S, Lees JA, Heitz PU, Eng C (2000). Mutation and expression analyses reveal differential subcellular compartmentalization of PTEN in endocrine pancreatic tumors compared to normal islet cells. *Am. J. Pathol.* 157: 1097-1103.
- Perry RJ, Zhang D, Zhang XM, Boyer JL, Shulman GI (2015). Controlled-release mitochondrial protonophore reverses diabetes and steatohepatitis in rats. *Science* 347: 1253-1256.
- Perry SS, Zhao Y, Nie L, Cochrane SW, Huang Z, Sun XH (2007). Id1, but not Id3, directs long-term

## ***-Bibliografía-***

repopulating hematopoietic stem-cell maintenance. *Blood* 110: 2351-2360.

Peters JM (2006). The anaphase promoting complex/cyclosome: a machine designed to destroy. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7: 644-656.

Petersen BO, Wagener C, Marinoni F *et al.* (2000). Cell cycle- and cell growth-regulated proteolysis of mammalian CDC6 is dependent on APC-CDH1. *Genes Dev.* 14: 2330-2343.

Petrov PD, Palou A, Bonet ML, Ribot J (2016). Cell-autonomous brown-like adipogenesis of preadipocytes from retinoblastoma haploinsufficient mice. *J. Cell. Physiol.* 231: 1941-1952.

Petrov PD, Ribot J, Palou A, Bonet ML (2015). Improved metabolic regulation is associated with retinoblastoma protein gene haploinsufficiency in mice. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 308: 172-183.

Petrovic N, Waldén TB, Shabalina IG, Timmons JA, Cannon B, Nedergaard J (2010). Chronic peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) activation of epididymally derived white adipocyte cultures reveals a population of thermogenically competent, UCP1-containing adipocytes molecularly distinct from classic brown adipocytes. *J. Biol. Chem.* 285: 7153-7164.

Petruzzelli M, Schweiger M, Schreiber R, Campos-Olivas R, Tsoli M, Allen J, Swarbrick M, Rose-John S, Rincon M, Robertson G, Zechner R, Wagner EF (2014). A switch from white to brown fat increases energy expenditure in cancer-associated cachexia. *Cell Metab.* 20: 433-447.

Petruzzelli M, Wagner EF (2016). Mechanisms of metabolic dysfunction in cancer-associated cachexia. *Genes Dev.* 30: 489-501.

Pfaffl MW (2004). Quantification strategies in real-time RT-PCR. In: Bustin SA (Eds.) *The Real-Time PCR encyclopaedia A-Z of quantitative PCR* 87-120.

Pfannenberger C, Werner MK, Ripkens S, Stef I, Deckert A, Schmadl M, Reimold M, Häring HU, Clausen CD, Stefan N (2010). Impact of age on the relationships of brown adipose tissue with sex and adiposity in humans. *Diabetes* 59: 1789-1793.

Pfleger CM, Kirschner MW (2000). The KEN box: an APC recognition signal distinct from the D box targeted by Cdh1. *Genes Dev.* 14: 655-665.

Phelps DE, Xiong Y (1998). Regulation of cyclin-dependent kinase 4 during adipogenesis involves switching of cyclin D subunits and concurrent binding of p18INK4c and p27Kip1. *Cell Growth Differ.* 9: 595-610.

Picard F, Gehin M, Annicotte J, Rocchi S, Champy MF *et al.* (2002). SRC-1 and TIF2 control energy balance between white and brown adipose tissues. *Cell* 111: 931-941.

Picchio MC, Martín ES, Cesari R *et al.* (2004). Alterations of the tumor suppressor gene Parkin in non-small cell lung cancer. *Clin. Cancer Res.* 10: 2720-2724.

Pick JE, Wang L, Mayfield JE, Klann E (2013). Neuronal expression of the ubiquitin E3 ligase APC/C-Cdh1 during development is required for long-term potentiation, behavioral flexibility, and extinction. *Neurobiol. Learn. Mem.* 100: 25-31.

Pickart CM (2001). Mechanisms underlying ubiquitination. *Annu. Rev. Biochem.* 70: 503-533.

Pines J (2011). Cubism and the cell cycle: the many faces of the APC/C. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 12: 427-438.

Pischon T, Boeing H, Hoffmann K, Bergmann M *et al.* (2008). General and abdominal adiposity and risk of death in Europe. *N. Engl. J. Med.* 359: 2105-2120.



- Planchon SM, Waite KA, Eng C. (2008) The nuclear affairs of PTEN. *J. Cell Sci.* 121: 249-253.
- Polak P, Cybulski N, Feige JN, Auwerx J, Ruegg MA, Hall MN (2008). Adipose-specific knockout of raptor results in lean mice with enhanced mitochondrial respiration. *Cell Metab.* 8: 399-410.
- Polyak K, Waldman T, He TC, Kinzler KW, Vogelstein B (1996). Genetic determinants of p53-induced apoptosis and growth arrest. *Genes Dev.* 10: 1945-1952.
- Polyak K, Lee MH, Erdjument-Bromage H, Koff A, Roberts JM, Tempst P, Massagué J (1994). Cloning of p27Kip1, a cyclin-dependent kinase inhibitor and a potential mediator of extracellular antimitogenic signals. *Cell* 78: 59-66.
- Poole AC, Thomas RE, Yu S, Vincow ES, Pallanck L (2010). The mitochondrial fusion-promoting factor mitofusin is a substrate of the PINK1/parkin pathway. *PLoS One* 5: e10054.
- Porras A, Benito M (2002). Regulation of proliferation, differentiation and apoptosis of brown adipocytes: signal transduction pathways involved. In: Storey KB, Storey JM (Eds.) *Cell and molecular responses to stress*. Elsevier Press 3: 269-282.
- Porse BT, Pedersen TA, Xu X, Lindberg B, Wewer UM, Friis-Hansen L, Nerlov C (2001). E2F repression by C/EBP $\alpha$  is required for adipogenesis and granulopoiesis *in vivo*. *Cell* 107: 247-258.
- Porter C (2017). Quantification of UCP1 function in human brown adipose tissue. *Adipocyte* 6: 167-174.
- Porter RK (2006). A new look at mitochondrial uncoupling protein 1. *Biochim. Biophys. Acta* 1757: 446-448.
- Powelka AM, Seth A, Virbasius JV, Kiskinis E, Nicoloso SM, Guilherme A, Tang X, Straubhaar J, Cherniack AD, Parker MG, Czech MP (2006). Suppression of oxidative metabolism and mitochondrial biogenesis by the transcriptional corepressor RIP140 in mouse adipocytes. *J. Clin. Invest.* 116: 125-136.
- Prentki M, Madiraju SR (2008). Glycerolipid metabolism and signaling in health and disease. *Endocr. Rev.* 29: 647-676.
- Prestwich TC, MacDougald OA (2007). Wnt/ $\beta$ -catenin signaling in adipogenesis and metabolism. *Curr. Opin. Cell Biol.* 19: 612-617.
- Primorac I, Musacchio A (2013). Panta rhei: the APC/C at steady state. *J. Cell Biol.* 201: 177-189.
- Prins JB, O'Rahilly S (1997). Regulation of adipose cell number in man. *Clin. Sci.* 92: 3-11.
- Puhl R, Brownell KD (2001). Bias, discrimination, and obesity. *Obes. Res.* 9: 788-805.
- Puigserver P (2005). Tissue-specific regulation of metabolic pathways through the transcriptional coactivator PGC1- $\alpha$ . *Int. J. Obes.* 29: 5-9.
- Puigserver P, Herron D, Gianotti M, Palou A, Cannon B, Nedergaard J (1992). Induction and degradation of the uncoupling protein thermogenin in brown adipocytes *in vitro* and *in vivo*. Evidence for a rapidly degradable pool. *Biochem. J.* 284: 393-398.
- Puigserver P, Spiegelman BM (2003). Peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  coactivator 1  $\alpha$  (PGC-1  $\alpha$ ): transcriptional coactivator and metabolic regulator. *Endocr. Rev.* 24: 78-90.
- Puigserver P, Vázquez F, Bonet ML, Picó C, Palou A (1996). *In vitro* and *in vivo* induction of brown adipocyte uncoupling protein (thermogenin) by retinoic acid. *Biochem. J.* 1996: 317: 827-833.
- Puigserver P, Wu Z, Park CW, Graves R, Wright M, Spiegelman BM (1998). A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis. *Cell* 92: 829-839.

## ***-Bibliografía-***

Qian SW, Tang Y, Li X, Liu Y, Zhang YY *et al.* (2013). BMP4-mediated brown fat-like changes in white adipose tissue alter glucose and energy homeostasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 110: 798-807.

Qiang L, Wang L, Kon N, Zhao W, Lee S, Zhang Y, Rosenbaum M, Zhao Y, Gu W, Farmer SR, Accili D (2012). Brown remodeling of white adipose tissue by Sirt1-dependent deacetylation of Pparg. *Cell* 150: 620-632.

Qiao L, Shao J (2006). SIRT1 regulates adiponectin gene expression through Foxo1-C/enhancer-binding protein alpha transcriptional complex. *J. Biol. Chem.* 281: 39915-39924.

Qiao X, Zhang L, Gamper AM, Fujita T, Wan Y (2010). APC/C-Cdh1: from cell cycle to cellular differentiation and genomic integrity. *Cell Cycle* 9: 3904-3912.

Rabelo R, Reyes C, Schifman A, Silva JE (1996). A complex retinoic acid response element in the uncoupling protein gene defines a novel role for retinoids in thermogenesis. *Endocrinology* 137: 3488-3496.

Rabelo R, Reyes C, Schifman A, Silva JE (1996). Interactions among receptors, thyroid hormone response elements, and ligands in the regulation of the rat uncoupling protein gene expression by thyroid hormone. *Endocrinology* 137: 3478-3487.

Rabelo R, Schifman A, Rubio A, Sheng X, Silva JE (1995). Delineation of thyroid hormone-responsive sequences within a critical enhancer in the rat uncoupling protein gene. *Endocrinology* 136: 1003-1013.

Radke S, Chander H, Schafer P, Meiss G *et al.* (2008). Mitochondrial protein quality control by the proteasome involves ubiquitination and the protease Omi. *J. Biol. Chem.* 283: 12681-12685.

Rahimi N, Tremblay E, McAdam L, Roberts A, Elliott B (1998). Autocrine secretion of TGF- $\beta$  and TGF- $\beta$ 2 by pre-adipocytes and adipocytes: a potent negative regulator of adipocyte differentiation and proliferation of mammary carcinoma cells. *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim.* 34: 412-420.

Ramaswamy S, Nakamura N, Sansal I, Bergeron L, Sellers WR (2002). A novel mechanism of gene regulation and tumor suppression by the transcription factor FKHR. *Cancer Cell* 2: 81-91.

Ramji DP, Foka P (2002). CCAAT/enhancer-binding proteins: structure, function and regulation. *Biochem. J.* 365: 561-575.

Rape M, Kirschner MW (2004). Autonomous regulation of the anaphase-promoting complex couples mitosis to S-phase entry. *Nature* 432: 588-595.

Rask E, Olsson T, Soderberg S *et al.* (2001). Tissue-specific dysregulation of cortisol metabolism in human obesity. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 86: 1418-1421.

