



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Trabajo de Tesis Doctoral:

*ROL DE LAS QUINASAS DEPENDIENTES DE
CICLINA DE LA TRANSICIÓN DE FASE G1/S EN
EL BROWNING DEL TEJIDO ADIPOSO BLANCO*

Tesista: Portales Andrea Estefanía

Director: Giovambattista Andrés

Año: 2020

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a todas las personas que de una u otra forma colaboraron para la realización de esta tesis:

- a mi director, Bamba, por brindarme la oportunidad de realizar la tesis en el laboratorio y confiar en mi para llevar a cabo este estudio. Además, quiero agradecerle por darme la libertad para equivocarme y aprender.
- a mis compañeras de laboratorio Anita, Guille, Sabri y Amandis por ayudarme muchas veces, no solo en la mesada sino también dándome consejos.
- a Sabri especialmente por ayudarme, acompañarme y guiarme en la realización y análisis de los experimentos de citometría.
- a los *NE effectors* por el tiempo compartido en el laboratorio, y especialmente por el apoyo de los últimos años.
- a todo Becarios 1 y 2 por hacer muuucho más divertido el trabajo diario. Disculpen si algún día por casualidad grité.
- a mis amigos Rom y Valen por las innumerables charlas y momentos compartidos.
- a Lau por el cálido recibimiento a Becarios 1, su compañía y consejos de los primeros años.
- a Nico por su generosidad, paciencia y sus invaluable aportes para el análisis de las imágenes de fluorescencia.
- a mi familia y amigas por el apoyo de siempre.
- a mi “hermanito” Felipe que siempre me alienta.
- a toda la gente de los sectores del IMBICE (bioterio, cultivos, esterilización, microscopía, mantenimiento) por su colaboración y la buena predisposición para que pueda realizar los experimentos.
- al IMBICE por brindarme un lugar para llevar a cabo esta tesis y a todos sus integrantes por el buen clima laboral.
- a CONICET por otorgarme la beca para la realización de esta tesis.
- a la Facultad de Ciencias Exactas (UNLP) por brindarme la formación de grado y la oportunidad de especializarme en investigación.

ÍNDICE

| | |
|---|----|
| AGRADECIMIENTOS | 2 |
| ÍNDICE..... | 3 |
| ABREVIATURAS..... | 6 |
| INTRODUCCIÓN | 8 |
| 1. Importancia del estudio del tejido adiposo | 9 |
| 1.2 Tejido adiposo blanco | 9 |
| 1.3 Tejido adiposo pardo | 10 |
| 1.4 Composición celular del TA | 11 |
| 1.5 Adipogénesis | 11 |
| 2. <i>Browning</i> | 13 |
| 2.1 Adipocitos <i>beige</i> | 14 |
| 2.2 Origen durante el <i>browning</i> | 15 |
| 2.2.1 Adipogenesis <i>de novo</i> | 15 |
| 2.2.2 Transdiferenciación..... | 16 |
| 2.2.3 Modelo unificado..... | 17 |
| 2.4 Otros mecanismos termogénicos..... | 18 |
| 3. Control transcripcional del programa termogénico en adipocitos pardos y <i>beige</i> | 18 |
| 3.1 Ebf2 | 19 |
| 3.2 Prdm16 | 19 |
| 3.3 Pgc1a | 20 |
| 4. Ciclo celular | 21 |
| 4.1 Proteínas reguladoras..... | 21 |
| 4.1.1 CDKs y ciclinas | 21 |
| 4.1.1 Inhibidores de CDKs y ciclinas | 22 |
| 4.2 CDK4 y CDK6 en el ciclo celular..... | 22 |
| 4.3 CDK4 y CDK6 en el metabolismo y el tejido adiposo | 23 |
| HIPÓTESIS Y OBJETIVOS | 26 |
| Hipótesis..... | 27 |
| Objetivo general..... | 27 |
| Objetivos específicos | 27 |
| MATERIALES Y MÉTODOS | 28 |
| 1. Animales experimentales..... | 29 |
| 2. Aislamiento de la FEV y de los adipocitos del TA | 29 |
| 2.1 FEV..... | 29 |
| 2.2 Adipocitos | 30 |
| 3. Cultivos primarios | 30 |