Reddy NL, Tan BK, Barber TM, Randeva HS (2014). Brown adipose tissue: endocrine determinants of function and therapeutic manipulation as a novel treatment strategy for obesity. *BMC Obesity* 1:13.

Redman LM, de Jonge L, Fang X, Gamlin B, Recker D, Greenway FL, Smith SR, Ravussin E (2007). Lack of an effect of a novel beta3-adrenoceptor agonist, TAK-677, on energy metabolism in obese individuals: a double-blind, placebo-controlled randomized study. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 92: 527-531.

Regnier SM, Sargis RM (2014). Adipocytes under assault: environmental disruption of adipose physiology. *Biochimica et Biophysica Acta* 1842: 520-533.

Reichert M, Eick D (1999). Analysis of cell cycle arrest in adipocyte differentiation. *Oncogene* 18: 459-466.

Reilly SM, Saltiel AR (2015). A futile approach to fighting obesity? *Cell* 163: 539-540.

Reis A, Chang HY, Levasseur M, Jones KT (2006). APC<sup>Cdh1</sup> activity in mouse oocytes prevents entry into the first meiotic division. *Nat. Cell Biol.* 8: 539-540.

- Reis A, Levasseur M, Chang HY, Elliott DJ, Jones KT (2006). The CRY box: a second APC<sup>c</sup>dh1-dependent degron in mammalian cdc20. *EMBO Rep.* 7: 1040-1045.
- Reis A, Madgwick S, Chang HY, Nabti I, Levasseur M, Jones KT (2007). Prometaphase APC<sup>c</sup>dh1 activity prevents non-disjunction in mammalian oocytes. *Nat. Cell Biol.* 9: 1192-1198.
- Reusch JE, Colton LA, Klemm DJ (2000). CREB activation induces adipogenesis in 3T3-L1 cells. *Mol. Cell Biol.* 20: 1008-1020.
- Rexrode KM, Carey VJ, Hennekens CH *et al.* (1998). Abdominal adiposity and coronary heart disease in women. *JAMA* 280: 1843-1848.
- Reyne Y, Nougues J, Vezinhet A (1983). Adipose tissue regeneration in 6-month-old and adult rabbits following lipectomy. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 174: 258-264.
- Ribeiro MO, Carvalho SD, Schultz JJ, Chiellini G, Scanlan TS, Bianco AC, Brent GA (2001). Thyroid hormone-sympathetic interaction and adaptive thermogenesis are thyroid hormone receptor isoform-specific. *J. Clin. Invest.* 108: 97-105.
- Ricoult SJ, Manning BD (2013). The multifaceted role of mTORC1 in the control of lipid metabolism. *EMBO Rep.* 14: 242-251.
- Ricquier D (2012). Uncoupling protein 1 of brown adipocytes, the only uncoupler: a historical perspective. *Front. Endocrinol.* 2: 85.
- Ricquier D (2017). UCP1, the mitochondrial uncoupling protein of brown adipocyte: a personal contribution and a historical perspective. *Biochimie* 134: 3-8.
- Ricquier D, Bouillaud F (2000). The uncoupling protein homologues: UCP1, UCP2, UCP3, StUCP and AtUCP. *Biochem. J.* 345: 161-179.
- Ricquier D, Bouillaud F, Toumelin P, Mory G, Bazin R, Arch J, Pénicaud L (1986). Expression of uncoupling protein mRNA in thermogenic or weakly thermogenic brown adipose tissue. Evidence for a rapid  $\beta$ -adrenoreceptor-mediated and transcriptionally regulated step during activation of thermogenesis. *J. of Biol. Chem.* 261: 13905-13910.
- Ricquier D, Nechad M, Mory G (1982). Ultrastructural and biochemical characterization of human brown adipose tissue in pheochromocytoma. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 54: 803-807.
- Richon V, Lyle RE, McGehee REJ (1997). Regulation, expression of retinoblastoma proteins p107 and p130 during 3T3-L1 adipocyte differentiation. *J. Biol. Chem.* 272: 10117-10124.
- Rigamonti A, Brennand K, Lau F, Cowan CA (2011). Rapid cellular turnover in adipose tissue. *PLoS One* 6: e17637.
- Rizos CV, Elisaf MS, Mikhailidis DP, Liberopoulos EN (2009). How safe is the use of thiazolidinediones in clinical practice? *Expert Opin. Drug Saf.* 8: 15-32.
- Robidoux J, Cao W, Quan H, Daniel KW, Moukdar F, Bai X, Floering LM, Collins S (2005). Selective activation of mitogen-activated protein (MAP) kinase kinase 3 and p38alpha MAP kinase is essential for cyclic AMP-dependent UCP1 expression in adipocytes. *Mol. Cell. Biol.* 25: 5466-5479.
- Robidoux J, Martin TL, Collins S (2004). Beta-adrenergic receptors and regulation of energy expenditure: a family affair. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 44: 297-323.
- Robinson AJ, Kunji ERS (2006). Mitochondrial carriers in the cytoplasmic state have a common substrate binding site. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 103: 2617-2622.

## ***-Bibliografía-***

Roca-Rivada A, Castelao C, Senin LL, Landrove MO, Baltar J, Crujeiras AB, Seoane LM, Casanueva FF, Pardo M (2013). FND5/irisin is not only a myokine but also an adipokine. *PLoS ONE* 8: e60563.

Rodeheffer MS, Birsoy K, Friedman JM (2008). Identification of white adipocyte progenitor cells *in vivo*. *Cell* 135: 240-249.

Rodgers RJ, Holch P, Tallett AJ (2010). Behavioural satiety sequence (BSS): separating wheat from chaff in the behavioural pharmacology of appetite. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 97: 3-14.

Rodgers RJ, Tschöp MH, Wilding JP (2012). Anti-obesity drugs: past, present and future. *Dis. Model. Mech.* 5: 621-626.

Rodríguez-Acebes S, Palacios N, Botella-Carretero JI, Olea N, Crespo L *et al.* (2010). Gene expression profiling of subcutaneous adipose tissue in morbid obesity using a focused microarray: Distinct expression of cell-cycle- and differentiation-related genes. *BMC Med. Genomics* 3: 61.

Rodríguez-Rodríguez P, Almeida A, Bolaños JP (2013). Brain energy metabolism in glutamate-receptor activation and excitotoxicity: role for APC/C-Cdh1 in the balance glycolysis/pentose phosphate pathway. *Neurochem. Int.* 62: 750-756.

Rolfe DF, Brand MD (1996). Contribution of mitochondrial proton leak to skeletal muscle respiration and to standard metabolic rate. *Am. J. Physiol.* 271: 1380-1389.

Rosell M, Kaforou M, Frontini A, Okolo A, Chan YW, Nikolopoulou E *et al.* (2014). Brown and white adipose tissues: intrinsic differences in gene expression and response to cold exposure in mice. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 306: 945-964.

Rosen CJ (2007). The rosiglitazone story – lessons from an FDA advisory committee meeting. *N. Engl. J. Med.* 357: 844-846.

Rosen ED (2002). The molecular control of adipogenesis, with special reference to lymphatic pathology. *Ann. N Y Acad. Sci.* 979: 143-158.

Rosen ED (2005). The transcriptional basis of adipocyte development. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids.* 73: 31-34.

Rosen ED, MacDougald OA (2006). Adipocyte differentiation from the inside out. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7: 885-896.

Rosen ED, Sarraf P, Troy AE, Bradwin G, Moore K, Milstone DS, Spiegelman BM, Mortensen RM (1999). PPAR gamma is required for the differentiation of adipose tissue *in vivo* and *in vitro*. *Mol. Cell Biol.* 19: 611-617.

Rosen ED, Spiegelman BM (2000). Molecular regulation of adipogenesis. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 16: 145-171.

Rosen ED, Spiegelman BM (2006). Adipocytes as regulators of energy balance and glucose homeostasis. *Nature* 444: 847-853.

Rosen ED, Spiegelman BM (2014). What we talk about when we talk about fat. *Cell.* 156: 20-44.

Rosenwald M, Perdikari A, Rüllicke T, Wolfrum C (2013). Bidirectional interconversion of brite and white adipocytes. *Nat. Cell Biol.* 15: 659-667.

Ross SE, Erickson RL, Gerin I, DeRose PM, Bajnok L, Longo KA, Misek DE *et al.* (2002). Microarray analyses during adipogenesis: understanding the effects of Wnt signaling on adipogenesis and the roles of liver X receptor  $\alpha$  in adipocyte metabolism. *Mol. Cell Biol.* 22: 5989-5999.

Ross SE, Hemati N, Longo KA, Bennett CN, Lucas PC, Erickson RL, MacDougald OA (2002). Inhibition

of adipogenesis by Wnt signaling. *Science* 289: 950-953.

Ross SR, Choy L, Graves RA, Fox N, Soleyeva V, Klaus S, Ricquier D, Spiegelman BM (1992). Hibernoma formation in transgenic mice and isolation of a brown adipocyte cell line expressing the uncoupling protein gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 7561-7565.

Ross SR, Graves RA, Greenstein A, Platt KA, Shyu HL, Mellovitz B, Spiegelman BM (1990). A fat-specific enhancer is the primary determinant of gene expression for adipocyte P2 *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 9590-9594.

Rothwell NJ, Stock MJ (1979). A role for brown adipose tissue in diet-induced thermogenesis. *Nature* 281: 31-35.

Rothwell NJ, Stock MJ (1981). Influence of noradrenaline on blood flow to brown adipose tissue in rats exhibiting diet-induced thermogenesis. *Pflugers Arch.* 389: 237-242.

Rothwell NJ, Stock MJ (1983). Diet-induced thermogenesis. *Adv. Nutr. Res.* 5: 201-220.

Rothwell NJ, Stock MJ (1983). Luxuskonsumtion, diet-induced thermogenesis and brown fat: the case in favour. *Clin. Sci.* 64: 19-23.

Rousset S, Mozo J, Dujardin G, Emre Y, Masscheleyn S, Ricquier D, Cassarddoulcier A (2007). UCP2 is a mitochondrial transporter with an unusual very short half-life. *FEBS Lett.* 581: 479-482.

Rubin CS, Hirsch A, Fung C, Rosen OM (1978). Development of hormone receptors and hormonal responsiveness *in vitro*. Insulin receptors and insulin sensitivity in the preadipocyte and adipocyte forms of 3T3-L1 cells. *J. Biol. Chem.* 253: 7570-7578.

Rutkowski JM, Stern JH, Scherer PE (2015). The cell biology of fat expansion. *J. Cell Biol.* 208: 501-512.

Sacks H, Symonds ME (2013). Anatomical locations of human brown adipose tissue. Functional relevance and implications in obesity and type 2 diabetes. *Diabetes* 62: 1783-1790.

Saito M, Okamatsu-Ogura Y, Matsushita M, Watanabé K, Yoneshiro T, Nio-Kobayashi J, Iwanaga T, Miyagawa M, Kameya T, Nakada K, Kawai Y, Tsujisaki M (2009). High incidence of metabolically active brown adipose tissue in healthy adult humans: effects of cold exposure and adiposity. *Diabetes* 58: 1526-1531.

Sakaguchi M, Fujisaka S, Cai W, Winnay JN *et al.* (2017). Adipocyte dynamics and reversible metabolic syndrome in mice with an inducible adipocyte-specific deletion of the insulin receptor. *Cell Metab.* 25: 448-462.

Sakai T, Sakaue H, Nakamura T, Okada M, Matsuki Y, Watanabe E, Hiramatsu R, Nakayama K, Nakayama KI, Kasuga M (2007). Skp2 controls adipocyte proliferation during the development of obesity. *J. Biol. Chem.* 282: 2038-2046.

Sakamaki T, Casimiro MC, Ju X, Quong AA, Katiyar S, Liu M, Jiao X, Li A, Zhang X, Lu Y *et al.* (2006). Cyclin D1 determines mitochondrial function *in vivo*. *Mol. Cell Biol.* 26: 5449-5469.

Sakaue H, Konishi M, Ogawa W, Asaki T, Mori T, Yamasaki M, Takata M, Ueno H, Kato S, Kasuga M, Itoh N (2002). Requirement of fibroblast growth factor 10 in development of white adipose tissue. *Genes Dev.* 16: 908-912.

Sakaue H, Ogawa W, Matsumoto M *et al.* (1998). Posttranscriptional control of adipocyte differentiation through activation of phosphoinositide 3-kinase. *J. Biol. Chem.* 273: 28945-28952.

Sam S, Haffner S, Davidson MH *et al.* (2009). Hypertriglyceridemic waist phenotype predicts increased visceral fat in subjects with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 32: 1916-1920.

## ***-Bibliografía-***

Samat A, Tomlinson B, Taheri S, Thomas GN (2008). Rimonabant for the treatment of obesity. *Recent Pat. Cardiovasc. Drug Discov.* 3: 187-193.

Sambeat A, Gulyaeva O, Dempersmier J *et al.* (2016). LSD1 interacts with Zfp516 to promote UCP1 transcription and brown fat program. *Cell Rep.* 15: 2536-2549.

Sammons MF, Price DA (2014). Modulation of adipose tissue thermogenesis as a method for increasing energy expenditure. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 24: 425-429.

Samudio I, Fiegl M, Andreeff M (2009). Mitochondrial uncoupling and the Warburg effect: molecular basis for the reprogramming of cancer cell metabolism. *Cancer Res.* 69: 2163-2166.

Sancak Y, Thoreen CC, Peterson TR, Lindquist RA, Kang SA *et al.* (2007). PRAS40 is an insulin-regulated inhibitor of the mTORC1 protein kinase. *Mol. Cell* 25: 903-915.

Sanchez-Gurmaches J, Hung CM, Guertin DA (2016). Emerging complexities in adipocyte origins and identity. *Trends Cell Biol.* 26(5): 313-26.

Sánchez-Gurmaches J, Hung CM, Sparks CA, Tang Y, Li H, Guertin DA (2012). PTEN loss in the Myf5 lineage redistributes body fat and reveals subsets of white adipocytes that arise from Myf5 precursors. *Cell Metab.* 16: 348-362.

Santos GM, Neves FDR, Amato AA (2015). Thermogenesis in white adipose tissue: an unfinished story about PPAR gamma. *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subjects* 1850: 691-695.

Sarbassov DD, Ali SM, Sabatini DM (2005). Growing roles for the mTOR pathway. *Curr. Opin. Cell Biol.* 17: 596-603.

Sarbassov DD, Guertin DA, Ali SM, Sabatini DM (2005). Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science* 307: 1098-1101.

Sargent BJ, Moore NA (2009). New central targets for the treatment of obesity. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 68: 852-860.

Sarraf SA, Raman M, Guarani-Pereira V, Sowa ME, Huttlin EL, Gygi SP, Harper JW (2013). Landscape of the PARKIN-dependent ubiquitylome in response to mitochondrial depolarization. *Nature* 496: 372-376.

Sarruf DA, Iankova I, Abella A *et al.* (2005). Cyclin D3 promotes adipogenesis through activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *Mol. Cell Biol.* 25: 9985-9995.

Saucedo LJ, Gao X, Chiarelli DA, Li L, Pan D *et al.* (2003). Rheb promotes cell growth as a component of the insulin/TOR signaling network. *Nat. Cell Biol.* 5: 566-571.

Scarpace PJ, Matheny M, Pollock BH, Tümer N (1997). Leptin increases uncoupling protein expression and energy expenditure. *Am. J. Physiol.* 273: 226-230.

Scimè A, Grenier G, Huh MS, Gillespie MA, Bevilacqua L, *et al.* (2005). Rb and p107 regulate preadipocyte differentiation into white versus brown fat through repression of PGC-1 $\alpha$ . *Cell Metab.* 2: 283-295.

Scimè A, Grenier G, Huh MS, Gillespie MA, Bevilacqua L, Harper ME, Rudnicki MA (2005). Rb and p107 regulate preadipocyte differentiation into white versus brown fat through repression of PGC-1 $\alpha$ . *Cell Metab.* 2: 283-295.

Scott PH, Lawrence JC Jr. (1998). Attenuation of mammalian target of rapamycin activity by increased cAMP in 3T3-L1 adipocytes. *J. Biol. Chem.* 273: 34496-34501.

Scott RE, Florine DL, Wille JJ, Yun K (1982). Coupling of growth arrest and differentiation at a distinct state in the G1 phase of the cell cycle: GD. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79: 845-849.

Scheen AJ, Van Gaal LG, Despres JP, Pi-Sunyer X, Golay A, Hanotin C (2006). Rimonabant improves cardiometabolic risk profile in obese or overweight subjects: overview of RIO studies. *Rev. Med. Suisse* 2: 1916-1923.

Scherer PE (2006). Adipose tissue: from lipid storage compartment to endocrine organ. *Diabetes* 55: 1537-1545.

Schleiff E, McBride H (2000). The central matrix loop drives import of uncoupling protein 1 into mitochondria. *J. Cell Sci.* 113: 2267-2272.

Schmidt-Supprian M, Rajewsky K (2007). Vagaries of conditional gene targeting. *Nat. Immunol.* 8: 665-668.

Schrauwen P, Hesselink MK (2004). The role of uncoupling protein3 in fatty acid metabolism: protection against lipotoxicity? *Proc. Nutr. Soc.* 63: 287-292.

Schrauwen P, Hoeks J, Schaart G *et al.* (2003). Uncoupling protein 3 as a mitochondrial fatty acid anion exporter. *FASEB J.* 17: 2272-2274.

Schulz TJ, Huang P, Huang TL, Xue R, McDougall LE, Townsend KL, Cypess AM, Mishina Y, Gussoni E, Tseng YH (2013). Brown-fat paucity due to impaired BMP signalling induces compensatory browning of white fat. *Nature* 495: 379-383.

Schulz TJ, Huang TL, Tran TT, Zhang H, Townsend KL, Shadrach JL, Cerletti M, McDougall LE, Giorgadze N, Tchkonja T *et al.* (2011). Identification of inducible brown adipocyte progenitors residing in skeletal muscle and white fat. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 108: 143-148.

Seale P, Bjork B, Yang W, Kajimura S, Chin S, Kuang S, Scimè A, Devarakonda S, Conroe HM, Erdjument-Bromage H *et al.* (2008). PRDM16 controls a brown fat/skeletal muscle switch. *Nature* 454: 961-967.

Seale P, Conroe HM, Estall J, Kajimura S, Frontini A *et al.* (2011). Prdm16 determines the thermogenic program of subcutaneous white adipose tissue in mice. *J. Clin. Investig.* 121: 96-105.

Seale P, Kajimura S, Spiegelman BM (2009). Transcriptional control of brown adipocyte development and physiological function - of mice and men. *Genes Dev.* 23: 788-797.

Seale P, Kajimura S, Yang W, Chin S, Rohas LM, Uldry M, Tavernier G, Langin D, Spiegelman BM (2007). Transcriptional control of brown fat determination by PRDM16. *Cell Metab.* 6: 38-54.

Seale P, Lazar MA (2009). Brown fat in humans: turning up the heat on obesity. *Diabetes* 58: 1482-1484.

Sears IB, MacGinnitie MA, Kovacs LG, Graves RA (1996). Differentiation-dependent expression of the brown adipocyte uncoupling protein gene: regulation by peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *Mol. Cell. Biol.* 16: 3410-3419.

Sell H, Berger JP, Samson P, Castriota G, Lalonde J, Deshaies Y, Richard D (2004). Peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  agonism increases the capacity for sympathetically mediated thermogenesis in lean and ob/ob mice. *Endocrinology* 145: 3925-3934.

Senese R, Valli V, Moreno M, Lombardi A, Busiello RA, Cioffi F (2011). Uncoupling protein 3 expression levels influence insulin sensitivity, fatty acid oxidation, and related signaling pathways. *Pflugers Arch.* 461: 153-164.

Serrero G, Frolov A, Schroeder F, Tanaka K, Gelhaar L (2000). Adipose differentiation related protein: expression, purification of recombinant protein in *Escherichia coli* and characterization of its fatty acid

## ***-Bibliografía-***

binding properties. *Biochim Biophys. Acta* 1488: 245-254.

Shabalina G, Jacobsson A, Cannon B, Nedergaard J (2004). Native UCP1 displays simple competitive kinetics between the regulators purine nucleotides and fatty acids. *J. Biol. Chem.* 279: 38236-38248.

Shabalina G, Petrovic N, de Jong JM, Kalinovich AV, Cannon B, Nedergaard J (2013). UCP1 in brite/beige adipose tissue mitochondria is functionally thermogenic. *Cell Rep.* 5: 1196-1203.

Shah OJ, Wang Z, Hunter T (2004). Inappropriate activation of the TSC/Rheb/mTOR/S6K cassette induces IRS1/2 depletion, insulin resistance, and cell survival deficiencies. *Curr. Biol.* 14: 1650-1656.

Shan T, Liu W, Kuang S (2013). Fatty acid binding protein 4 expression marks a population of adipocyte progenitors in white and brown adipose tissues. *FASEB J.* 27: 277-287.

Shan T, Zhang P, Jiang Q, Xiong Y, Wang Y, Kuang S (2016). Adipocyte-specific deletion of mTOR inhibits adipose tissue development and causes insulin resistance in mice. *Diabetologia* 59: 1995-2004.

Sharma AM, Staels B (2007). Review: Peroxisome proliferator-activated receptor gamma and adipose tissue—understanding obesity-related changes in regulation of lipid and glucose metabolism. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 92: 386-395.

Sharp LZ, Shinoda K, Ohno H, Scheel DW, Tomoda E *et al.* (2012). Human BAT possesses molecular signatures that resemble beige/brite cells. *PLoS One* 7: e49452.

Sheaff RJ, Singer JD, Swanger J, Smitherman M, Roberts JM, Clurman BE (2000). Proteasomal turnover of p21Cip1 does not require p21Cip1 ubiquitination. *Mol. Cell* 5: 403-410.

Shearin AL, Monks BR, Seale P, Birnbaum MJ (2016). Lack of AKT in adipocytes causes severe lipodystrophy. *Mol Metab.* 5: 472-479.

Shen WH, Balajee AS, Wang J *et al.* (2007). Essential role for nuclear PTEN in maintaining chromosomal integrity. *Cell* 128: 157-170.

Sherr CJ, Roberts JM (1999). CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev.* 13: 1501-1512.