| | |
|---|----|
| 3.1 Cultivo de FEV y diferenciación adipocitaria <i>in vitro</i> | 30 |
| 3.2 Incubado de adipocitos | 30 |
| 4. Diseños experimentales..... | 31 |
| 5. Toma de imágenes microscópicas de cultivos de FEV y adipocitos diferenciados | 32 |
| 6. Determinación del contenido de ADN total..... | 33 |
| 7. Determinación del contenido mitocondrial relativo | 33 |
| 8. Determinación del contenido lipídico intracelular por Oil Red O | 33 |
| 9. Análisis de la expresión génica..... | 34 |
| 9.1 Aislamiento de ARN total | 34 |
| 9.2 Transcripción reversa del ARN total a ADN complementario | 35 |
| 9.3 Análisis de expresión de ARNm por PCR cuantitativa (qPCR)..... | 35 |
| 10. Análisis de la expresión proteica | 36 |
| 10.1 Inmunofluorescencia | 36 |
| 10.2 Inmunohistoquímica | 37 |
| 10.3 Western blot..... | 37 |
| 11. Citometría de flujo | 38 |
| 12. Determinaciones plasmáticas..... | 39 |
| 13. Análisis estadísticos | 39 |
| RESULTADOS..... | 41 |
| CAPÍTULO I: Efecto de la inhibición <i>in vitro</i> de CDK4/6 en la FEV de TAB sobre la adipogénesis <i>beige</i> | 42 |
| 1. Efecto de la inhibición de CDK4/6 en la FEV sobre su capacidad de proliferación <i>in vitro</i> | 42 |
| 2. Efecto de la inhibición de CDK4/6 en la FEV sobre su determinación hacia el linaje adipocitario <i>beige</i> | 44 |
| 3. Efecto de la inhibición de CDK4/6 en la FEV sobre la adipogénesis temprana | 45 |
| 4. Efecto de la inhibición de CDK4/6 en la FEV sobre su capacidad de diferenciarse a adipocitos <i>beige</i> | 46 |
| 4.1 Efecto en la termogénesis basal | 46 |
| 4.2 Efecto en el contenido mitocondrial | 48 |
| 4.3 Efecto en la termogénesis estimulada..... | 49 |
| 5. Efecto de la inhibición de CDK4/6 en parámetros de diferenciación tardíos..... | 51 |
| CAPÍTULO II: Efecto de la inhibición <i>in vitro</i> de CDK4/6 en adipocitos sobre su capacidad termogénica..... | 53 |
| 1. Efecto de la inhibición de la actividad de CDK4/6 sobre el programa termogénicos de adipocitos diferenciados <i>in vitro</i> | 53 |
| 1.1 Efecto en la expresión a nivel del ARNm | 53 |
| 1.2 Efecto sobre la expresión proteica basal de Ucp1..... | 53 |
| 1.2 Efecto de la inhibición de CDK4/6 sobre el contenido mitocondrial | 56 |
| 1.3 Efecto de la inhibición de CDK4/6 en la funcionalidad adipocitaria | 57 |