Shi T, Wang F, Stieren E, Tong Q (2005). SIRT3, a mitochondrial sirtuin deacetylase, regulates mitochondrial function and thermogenesis in brown adipocytes. *J. Biol. Chem.* 280: 13560-13567.

Shinoda K, Luijten IH, Hasegawa Y, Hong H, Sonne SB, Kim M, Xue R, Chondronikola M, Cypess AM, Tseng YH *et al.* (2015). Genetic and functional characterization of clonally derived adult human brown adipocytes. *Nat. Med.* 21: 389-394.

Si Y, Palani S, Jayaraman A, Lee K (2007). Effects of forced uncoupling protein 1 expression in 3T3-L1 cells on mitochondrial function and lipid metabolism. *J. Lipid. Res.* 48: 826-836.

Sidossis L, Kajimura S (2015). Brown and beige fat in humans: thermogenic adipocytes that control energy and glucose homeostasis. *J. Clin. Invest.* 125: 478-486.

Sidossis LS, Porter C, Saraf MK, Børsheim E, Radhakrishnan RS, Chao T, Ali A, Chondronikola M, Micalak R, Finnerty CC, Hawkins HK, Toliver-Kinsky T, Herndon DN (2015). Browning of subcutaneous white adipose tissue in humans after severe adrenergic stress. *Cell Metab.* 22: 219-227.

Sigl R, Wandke C, Rauch V, Kirk J, Hunt T, Geley S (2009). Loss of the mammalian APC/C activator FZR1 shortens G1 and lengthens S phase but has little effect on exit from mitosis. *J. Cell Sci.* 122: 4208-4217.

Silva JE (2006). Thermogenic mechanisms and their hormonal regulation. *Physiol. Rev.* 86: 435-464.



- Silva JE, Larsen PR (1983). Adrenergic activation of triiodothyronine production in brown adipose tissue. *Nature* 305: 712-713.
- Simonsen L, Stallknecht B, Bulow J (1993). Contribution of skeletal muscle and adipose tissue to adrenaline-induced thermogenesis in man. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* 17: 47-51.
- Singh R, Xiang Y, Wang Y, Baikati K, Cuervo AM, Luu YK, Tang Y, Pessin JE, Schwartz GJ, Czaja MJ (2009). Autophagy regulates adipose mass and differentiation in mice. *J. Clin. Invest.* 119: 3329-3339.
- Sivakumar S, Gorbisky GJ (2015). Spatiotemporal regulation of the anaphase-promoting complex in mitosis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 16: 82-94.
- Sivaprasad U, Machida YJ, Dutta A (2007). APC/C—the master controller of origin licensing? *Cell Div.* 2: 8.
- Sjostrom L, Narbro K, Sjostrom CD, Karason K, Larsson B, Wedel H, Lystig T, Sullivan M, Bouchard C, Carlsson B *et al.* (2007). Swedish obese subjects study. Effects of bariatric surgery on mortality in Swedish obese subjects. *N. Eng. J. Med.* 357: 741-752.
- Skaar JR, Pagano M (2008). Cdh1: a master G0/G1 regulator. *Nat. Cell Biol.* 10: 755-757.
- Skulachev VP (1991). Fatty acid circuit as a physiological mechanism of uncoupling of oxidative phosphorylation. *FEBS Lett.* 294: 158-162.
- Sluse FE, Jarmuszkiewicz W, Navet R, Douette P, Mathy G, Sluse-Goffart CM (2006). Mitochondrial UCPs: new insights into regulation and impact. *Biochim. Biophys. Acta* 1757: 480-485.
- Smas CM, Chen L, Zhao L, Latasa MJ, Sul HS (1999). Transcriptional repression of pref-1 by glucocorticoids promotes 3T3-L1 adipocyte differentiation. *J. Biol. Chem.* 274: 12632-12641.
- Smith PJ, Wise LS, Berkowitz R, Wan C, Rubin CS (1988). Insulin-like growth factor-I is an essential regulator of the differentiation of 3T3-L1 adipocytes. *J. Biol. Chem.* 263: 9402-9408.
- Smith SR, De JL, Volaufova J, Li Y, Xie H, Bray GA (2005). Effect of pioglitazone on body composition and energy expenditure: a randomized controlled trial. *Metabolism* 54: 24-32.
- Soeder KJ, Snedden SK, Cao W, Della Rocca GJ, Daniel KW, Luttrell LM, Collins S (1999). The beta3-adrenergic receptor activates mitogen-activated protein kinase in adipocytes through a Gi-dependent mechanism. *J. Biol. Chem.* 274: 12017-12022.
- Soltys BJ, Gupta RS (1999). Mitochondrial-matrix proteins at unexpected locations: are they exported? *Trends Biochem. Sci.* 24: 174-177.
- Song BQ, Chi Y, Li X, Du WJ, Han ZB *et al.* (2015). Inhibition of Notch signaling promotes the adipogenic differentiation of mesenchymal stem cells through autophagy activation and PTEN-PI3K/AKT/mTOR pathway. *Cell Physiol. Biochem.* 36: 1991-2002.
- Song MS, Carracedo A, Salmena L, Song SJ, Egia A, Malumbres M *et al.* (2011). Nuclear PTEN regulates the APC-CDH1 tumor-suppressive complex in a phosphatase-independent manner. *Cell* 144: 187-199.
- Song MS, Salmena L, Carracedo A *et al.* (2008). The deubiquitinylation and localization of PTEN are regulated by a HAUSP-PML network. *Nature* 455: 813-817.
- Song MS, Salmena L, Pandolfi PP (2012). The functions and regulation of the PTEN tumour suppressor. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 13: 283-296.
- Sorensen CS, Lukas C, Kramer ER, Peters JM, Bartek J, Lukas J (2000). Nonperiodic activity of the

## ***-Bibliografía-***

human anaphase-promoting complex-Cdh1 ubiquitin ligase results in continuous DNA synthesis uncoupled from mitosis. *Mol. Cell. Biol.* 20: 7613-7623.

Soumano K, Desbiens S, Rabelo R, Bakopoulos E, Camirand A, Silva JE (2000). Glucocorticoids inhibit the transcriptional response of the uncoupling protein-1 gene to adrenergic stimulation in a brown adipose cell line. *Mol. Cell Endocrinol.* 165: 7-15.

Spalding KL, Arner E, Westermark PO, Bernard S, Buchholz BA, Bergmann O, Blomqvist L, Hoffstedt J, Naslund E, Britton T *et al.* (2008). Dynamics of fat cell turnover in humans. *Nature* 453: 783-787.

Spiegelman BM, Flier JS (2001). Obesity and the regulation of energy balance. *Cell* 104: 531-543.

Stanford KI, Middelbeek RJ, Townsend KL, An D, Nygaard EB *et al.* (2013). Brown adipose tissue regulates glucose homeostasis and insulin sensitivity. *J. Clin. Invest.* 123: 215-223.

Stechschulte LA, Qiu B, Warriar M, Hinds TD Jr., Zhang M, Gu H, Xu Y, Khuder SS, Russo L, Najjar SM, Lecka-Czernik B, Yong W, Sánchez ER (2016). FKBP51 null mice are resistant to diet-induced obesity and the PPAR agonist rosiglitazone. *Endocrinology* 157: 3888-3900.

Stegmüller J, Konishi Y, Huynh MA, Yuan Z, Dibacco S, Bonni A (2006). Cell-intrinsic regulation of axonal morphogenesis by the Cdh1-APC target SnoN. *Neuron* 50: 389-400.

Stewart PM, Tomlinson JW (2002). Cortisol, 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 and central obesity. *Trends Endocrinol. Metab.* 13: 94-96.

Stocker H, Radimerski T, Schindelholz B, Wittwer F, Belawat P *et al.* (2003). Rheb is an essential regulator of S6K in controlling cell growth in *Drosophila*. *Nat. Cell Biol.* 5: 559-566.

Strack AM, Bradbury MJ, Dallman MF (1995). Corticosterone decreases nonshivering thermogenesis and increases lipid storage in brown adipose tissue. *Am. J. Physiol.* 268: 183-191.

Strack AM, Sebastian RJ, Schwartz MW, Dallman MF (1995). Glucocorticoids and insulin: reciprocal signals for energy balance. *Am. J. Physiol.* 268: 142-149.

Student AK, Hsu RY, Lane MD (1980). Induction of fatty acid synthetase synthesis in differentiating 3T3-L1 preadipocytes. *J. Biol. Chem.* 255: 4745-4750.

Summers SA, Whiteman EL, Birnbaum MJ (2000). Insulin signaling in the adipocyte. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* 24: 67-70.

Sun H, Lesche R, Li DM *et al.* (1999). PTEN modulates cell cycle progression and cell survival by regulating phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate and Akt/protein kinase B signaling pathway. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 96: 6199-6204.

Sun K, Kusminski CM, Scherer PE (2011). Adipose tissue remodeling and obesity. *J. Clin. Invest.* 121: 2094-2101.

Sun L, Goff LA, Trapnell C, Alexander R, Lo KA, Hacısuleyman E, Sauvageau M, Tazon-Vega B, Kelley DR, Hendrickson DG *et al.* (2013). Long noncoding RNAs regulate adipogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 110: 3387-3392.

Sundaram S, Johnson AR, Makowski L (2013). Obesity, metabolism and the microenvironment: links to cancer. *J. Carcinog.* 12: 19.

Sutterluty H, Chatelain E, Marti A, Wirbelauer C, Senften M, Muller U, Krek W (1999). p45SKP2 promotes p27Kip1 degradation and induces S phase in quiescent cells. *Nat. Cell Biol.* 1: 207-214.

Suzawa M, Takada I, Yanagisawa J *et al.* (2003). Cytokines suppress adipogenesis and PPAR-gamma function through the TAK1/TAB1/NIK cascade. *Nat. Cell Biol.* 5: 224-230.

- Szabo I, Zoratti M (2017). Now UCP(rotein), now you don't: UCP1 is not mandatory for thermogenesis. *Cell Metabolism* 25: 761-762.
- Takada I, Kouzmenko AP, Kato S (2009). Wnt and PPAR $\gamma$  signaling in osteoblastogenesis and adipogenesis. *Nature Rev. Rheumatol.* 5: 442-447.
- Takahashi A, Adachi S, Morita M, Tokumasu M *et al.* (2015). Post-transcriptional stabilization of Ucp1 mRNA protects mice from diet-induced obesity. *Cell Rep.* 13: 2756-2767.
- Takahashi Y, Shinoda A, Furuya N, Harada E, Arimura N, Ichi I, Fujiwara Y, Inoue J, Sato R (2013). Perilipin-mediated lipid droplet formation in adipocytes promotes sterol regulatory element-binding protein-1 processing and triacylglyceride accumulation. *PLoS One* 8:e64605.
- Takasu T, Ukai M, Sato S, Matsui T, Nagase I, Maruyama T, Sasamata M, Miyata K, Uchida H, Yamaguchi O (2007). Effect of (R)-2-(2-amino- thiazol-4-yl)-40 -2-[(2-hydroxy-2-phenylethyl)amino]ethyl acetanilide (YM178), a novel selective beta3-adrenoceptor agonist, on bladder function. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 321: 642-647.
- Tanaka A, Cleland MM, Xu S, Narendra DP *et al.* (2010). Proteasome and p97 mediate mitophagy and degradation of mitofusins induced by Parkin. *J. Cell Biol.* 191: 1367-1380.
- Tang QQ, Gronborg M, Huang H *et al.* (2005). Sequential phosphorylation of C/EBP $\beta$  by MAPK and GSK3 $\beta$  is required for adipogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102: 9766-9771.
- Tang QQ, Otto TC, Lane MD (2003). CCAAT/enhancer-binding protein beta is required for mitotic clonal expansion during adipogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100: 850-855.
- Tang QQ, Otto TC, Lane MD (2003). Mitotic clonal expansion: asynchronous process required for adipogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100: 44-49.
- Tang QQ, Otto TC, Lane MD (2004). Commitment of C3H10T1/2 pluripotent stem cells to the adipocyte lineage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101: 9607-9611.
- Tang W, Zeev D, Suh JM, Bosnakovski D, Kyba M, Hammer RE, Tallquist MD, Graff JM (2008). White fat progenitor cells reside in the adipose vasculature. *Science* 322: 583-586.
- Tang X, Powelka AM, Soriano NA, Czech MP, Guilherme A (2005). PTEN, but not SHIP2, suppresses insulin signaling through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway in 3T3-L1 adipocytes. *J. Biol. Chem.* 280: 22523-22529.
- Tannenbaum A (1945). The dependence of tumor formation on the degree of caloric restriction. *Cancer Res.* 5: 609-615.
- Tansey EA, Johnson CD (2015). Recent advances in thermoregulation. *Adv. Physiol. Educ.* 39: 139-148.
- Taylor D, Gottlieb RA (2017). Parkin-mediated mitophagy is downregulated in browning of white adipose tissue. *Obesity* 25: 704-712.
- Taylor SS, Yang J, Wu J, Haste NM, Radzio-Andzelm E, Anand G (2004). PKA: a portrait of protein kinase dynamics. *Biochim. Biophys. Acta* 1697: 259-269.
- Tchernof A, Bèlanger C, Morisset AS, Richard C, Mailloux J, Laberge P, Dupont P (2006). Regional differences in adipose tissue metabolism in women. *Diabetes* 55: 1353-1360.
- Tchernof A, Despres JP (2013). Pathophysiology of human visceral obesity: an update. *Physiol. Rev.* 93: 359-404.

## ***-Bibliografía-***

Tchkonia T, Giorgadze N, Pirtskhalava T, Thomou T, DePonte M, Koo A, Forse RA, Chinnappan D, Martín-Ruiz C, von Zglinicki T, Kirkland JL (2006). Fat depot-specific characteristics are retained in strains derived from single human preadipocytes. *Diabetes* 55: 2571-2578.

Tchkonia T, Lenburg M, Thomou T, Giorgadze N, Frampton G, Pirtskhalava T, Cartwright A, Cartwright M, Flanagan J, Karagiannides I *et al.* (2007). Identification of depot-specific human fat cell progenitors through distinct expression profiles and developmental gene patterns. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 292: 298-307.

Tchkonia T, Thomou T, Zhu Y, Karagiannides I, Pothoulakis C, Jensen MD, Kirkland JL (2013). Mechanisms and metabolic implications of regional differences among fat depots. *Cell Metab.* 17: 644-656.

Tchoukalova YD, Votruba SB, Tchkonia T, Giorgadze N, Kirkland JL, Jensen MD (2010). Regional differences in cellular mechanisms of adipose tissue gain with overfeeding. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107: 18226-18231.

Tee AR, Manning BD, Roux PP, Cantely LC, Blenis J (2003). Tuberous sclerosis complex gene products, tuberin and hamartin, control mTOR signaling by acting as a GTPase-activating protein complex toward Rheb. *Curr. Biol.* 13: 1259-1268.

Teixeira LK, Reed SI (2013). Ubiquitin ligases and cell cycle control. *Annu. Rev. Biochem.* 82: 387-414.

Teng FY, Tang BL (2005). APC/C regulation of axonal growth and synaptic functions in postmitotic neurons: the liprin-alpha connection. *Cell Mol. Life Sci.* 62: 1571-1578.

Teruel T, Hernández R, Benito M, Lorenzo M (2003). Rosiglitazone and retinoic acid induce uncoupling protein-1 (UCP-1) in a p38 mitogen-activated protein kinase-dependent manner in fetal primary brown adipocytes. *J. Biol. Chem.* 278: 263-269.

Thornton BR, Toczyski DP (2003). Securin and B-cyclin/CDK are the only essential targets of the APC. *Nat. Cell Biol.* 5: 1090-1094.

Thwaites MJ, Cecchini MJ, Talluri S *et al.* (2017). Multiple molecular interactions redundantly contribute to RB-mediated cell cycle control. *Cell Div.* 12: 3.

Timchenko NA, Wilde M, Iakova P, Albrecht JH, Darlington GJ (1999). E2F/p107 and E2F/p130 complexes are regulated by C/EBPa in 3T3-L1 adipocytes. *Nucleic. Acids Res.* 27: 3621-3630.

Timmons JA, Wennmalm K, Larsson O, Waldén TB, Lassmann T, Petrovic N, Hamilton DL, Gimeno RE, Wahlestedt C, Baar K, Nedergaard J, Cannon B (2007). Myogenic gene expression signature establishes that brown and white adipocytes originate from distinct cell lineages. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 104: 4401-4406.

Tiraby C, Tavernier G, Lefort C, Larrouy D, Bouillaud F, Ricquier D, Langin D (2003). Acquisition of brown fat cell features by human white adipocytes. *J. Biol. Chem.* 278: 33370-33376.

Tomiya K, Nakata H, Sasa H, Arimura S, Eisuke N, Watanabe Y (1995). Wortmannin, a specific phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor, inhibits adipocytic differentiation of 3T3-L1 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 212: 263-269.

Tomlinson E, Fu L, John L, Hultgren B, Huang X *et al.* (2002). Transgenic mice expressing human fibroblast growth factor-19 display increased metabolic rate and decreased adiposity. *Endocrinology* 143: 1741-1747.

Tomlinson JJ, Boudreau A, Wu D, Abdou SH, Carrigan A, Gagnon A, Mears AJ, Sorisky A, Atlas E, Hache RJ (2010). Insulin sensitization of human preadipocytes through glucocorticoid hormone induction of forkhead transcription factors. *Mol. Endocrinol.* 24: 104-113.

- Tomlinson JJ, Boudreau A, Wu D, Atlas E, Hache RJ (2006). Modulation of early human preadipocyte differentiation by glucocorticoids. *Endocrinology* 147: 5284-5293.
- Tontonoz P, Hu E, Spiegelman BM (1994). Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR gamma 2, a lipid-activated transcription factor. *Cell* 79: 1147-1156.
- Tontonoz P, Spiegelman BM (2008). Fat and beyond: the diverse biology of PPARgamma. *Annu. Rev. Biochem.* 77: 289-312.
- Torp-Pedersen C, Caterson I, Coutinho W, Finer N, Van Gaal L, Maggioni A, Sharma A et al. (2007). Cardiovascular responses to weight management and sibutramine in high-risk subjects: an analysis from the SCOUT trial. *Eur. Heart J.* 28: 2915-2923.
- Trajkovski M, Lodish H (2013). MicroRNA networks regulate development of brown adipocytes. *Trends Endocrinol. Metab.* 24: 442-450.
- Tran TT, Yamamoto Y, Gesta S, Kahn CR (2008). Beneficial effects of subcutaneous fat transplantation on metabolism. *Cell Metab.* 7: 410-420.
- Trayhurn P (2005). Endocrine and signalling role of adipose tissue: new perspectives on fat. *Acta Physiol. Scand.* 184: 285-293.
- Trayhurn P, Ashwell M (1987). Control of white and brown adipose tissues by the autonomic nervous system. *Proc. Nutr. Soc.* 46: 135-142.
- Trotman LC, Wang X, Alimonti A et al. (2007). Ubiquitination regulates PTEN nuclear import and tumor suppression. *Cell* 128: 141-156.
- Trujillo ME, Scherer PE (2006). Adipose tissue-derived factors: impact on health and disease. *Endocr. Rev.* 27: 762-778.
- Tsai YS, Maeda N (2005). PPARγ: a critical determinant of body fat distribution in humans and mice. *Trends Cardiovasc. Med.* 15: 81-85.
- Tseng YH, Butte AJ, Kokkotou E, Yechoor VK, Taniguchi CM, Kriauciunas KM, Cypess AM et al. (2005). Prediction of preadipocyte differentiation by gene expression reveals role of insulin receptor substrates and necdin. *Nature Cell Biol.* 7: 601-611.
- Tseng YH, He TC (2007). Bone morphogenetic proteins and adipocyte differentiation. *Cell Sci. Rev.* 3: 342-360.
- Tseng YH, Kokkotou E, Schulz TJ, Huang TL, Winnay JN, Taniguchi CM, Tran TT, Suzuki R, Espinoza DO, Yamamoto Y et al. (2008). New role of bone morphogenetic protein 7 in brown adipogenesis and energy expenditure. *Nature* 454: 1000-1004.
- Tseng YH, Kriauciunas KM, Kokkotou E, Kahn CR (2004). Differential roles of insulin receptor substrates in brown adipocyte differentiation. *Mol. Cell Biol.* 24: 1918-1929.
- Tsoli M, Moore M, Burg D, Painter A, Taylor R, Lockie SH, Turner N, Warren A, Cooney G, Oldfield B, Clarke S, Robertson G (2012). Activation of thermogenesis in brown adipose tissue and dysregulated lipid metabolism associated with cancer cachexia in mice. *Cancer Res.* 72: 4372-4382.
- Tsvetkov LM, Yeh KH, Lee SJ, Sun H, Zhang H (1999). p27(Kip1) ubiquitination and degradation is regulated by the SCF(Skp2) complex through phosphorylated Thr187 in p27. *Curr. Biol.* 9: 661-664.
- Ukropec J, Anunciado RP, Ravussin Y, Hulver MW, Kozak LP (2006). UCP1-independent thermogenesis in white adipose tissue of cold-acclimated Ucp1<sup>-/-</sup> mice. *J. Biol. Chem.* 281: 31894-31908.

## ***-Bibliografía-***

Uldry M, Yang W, St Pierre J, Lin J, Seale P, Spiegelman BM (2006). Complementary action of the PGC-1 coactivators in mitochondrial biogenesis and brown fat differentiation. *Cell Metab.* 3: 333-341.

Um SH, Frigerio F, Watanabe M, Picard F, Joaquín M, Sticker M *et al.* (2004). Absence of S6K1 protects against age- and diet-induced obesity while enhancing insulin sensitivity. *Nature* 431: 200-205.

Urs S, Harrington A, Liaw L, Small D (2006). Selective expression of an  $\alpha$ 2/fatty acid binding protein 4-Cre transgene in non-adipogenic tissues during embryonic development. *Transgenic Res.* 15: 647-653.

Ursino MG, Vasina V, Raschi E, Crema F, De Ponti F (2009). The beta3-adrenoceptor as a therapeutic target: current perspectives. *Pharmacol. Res.* 5: 221-234.

Vague J (1956). The degree of masculine differentiation of obesities: a factor determining predisposition to diabetes, atherosclerosis, gout, and uric calculous disease. *Am. J. Clin. Nutr.* 4: 20-34.