| | |
|---|----|
| 2. Efecto de la inhibición de CDK4/6 sobre el programa termogénico de adipocitos provenientes de tejido..... | 58 |
| CAPÍTULO III: Efecto de la inhibición <i>in vivo</i> de CDK4/6 sobre la termogénesis basal y el <i>browning</i> del TAB..... | 60 |
| 1. Efecto de la inhibición de CDK4/6 y de la estimulación del <i>browning in vivo</i> sobre indicadores del estado metabólico de los animales | 60 |
| 2. Efecto de la inhibición de CDK4/6 <i>in vivo</i> sobre la termogénesis basal y el <i>browning</i> del TAB | 62 |
| 2.1 Efecto de la inhibición de CDK4/6 en la fosforilación de RB en el TAB | 62 |
| 2.2 Efecto de la inhibición de CDK4/6 en la expresión de marcadores termogénicos a nivel del ARNm | 63 |
| 2.3 Efecto de la inhibición de CDK4/6 en la expresión proteica de UCP1 | 66 |
| 3. Efecto de la inhibición de CDK4/6 <i>in vivo</i> sobre la capacidad de la FEV del TAB de generar adipocitos <i>beige</i> | 68 |
| 3.1 Efecto de la inhibición de CDK4/6 y de la exposición al frío sobre el número de CPAs <i>beige</i> de la FEV | 68 |
| 3. 2 Efecto de la inhibición de CDK4/6 <i>in vivo</i> sobre la capacidad de la FEV de generar adipocitos <i>beige in vitro</i> | 71 |
| DISCUSIÓN | 75 |
| Efecto de la inhibición de CDK4/6 en la FEV sobre la proliferación..... | 76 |
| Rol de CDK4/6 en la generación de adipocitos <i>beige</i> por adipogénesis | 77 |
| Rol de CDK4/6 en la generación de adipocitos <i>beige</i> por transdiferenciación..... | 80 |
| Rol de CDK4/6 en la regulación del contenido mitocondrial | 82 |
| Efecto de la aclimatación al frío y la inhibición de CDK4/6 <i>in vivo</i> sobre el metabolismo y la homeostasis energética | 83 |
| Respuesta diferencial de los depósitos de TAB al <i>browning</i> inducido por frío..... | 85 |
| Rol de CDK4/6 en la regulación de la termogénesis basal y el <i>browning</i> de los depósitos de TAB | 87 |
| Interpretación del rol de CDK4/6 en la regulación de la termogénesis del TAB..... | 89 |
| Limitaciones del estudio..... | 91 |
| Perspectivas | 92 |
| CONCLUSIONES..... | 94 |
| BIBLIOGRAFÍA | 97 |

ABREVIATURAS

ACC: *acetyl Co-A carboxilase*

ADN: ácido desoxiribonucleico

AMPc: adenosin monofosfato cíclico

ANOVA: *analysis of variance*

aP2: *adipocyte P2* /FABP4: *fatty acid binding protein 4*

ARN: ácido ribonucleico

ARNm: ARN mensajero

C/EBP α : *CCAAT-enhancer binding protein alfa*

C/EBP β : *CCAAT-enhancer binding protein beta*

C/EBP δ : *CCAAT-enhancer binding protein delta*

CD137: *cluster of differentiation 137*

CDK4: *cyclin dependent kinase 4*

CDK6: *cyclin dependent kinase 6*

CDKs: *cyclin dependent kinases*

CM: células mesenquimales

Cox8b: *cytochrome c oxidase subunit 8B*

CPAs: células precursoras adipocitarias

d0: día 0 (inducción de la diferenciación de la FEV)

d-2: día -2 pre-diferenciación

d4: día 4 post-diferenciación

d6: día 6 post-diferenciación

d8: día 8 post-diferenciación

DMEM-F12: Dulbecco's Modified Eagle Medium-Ham's F-12

DMSO: dimetil sulfóxido

DTII: diabetes tipo II

EBF2: *early B-cell factor 2*

FASN: *fatty acid synthase*

FEV: fracción estroma vascular

FGF21: *fibroblast growth factor 21*

FL: Fotomultiplicador

FSC-H: *forward scatter height*

Glut-4: transportador de glucosa 4 (en adipocitos)