Valverde AM, Arribas M, Mur C, Navarro P, Pons S, Cassard-Doulcier AM, Kahn CR, Benito M (2003). Insulin-induced up-regulated uncoupling protein-1 expression is mediated by insulin receptor substrate 1 through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway in fetal brown adipocytes. *J. Biol. Chem.* 278: 10221-10231.

Valverde AM, Benito M, Lorenzo M (2005). The brown adipose cell: a model for understanding the molecular mechanisms of insulin resistance. *Acta Physiol. Scand.* 183: 59-73.

Van Baak MA, Hul GBJ, Toubro S, Astrup A, Gottesdiener KM, DeSmet M, Saris WHM (2002). Acute effect of L-796568, a novel beta 3-adrenergic receptor agonist, on energy expenditure in obese men. *Clin. Pharmacol. Ther.* 71: 272-279.

Van den Heuvel S, Dyson NJ (2008). Conserved functions of the pRB and E2F families. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9: 713-724.

Van der Klaauw AA, Farooqi IS (2015). The hunger genes: pathways to obesity. *Cell.* 161: 119-32.

Van der Lans AA, Hoeks J, Brans B, Vijgen GH, Visser MG, Vosselman MJ, Hansen J, Jörgensen JA, Wu J, Mottaghy FM, Schrauwen P, van Marken Lichtenbelt WD (2013). Cold acclimation recruits human brown fat and increases nonshivering thermogenesis. *J. Clin. Invest.* 123: 3395-3403.

Van Marken Lichtenbelt WD, Schrauwen P (2011). Implications of nonshivering thermogenesis for energy balance regulation in humans. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 301: 285-296.

Van Marken Lichtenbelt WD, Vanhomerig JW, Smulders NM, Drossaerts JM, Kemerink GJ, Bouvy ND, Schrauwen P, Teule GJ (2009). Cold-activated brown adipose tissue in healthy men. *N. Engl. J. Med.* 360: 1500-1508.

Van Roessel P, Elliott DA, Robinson IM, Prokop A, Brand AH (2004). Independent regulation of synaptic size and activity by the anaphase-promoting complex. *Cell* 119: 707-718.

Van Themsche C, Leblanc V, Parent S, Asselin E (2009). X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP) regulates PTEN ubiquitination, content, and compartmentalization. *J. Biol. Chem.* 284: 20462-20466.

Vander Haar E, Lee SI, Bandhakavi S, Griffin TJ, Kim DH (2007). Insulin signalling to mTOR mediated by the Akt/PKB substrate PRAS40. *Nat. Cell Biol.* 9: 316-323.

Varshavsky A (2012). The ubiquitin system, an immense realm. *Annu. Rev. Biochem.* 81: 167-176.

Veeriah S, Taylor BS, Meng S *et al.* (2010). Somatic mutations of the Parkinson's disease-associated gene PARK2 in glioblastoma and other human malignancies. *Nat. Genet.* 42: 77-82.

- Vegiopoulos A, Muller-Decker K, Strzoda D, Schmitt I, Chichelnitskiy E, Ostertag A, Berriel DM, Rozman J, de Hrade AM, Nusing RM *et al.* (2010). Cyclooxygenase-2 controls energy homeostasis in mice by de novo recruitment of brown adipocytes. *Science* 328: 1158-1161.
- Vegiopoulos A, Müller-Decker K, Strzoda D, Schmitt I, Chichelnitskiy E, Ostertag A, Berriel-Díaz M, Rozman J, Hrade de Angelis M, Nusing RM *et al.* (2010). Cyclooxygenase-2 controls energy homeostasis in mice by de novo recruitment of brown adipocytes. *Science* 328: 1158-1161.
- Vegiopoulos A, Rohm M, Herzig S (2017). Adipose tissue: between the extremes. *EMBO J.* 36: 1999-2017.
- Vergnes L, Reue K (2014). Adaptive thermogenesis in white adipose tissue: is lactate the new brown(ing)? *Diabetes* 63: 3175-3176.
- Vernia S, Edwards YJ, Han MS, Cavanagh-Kyros J, Barrett T, Kim JK, Davis RJ (2016). An alternative splicing program promotes adipose tissue thermogenesis. *eLife* 5: e17672.
- Vernochet C, Peres SB, Davis KE, McDonald ME, Qiang L, Wang H, Scherer PE, Farmer SR (2009). C/EBPalpha and the corepressors CtBP1 and CtBP2 regulate repression of select visceral white adipose genes during induction of the brown phenotype in white adipocytes by peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists. *Mol. Cell Biol.* 29: 4714-4728.
- Viana-Huete V, Guillén C, García-Aguilar A, García G, Fernández S, Kahn CR, Benito M (2016). Essential role of IGFIR in the onset of male brown fat thermogenic function: regulation of glucose homeostasis by differential organ-specific insulin sensitivity. *Endocrinology* 157: 1495-1511.
- Vidal-Puig A, Solanes G, Grujic D, Flier JS, Lowell BB (1997). UCP3: an uncoupling protein homologue expressed preferentially and abundantly in skeletal muscle and brown adipose tissue. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 235: 79-82.
- Vidal-Puig AJ, Grujic D, Zhang CY, Hagen T *et al.* (2000). Energy metabolism in uncoupling protein 3 gene knockout mice. *J. Biol. Chem.* 275: 16258-16266.
- Vijgen GH, Bouvy ND, Teule GJ, Brans B, Hoeks J, Schrauwen P, van Marken Lichtenbelt WD (2012). Increase in brown adipose tissue activity after weight loss in morbidly obese subjects. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 97: 1229-1233.
- Vijgen GH, Bouvy ND, Teule GJ, Brans B, Schrauwen P, van Marken Lichtenbelt WD (2011). Brown adipose tissue in morbidly obese subjects. *PLoS One* 6: e17247.
- Vijgen GH, Sparks LM, Bouvy ND, Schaart G, Hoeks J, Van Marken Lichtenbelt WD *et al.* (2013). Increased oxygen consumption in human adipose tissue from the "brown adipose tissue" region. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 98: 1230-1234.
- Vila-Bedmar R, Lorenzo M, Fernández-Veledo S (2010). Adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase-mammalian target of rapamycin cross talk regulates brown adipocyte differentiation. *Endocrinology* 151: 980-992.
- Villanueva CJ, Vergnes L, Wang J *et al.* (2013). Adipose subtype-selective recruitment of TLE3 or Prdm16 by PPARγ specifies lipid storage versus thermogenic gene programs. *Cell Metab.* 17: 423-435.
- Villarroya F, Peyrou M, Giralt M (2017). Transcriptional regulation of the uncoupling protein-1 gene. *Biochimie.* 134: 86-92.
- Villarroya F, Vidal-Puig A (2013). Beyond the sympathetic tone: the new brown fat activators. *Cell Metab.* 17: 638-643.
- Villarroya J, Cereijo, Villarroya F (2013). An endocrine role for brown adipose tissue? *Am. J. Physiol.*

## ***-Bibliografía-***

*Endocrinol. Metab.* 305: 567-572.

Villena JA, Kim KH, Sul HS (2002). Pref-1 and ADSF/resistin: two secreted factors inhibiting adipose tissue development. *Horm. Metab. Res.* 34: 664-670.

Vincow ES, Merrihew G, Thomas RE *et al.* (2013). The PINK1–Parkin pathway promotes both mitophagy and selective respiratory chain turnover *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 110: 6400-6405.

Virtanen KA, Lidell ME, Orava J, Heglind M, Westergren R, Niemi T, Taittonen M, Laine J, Savisto NJ, Enerbäck S, Nuutila P (2009). Functional brown adipose tissue in healthy adults. *N. Engl. J. Med.* 360: 1518-1525.

Virtanen KA, Lidell ME, Orava J, Heglind M, Westergren R, Niemi T, Taittonen , Laine J, Savisto NJ, Enerbäck S, Nuutila P (2009). Functional brown adipose tissue in healthy adults. *N. Engl. J. Med.* 360: 1518-1525.

Virtue S, Vidal-Puig A (2010). Adipose tissue expandability, lipotoxicity and the metabolic syndrome - an allostatic perspective. *Biochim. Biophys. Acta* 1801: 338-349.

Vitali A, Murano I, Zingaretti MC, Frontini A, Ricquier D, Cinti S (2012). The adipose organ of obesity-prone C57BL/6J mice is composed of mixed white and brown adipocytes. *J. Lipid Res.* 53: 619-629.

Vives-Bauza C, Zhou C, Huang Y *et al.* (2010). PINK1-dependent recruitment of Parkin to mitochondria in mitophagy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107: 378-383.

Von Essen G, Lindsund E, Cannon B, Nedergaard J (2017). Adaptive facultative diet-induced thermogenesis in wild-type but not in UCP1-ablated mice. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 313: 515-527.

Vosselman MJ, van der Lans AA, Brans B, Wierts R, van Baak MA, Schrauwen P, van Marken Lichtenbelt WD (2012). Systemic b-adrenergic stimulation of thermogenesis is not accompanied by brown adipose tissue activity in humans. *Diabetes* 61: 3106-3113.

Waite KJ, Floyd ZE, Arbour-Reily P, Stephens JM (2001). Interferon-gamma-induced regulation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma and STATs in adipocytes. *J. Biol. Chem.* 276: 7062-7068.

Waki H, Tontonoz P (2007). Endocrine functions of adipose tissue. *Annu. Rev. Pathol.* 2: 31-56.

Waldén TB, Hansen IR, Timmons JA, Cannon B, Nedergaard J (2012). Recruited vs. nonrecruited molecular signatures of brown, “brite” and white adipose tissues. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 302: 19-31.

Wan L, Zou W, Gao D, Inuzuka H *et al.* (2011). Cdh1 regulates osteoblast function through an APC/C-independent modulation of smurf1. *Mol. Cell* 44: 721-733.

Wan Y, Liu X, Kirschner MW (2001). The anaphase-promoting complex mediates TGF-beta signaling by targeting SnoN for destruction. *Mol. Cell* 8: 1027-1039.

Wang C, Pattabiraman N, Zhou JN, Fu M, Sakamaki T, Albanese C, Li Z, Wu K, Hulit J, Neumeister P *et al.* (2003). Cyclin D1 repression of peroxisome proliferator-activated receptor gamma expression and transactivation. *Mol. Cell. Biol.* 23: 6159-6173.

Wang F, Mullican SE, DiSpirito JR, Peed LC, Lazar MA (2013). Lipoatrophy and severe metabolic disturbance in mice with fat-specific deletion of PPARγ. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 110: 18656-18661.

Wang GL, Shi X, Salisbury E *et al.* (2006). Cyclin D3 maintains growth-inhibitory activity of C/EBPα by stabilizing C/EBPα-cdk2 and C/EBPα-Brm complexes. *Mol Cell Biol* 26: 2570-2582.

Wang GX, Zhao XY, Lin JD (2015). The brown fat secretome: metabolic functions beyond thermogene-



sis. *Trends in Endocrinology and Metabolism* 26: 231-237.

Wang H, Liu L, Lin JZ, Aprahamian TR, Farmer SR (2016). Browning of white adipose tissue with roscovitine induces a distinct population of UCP1+ adipocytes. *Cell Metabolism* 24: 835-847.

Wang Q, Zhang M, Ning G, Gu W, Su T, Xu M, Li B, Wang W (2011). Brown adipose tissue in humans is activated by elevated plasma catecholamines levels and is inversely related to central obesity. *PLoS One* 6: e21006.

Wang QA, Tao C, Gupta RK, Scherer PE (2013). Tracking adipogenesis during white adipose tissue development, expansion and regeneration. *Nat. Med.* 19: 1338-1344.

Wang W, Meng X, Yang C *et al.* (2017). Brown adipose tissue activation in a rat model of Parkinson's disease. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*: ajpendo.00049.2017.

Wang X, Proud CG (2016). mTORC2 is a tyrosine kinase. *Cell Res.* 26: 1-2.

Wang X, Trotman LC, Koppie T, Alimonti A, Chen Z, Gao Z *et al.* (2007). NEDD4-1 is a proto-oncogenic ubiquitin ligase for PTEN. *Cell* 128: 129-139.

Wang Y, Hudak C, Sul HS (2010). Role of preadipocyte factor 1 in adipocyte differentiation. *Clin. Lipidol.* 5: 109-115.

Wang Y, Kim KA, Kim JH, Sul HS (2006). Pref-1, a preadipocyte secreted factor that inhibits adipogenesis. *J. Nutr.* 136: 2953-6.

Wang Y, Sul HS (2009). Pref-1 regulates mesenchymal cell commitment and differentiation through Sox9. *Cell Metab.* 9: 287-302.

Wang ZV, Deng Y, Wang QA, Sun K, Scherer PE (2010). Identification and characterization of a promoter cassette conferring adipocyte-specific gene expression. *Endocrinology* 151: 2933-2939.

Warner A, Mittag J (2016). Breaking BAT: can browning create a better white? *J. Endocrinol.* 228: 19-29.

Wäsch R, Robbins JA, Cross FR (2010). The emerging role of APC/CCdh1 in controlling differentiation, genomic stability and tumor suppression. *Oncogene* 29: 1-10.

Watanabe M, Houten SM, Matakai C, Christoffolete MA, Kim BW, Sato H, Messaddeq N, Harney JW, Ezaki O, Kodama T *et al.* (2006). Bile acids induce energy expenditure by promoting intracellular thyroid hormone activation. *Nature* 439: 484-489.

Watanabe M, Takahashi H, Saeki Y, Ozaki T, Itoh S, Suzuki M, Mizushima W, Tanaka K, Hatakeyama S (2015). The E3 ubiquitin ligase TRIM23 regulates adipocyte differentiation via stabilization of the adipogenic activator PPAR $\gamma$ . *eLife* 4: e05615.

Weber TM, Joost HG, Kuroda M, Cushman SW, Simpson IA (1991). Subcellular distribution and phosphorylation state of insulin receptors from insulin- and isoproterenol-treated rat adipose cells. *Cell Signal.* 3: 51-58.

Wei W, Ayad NG, Wan Y, Zhang GJ, Kirschner MW, Kaelin WG Jr. (2004). Degradation of the SCF component Skp2 in cell-cycle phase G1 by the anaphase-promoting complex. *Nature* 431: 194-198.

Wei W, Dutchak PA, Wang X, Ding X, Wang X, Bookout AL *et al.* (2012). Fibroblast growth factor 21 promotes bone loss by potentiating the effects of peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 109: 3143-3148.

Weigle DS, Selfridge LE, Schwartz MW, Seeley RJ, Cummings DE, Havel PJ, Kuijper JL, Beltran del Río H (1998). Elevated fatty acids induce uncoupling protein 3 expression in muscle: a potential explanation for the effect of fasting. *Diabetes* 47: 298-302.

## ***-Bibliografía-***

Weyer C, Tataranni PA, Snitker S, Danforth E, Ravussin E (1998). Increase in insulin action and fat oxidation after treatment with CL316,243, a highly selective beta3-adrenoceptor agonist in humans. *Diabetes* 47: 1555-1561.

Whiteman DC, Zhou XP, Cummings MC, Pavey S, Hayward NK, Eng C (2002). Nuclear PTEN expression and clinicopathologic features in a population-based series of primary cutaneous melanoma. *Int. J. Cancer* 99: 63-67.

Whiteman EL, Cho H, Birnbaum MJ (2002). Role of Akt/protein kinase B in metabolism. *Trends Endocrinol. Metab.* 13: 444-451.

Whittle AJ, Carobbio S, Martins L, Slawik M, Hondares E, Vázquez MJ, Morgan D, Csikasz RI, Gallego R, Rodríguez-Cuenca S *et al.* (2012). BMP8B increases brown adipose tissue thermogenesis through both central and peripheral actions. *Cell* 149: 871-885.

Whittle AJ, López M, Vidal-Puig A (2011). Using brown adipose tissue to treat obesity - the central issue. *Trends Mol. Med.* 17: 405-411.

WHO (2017). Fact sheet: obesity and overweight. *World Health Organization*.

Widberg CH, Newell FS, Bachmann AW, Ramnoruth SN, Spelta MC, Whitehead JP, Hutley LJ, Prins JB (2009). Fibroblast growth factor receptor 1 is a key regulator of early adipogenic events in human preadipocytes. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 296: 121-131.

Wilcox G (2005). Insulin and insulin resistance. *Clin. Biochem. Rev.* 26: 19-39.

Wilkinson KD (1999). Ubiquitindependent signaling: the role of ubiquitination in the response of cells to their environment. *J. Nutr.* 129: 1933-1936.

Wilkinson KD (2000). Ubiquitination and deubiquitination: targeting of proteins for degradation by the proteasome. *Semin. Cell Dev. Biol.* 11: 141-148.

Wilson-Fritch L, Nicoloso S, Chouinard M, Lazar MA, Chui PC, Leszyk J, Straubhaar J, Czech MP, Corvera S (2004). Mitochondrial remodeling in adipose tissue associated with obesity and treatment with rosiglitazone. *J. Clin. Invest.* 114: 1281-1289.

Wing RR, Tate DF, Gorin AA, Raynor HA, Fava JL (2006). A self-regulation program for maintenance of weight loss. *N. Eng. J. Med.* 355: 1563-1571.

Winkler E, Klingenberg M (1994). Effect of fatty acids on H<sub>p</sub> transport activity of the reconstituted uncoupling protein. *J. Biol. Chem.* 269: 2508-2515.

Winklhofer KF (2014). Parkin and mitochondrial quality control: toward assembling the puzzle. *Trends Cell Biol.* 24: 332-341.

Wiper-Bergeron N, Salem HA, Tomlinson JJ, Wu D, Hache RJ (2007). Glucocorticoid-stimulated preadipocyte differentiation is mediated through acetylation of C/EBPbeta by GCN5. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 104: 2703-2708.

Worby CA, Dixon JE (2014). PTEN. *Annu. Rev. Biochem.* 83: 641-669.

Wright SM, Aronne LJ (2012). Causes of obesity. *Abdominal Imaging* 37: 730-732.

Wu G, Glickstein S, Liu W, Fujita T, Li W, Yang Q, Duvoisin R, Wan Y (2007). The anaphase-promoting complex coordinates initiation of lens differentiation. *Mol. Biol. Cell* 18: 1018-1029.

Wu J, Boström P, Sparks LM, Ye L, Choi JH, Giang AH, Khandekar M, Virtanen KA, Nuutila P, Schaart

- G *et al.* (2012). Beige adipocytes are a distinct type of thermogenic fat cell in mouse and human. *Cell* 150: 366-376.
- Wu J, Cohen P, Spiegelman BM (2013). Adaptive thermogenesis in adipocytes: is beige the new brown? *Genes Dev.* 27: 234-250.
- Wu R, Liu XM, Sun JG, Chen H, Ma J, Dong M, Peng S *et al.* (2017). DJ-1 maintains energy and glucose homeostasis by regulating the function of brown adipose tissue. *Cell Discov.* 3: 16054.
- Wu Z, Bucher NL, Farmer SR (1996). Induction of peroxisome proliferator-activated receptor gamma during the conversion of 3T3 fibroblasts into adipocytes is mediated by C/EBPbeta, C/EBPdelta, and glucocorticoids. *Mol. Cell Biol.* 16: 4128-4236.
- Wu Z, Rosen ED, Brun R, Hauser S, Adelmant G, Troy AE, McKeon C, Darlington GJ, Spiegelman BM (1999). Cross-regulation of C/EBP alpha and PPAR gamma controls the transcriptional pathway of adipogenesis and insulin sensitivity. *Mol. Cell* 3: 151-158.
- Wullschleger S, Loewith R, Hall MN (2006). TOR signaling in growth and metabolism. *Cell* 124: 471-484.
- Xiong Y, Hannon GJ, Zhang H, Casso D, Kobayashi R, Beach D (1993). p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases. *Nature* 366: 701-704.
- Xu B, Gerin I, Miao H, Vu-Phan D, Johnson CN, Xu R, Chen XW, Cawthorn WP, MacDougald OA, Koenig RJ (2010). Multiple roles for the non-coding RNA SRA in regulation of adipogenesis and insulin sensitivity. *PLoS ONE* 5: e14199.
- Xu G, Sztalryd C, Lu X, Tansey JT, Gan J, Dorward H, Kimmel AR, Londos C (2005). Post-translational regulation of adipose differentiation-related protein by the ubiquitin/proteasome pathway. *J. Biol. Chem.* 280: 42841-42847.
- Xu J, Liao K (2004). Protein kinase B/AKT 1 plays a pivotal role in insulin-like growth factor-1 receptor signaling induced 3T3-L1 adipocyte differentiation. *J. Biol. Chem.* 279: 35914-35922.
- Xu S, Peng G, Wang Y, Fang S, Karbowski M (2011). The AAA-ATPase p97 is essential for outer mitochondrial membrane protein turnover. *Mol. Biol. Cell* 22: 291-300.
- Xu X, Ying Z, Cai M, Xu Z, Li Y, Jiang SY, Tzan K, Wang A, Parthasarathy S, He G *et al.* (2011). Exercise ameliorates high-fat diet-induced metabolic and vascular dysfunction, and increases adipocyte progenitor cell population in brown adipose tissue. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 300: 1115-1125.
- Xue B, Rim JS, Hogan JC, Coulter AA, Koza RA, Kozak LP (2007). Genetic variability affects the development of brown adipocytes in white fat but not in interscapular brown fat. *J. Lipid Res.* 48: 41-51.
- Yahagi N, Shimano H, Matsuzaka T, Najima Y, Sekiya M, Nakagawa Y, Ide T *et al.* (2003). p53 activation in adipocytes of obese mice. *J. Biol. Chem.* 278: 25395-25400.
- Yahagi N, Shimano H, Matsuzaka T, Sekiya M, Najima Y (2004). p53 involvement in the pathogenesis of fatty liver disease. *J. Biol. Chem.* 279: 20571-20575.
- Yamada M, Watanabe K, Mistrik M *et al.* (2013). ATR-Chk1-APC/CCdh1-dependent stabilization of Cdc7-ASK (Dbf4) kinase is required for DNA lesion bypass under replication stress. *Genes Dev.* 27: 2459-2472.
- Yamaguchi M, Yu S, Qiao R *et al.* (2015). Structure of an APC3-APC16 complex: insights into assembly of the anaphase-promoting complex/cyclosome. *J. Mol. Biol.* 427: 1748-1764.
- Yamamuro T, Kano K, Naito K. (2008). Functions of FZR1 and CDC20, activators of the anaphase-