GPDH: *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*

HBSS: Hanks balanced saline solution
IFM: intensidad de fluorescencia media
IL-6: interleuquina 6
IMC: índice de masa corporal
IRS-2: *insulin receptor substrate 2*
Myf5: *myogenic factor 5*
Myh11: *Myosin-11*
PBS: *phosphate buffered saline*
PBST: *PBS Tween 20*
PCR: *polymerase chain reaction*
PDGFR α : *platelet derived growth factor receptor alfa*
PGC1 α : *PPAR γ coactivator 1 alfa*
PKA: *protein kinase A*
PPAR γ : *peroxisome proliferator-activated receptor gamma*
PRDM16: *PR domain containing 16*
qPCR: *quantitative PCR*
SFB: suero fetal bovino
SNS: sistema nervioso simpático
SSC-H: *side scatter height*
TA: tejido adiposo
TAB: tejido adiposo blanco
TAE: tejido adiposo epididimal
TAI: tejido adiposo inguinal
TAP: tejido adiposo pardo
TARP: tejido adiposo retroperitoneal
TBX1: *T-box 1*
TDZs: tiazolidinedionas
TMEM26: *Transmembrane protein 26*
UCP1: *uncoupling protein 1*

INTRODUCCIÓN

1. Importancia del estudio del tejido adiposo

La obesidad se define como una acumulación excesiva o anormal de tejido adiposo (TA) que puede ser perjudicial para la salud. Uno de los parámetros más utilizados para medir el grado de esta patología es el índice de masa corporal (IMC) que se define como el peso del individuo (Kg) dividido por el cuadrado de la altura (m^2). Se considera obesa una persona que presenta un IMC igual o mayor a 30. La obesidad constituye un factor de riesgo para el desarrollo de patologías crónicas tales como, resistencia a la insulina, diabetes tipo II (DTII), hígado graso, enfermedad cardiovascular, e incluso se la ha asociado con el desarrollo de distintos tipos de cánceres^{1,2}. En Argentina, la última encuesta nacional de factores de riesgo (ENFR, 2018) determinó que, según el autoreporte del peso y la talla, el 25,3% de la población es obesa, observándose un aumento significativo respecto a años anteriores, del 21,3% respecto al 2013, y del 73,3% respecto al año 2005. Sin embargo, la determinación objetiva de la talla y el peso para el cálculo del IMC mostró una incidencia aún mayor de esta enfermedad (32,4%)³. Estos datos muestran que, si bien hace algunos años la obesidad era considerada una problemática propia de países desarrollados, hoy en día también alcanza a países subdesarrollados y en desarrollo. Considerando la importancia del TA como regulador central de la homeostasis energética y su papel en el establecimiento de la obesidad, el conocimiento de su funcionamiento tanto en condiciones fisiológicas como patológicas resulta de fundamental importancia para el desarrollo de estrategias destinadas a prevenir o aliviar las complicaciones de esta enfermedad y sus patologías asociadas.

1.2 Tejido adiposo blanco

El tejido adiposo blanco (TAB) es un órgano presente en vertebrados cuyas principales funciones son las de reserva energética y endócrina, por lo cual tiene profundas implicancias en la fisiopatología y la homeostasis energética del organismo. En períodos de exceso energético, la energía excedente es almacenada en forma de triglicéridos en las células del TAB especializadas para tal fin: los adipocitos. Contrariamente, cuando los requerimientos energéticos no son suplidos por la ingesta, o durante el ayuno prolongado, el TAB libera la energía almacenada al torrente sanguíneo en forma de ácidos grasos para ser utilizados por otros órganos⁴. Al mismo tiempo, la especialización del TAB en secuestrar lípidos evita su almacenamiento en otras células y la consecuente lipotoxicidad en tejidos vulnerables, tales como el hígado y el músculo. Debido a que la lipotoxicidad se considera una de las causas de la disrupción de la acción de la insulina en las células, el almacenamiento de los ácidos grasos en el TAB contribuye al mantenimiento de la sensibilidad a la insulina en los demás tejidos^{5,6}. En relación a su función endócrina, los adipocitos blancos son capaces de sintetizar y secretar proteínas, llamadas adipoquinas, que poseen acciones sistémicas, paracrinas y autocrinas que regulan el metabolismo, la ingesta, y la inflamación entre otros procesos. Algunas de ellas son: leptina, adiponectina, resistina y citoquinas pro- y anti-inflamatorias, aunque la mayor proporción de las citoquinas es sintetizada por los macrófagos del TAB⁷⁻⁹.