## ***-Bibliografía-***

- promoting complex, during meiotic maturation of swine oocytes. *Biol. Reprod.* 79: 1202-1209.
- Yamasaki M, Emoto H, Konishi M, Mikami T, Ohuchi H, Nakao K, Itoh N (1999). FGF-10 is a growth factor for preadipocytes in white adipose tissue. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 258: 109-112.
- Yamashita M, Ying SX, Zhang GM, Li C, Cheng SY, Deng CX, Zhang YE (2005). Ubiquitin ligase Smurf1 controls osteoblast activity and bone homeostasis by targeting MEKK2 for degradation. *Cell* 121: 101-113.
- Yao L, Cui X, Chen Q, Yang X, Fang F, Zhang J, Liu G, Jin W, Chang Y (2017). Cold-inducible SIRT6 regulates thermogenesis of brown and beige fat. *Cell Reports* 20: 641-654.
- Yao W, Qian W, Zhu C, Gui L, Qiu J, Zhang C (2010). Cdh1-APC is involved in the differentiation of neural stem cells into neurons. *Neuroreport* 21: 39-44.
- Yao Y, Suraokar M, Darnay BG, Hollier BG *et al.* (2013). BSTA promotes mTORC2-mediated phosphorylation of Akt1 to suppress expression of FoxC2 and stimulate adipocyte differentiation. *Sci. Signal.* 6: ra2.
- Yarmo MN, Landry A, Molgat AS *et al.* (2009). Macrophage-conditioned medium inhibits differentiation-induced Rb phosphorylation in 3T3-L1 preadipocytes. *Exp. Cell Res.* 315: 411-418.
- Yau H, Rivera K, Lomonaco R, Cusi K (2013). The future of thiazolidinedione therapy in the management of type 2 diabetes mellitus. *Curr. Diab. Rep.*, 13: 329-341.
- Ye JM, Dzamko N, Cleasby ME, Hegarty BD, Furler SM, Cooney GJ, Kraegen EW (2004). Direct demonstration of lipid sequestration as a mechanism by which rosiglitazone prevents fatty-acid-induced insulin resistance in the rat: comparison with metformin. *Diabetologia* 47: 1306-1313.
- Ye L, Wu J, Cohen P, Kazak L, Khandekar MJ, Jedrychowski MP, Zeng X, Gygi SP, Spiegelman BM (2013). Fat cells directly sense temperature to activate thermogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 110: 12480-12485.
- Yeh WC, Bierer BE, McKnight SL (1995). Rapamycin inhibits clonal expansion and adipogenic differentiation of 3T3-L1 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 11086-11090.
- Yeo CW, Ng FS, Chai C, Tan JM *et al.* (2012). Parkin pathway activation mitigates glioma cell proliferation and predicts patient survival. *Cancer Res.* 72: 2543-2553.
- Yoneshiro T, Aita S, Matsushita M, Kameya T, Nakada K, Kawai Y, Saito M (2011). Brown adipose tissue, whole-body energy expenditure, and thermogenesis in healthy adult men. *Obesity* 19: 13-16.
- Yoneshiro T, Aita S, Matsushita M, Kayahara T, Kameya T, Kawai Y, Iwanaga T, Saito M (2013). Recruited brown adipose tissue as an anti-obesity agent in humans. *J. Clin. Invest.* 123: 3404-3408.
- Yoneshiro T, Aita S, Matsushita M, Okamatsu-Ogura Y, Kameya T, Kawai Y, Miyagawa M, Tsujisaki M, Saito M (2011). Age-related decrease in brown adipose tissue and obesity in humans. *Obesity* 19: 1755-60.
- Yoon MS, Zhang C, Sun Y, Schoenherr CJ, Chen J (2013). Mechanistic target of rapamycin controls homeostasis of adipogenesis. *J. Lipid Res.* 54: 2166-2173.
- Yoshii SR, Kishi C, Ishihara N, Mizushima N (2011). Parkin mediates proteasome-dependent protein degradation and rupture of the outer mitochondrial membrane. *J. Biol. Chem.* 286: 19630-19640.
- Youle RJ, Narendra DP (2011). Mechanisms of mitophagy. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 12: 9-14.
- Young P, Arch JR, Ashwell M (1984). Brown adipose tissue in the parametrial fat pad of the mouse. *FEBS Lett.* 167: 10-14.

- Yu H (2007). Cdc20: a WD40 activator for a cell cycle degradation machine. *Mol. Cell* 27: 3-16.
- Yu Y, Yoon SO, Poulogiannis G *et al.* (2011). Phosphoproteomic analysis identifies Grb10 as an mTORC1 substrate that negatively regulates insulin signaling. *Science* 332: 1322-1326.
- Yubero P, Barbera MJ, Álvarez R, Vinas O, Mampel T, Iglesias R, Villarroya F, Giralt M (1998). Dominant negative regulation by c-Jun of transcription of the uncoupling protein-1 gene through a proximal cAMP-regulatory element: a mechanism for repressing basal and norepinephrine-induced expression of the gene before brown adipocyte differentiation. *Mol. Endocrinol.* 12: 1023-1037.
- Yubero P, Manchado C, Cassard-Doulcier AM, Mampel T, Vinas O, Iglesias R, Giralt M, Villarroya F (1994). CCAAT/enhancer binding proteins alpha and beta are transcriptional activators of the brown fat uncoupling protein gene promoter. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 198: 653-659.
- Yubero, P, Barberá MJ, Álvarez R, Viñas O, Mampel T, Iglesias R *et al.* (1998). Dominant negative regulation by c-Jun of transcription of the uncoupling protein-1 gene through a proximal cAMP-regulatory element: a mechanism for repressing basal and norepinephrine-induced expression of the gene before brown adipocyte differentiation. *Mol. Endocrinol.* 12: 1023-1037.
- Yun SJ, Kim EK, Tucker DF, Kim CD, Birnbaum MJ *et al.* (2008). Isoform-specific regulation of adipocyte differentiation by Akt/protein kinase B. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 371: 138-143.
- Yusuf S, Hawken S, Ounpuu S *et al.* (2005). Obesity and the risk of myocardial infarction in 27,000 participants from 52 countries: a case-control study. *Lancet* 366: 1640-1649.
- Zamani N, Brown CW (2011). Emerging roles for the transforming growth factor-beta superfamily in regulating adiposity and energy expenditure. *Endocr. Rev.* 32: 387-403.
- Zannettino AC, Paton S, Arthur A, Khor F, Itescu S, Gimble JM, Gronthos S (2008). Multipotential human adipose-derived stromal stem cells exhibit a perivascular phenotype *in vitro* and *in vivo*. *J. Cell. Physiol.* 214: 413-421.
- Zechner R, Strauss JG, Haemmerle G, Lass A, Zimmermann R (2005). Lipolysis: pathway under construction. *Curr. Opin. Lipidol.* 16: 333-340.
- Zechner R, Zimmermann R, Eichmann TO, Kohlwein SD, Haemmerle G, Lass A, Madeo F (2012). Fat signals – lipases and lipolysis in lipid metabolism and signaling. *Cell Metab.* 15: 279-291.
- Zhang CY, Baffy G, Perret P, Krauss S *et al.* (2001). Uncoupling protein-2 negatively regulates insulin secretion and is a major link between obesity, beta cell dysfunction, and type 2 diabetes. *Cell* 105: 745-755.
- Zhang G, Sun Q, Liu C (2016). Influencing factors of thermogenic adipose tissue activity. *Front. Physiol.* 7: 29.
- Zhang H, Kobayashi R, Galaktionov K, Beach D (1995). p19Skp1 and p45Skp2 are essential elements of the cyclin A-CDK2 S phase kinase. *Cell* 82: 915-925.
- Zhang HH, Huang J, Düvel K *et al.* (2009). Insulin stimulates adipogenesis through the Akt-TSC2–mTORC1 pathway. *PLoS One* 4: e6189.
- Zhang J, Hupfeld CJ, Taylor SS, Olefsky JM, Tsien RY (2005). Insulin disrupts b-adrenergic signalling to protein kinase A in adipocytes. *Nature* 437: 569-573.
- Zhang J, Li Y (2015). Fibroblast Growth factor 21 analogs for treating metabolic disorders. *Front. Endocrinol.* 6: 168.
- Zhang JW, Tang QQ, Vinson C, Lane MD (2004). Dominant-negative C/EBP disrupts mitotic clonal ex-

## ***-Bibliografía-***

pansion and differentiation of 3T3-L1 preadipocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101: 43-47.

Zhang X, Gan L, Pan H, Guo S, He X, Olson ST, Mesecar A, Adam S, Unterman TG (2002). Phosphorylation of Ser 256 suppresses transactivation by FKHR (FOXO1) by multiple mechanisms. Direct and indirect effects on nuclear/cytoplasmic shuttling and DNA binding. *J. Biol. Chem.* 277: 45276-45284.

Zhang Z, Yang J, Kong EH *et al.* (2013). Recombinant expression, reconstitution and structure of human anaphase-promoting complex (APC/C). *Biochem. J.* 449: 365-371.

Zhao XY, Li S, Wang GX, Yu Q, Lin JD (2014). A long noncoding RNA transcriptional regulatory circuit drives thermogenic adipocyte differentiation. *Molecular Cell* 55: 372-382.

Zhou XP, Loukola A, Salovaara R *et al.* (2002). PTEN mutational spectra, expression levels, and subcellular localization in microsatellite stable and unstable colorectal cancers. *Am. J. Pathol.* 161: 439-447.

Zhou Y, Ching YP, Chun AC, Jin Dy (2003). Nuclear localization of the cell cycle regulator CDH1 and its regulation by phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 278: 12530-12536.

Zhou Z, He M, Shah AA, Wan Y (2016). Insights into APC/C: from cellular function to diseases and therapeutics. *Cell Div.* 11: 9.

Zhou Z, Yon TS, Chen Z, Guo K, Ng CP, Ponniah S, Lin SC, Hong W, Li P (2003). Cidea-deficient mice have lean phenotype and are resistant to obesity. *Nat. Genet.* 35: 49-56.

Zingaretti MC, Crosta F, Vitali A, Guerrieri M, Frontini A, Cannon B *et al.* (2009). The presence of UCP1 demonstrates that metabolically active adipose tissue in the neck of adult humans truly represents brown adipose tissue. *FASEB J.* 23: 3113-3120.

Ziviani E, Tao RN, Whitworth AJ (2010). Drosophila parkin requires PINK1 for mitochondrial translocation and ubiquitinates mitofusin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107: 5018-5023.

Zou P, Liu L, Zheng L, Liu L, Stoneman RE, Cho A, Emery A, Gilbert ER, Cheng Z (2014). Targeting FoxO1 with AS1842856 suppresses adipogenesis. *Cycle* 13: 3759-3767.

Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, Benhaim P, Lorenz HP, Hedrick MH (2001). Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng.* 7: 211-228.

Zúñiga LA, Shen WJ, Joyce-Shaikh B, Pyatnova EA, Richards AG, Thom C, Andrade SM, Cua DJ, Kraemer FB, Butcher EC (2010). IL-17 regulates adipogenesis, glucose homeostasis, and obesity. *J. Immunol.* 185: 6947-6959.