Los depósitos de TAB, compuestos por adipocitos uniloculares, son los más abundantes en el organismo. De acuerdo a su localización, comúnmente se los divide en dos tipos: subcutáneos (debajo de la piel), y abdominales (dentro de la cavidad abdominal asociados a distintos órganos). En ratones los depósitos subcutáneos más significativos son el anterior, interescapular, y el posterior (tejido adiposo inguinal (TAI)). Dentro de los abdominales se encuentran el perigonadal, mesentérico, y retroperitoneal, entre otros⁴. Generalmente, en la mayoría de los estudios se utilizan los depósitos inguinal y perigonadal (tejido adiposo epididimal (TAE) en ratones machos) como representativos de cada tipo (Fig. 1). Se conoce que los depósitos abdominales presentan una mayor asociación con el desarrollo de enfermedades metabólicas, mientras que los subcutáneos tendrían una menor asociación, o incluso efectos benéficos^{10,11}. En este sentido, se han observado diferencias entre ellos en la tasa de lipólisis, la sensibilidad a la insulina, la tendencia a la inflamación, así como también en el patrón de secreción de adipoquinas¹¹⁻¹³.

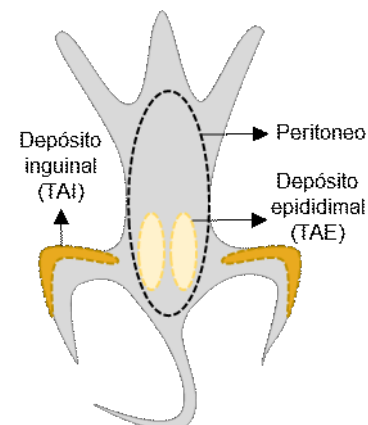


Figura 1: Localización anatómica en un ratón macho de los depósitos de TAB más usados como representativos de los depósitos abdominales (TAE) y subcutáneos (TAI). El color es indicativo de la susceptibilidad al *browning* de cada depósito.

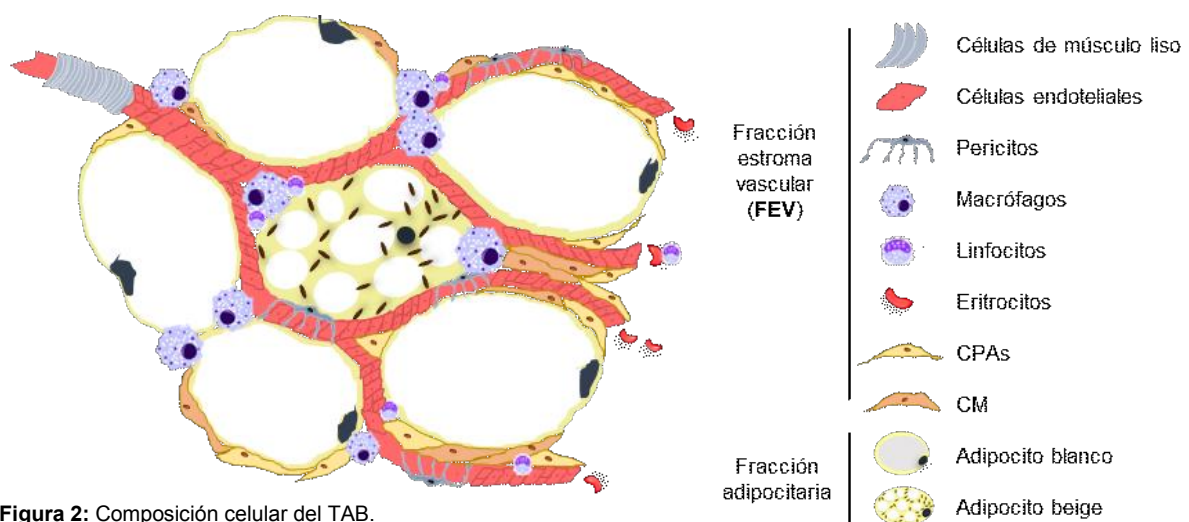
1.3 Tejido adiposo pardo

Adicionalmente, los mamíferos placentarios o euterios cuentan con depósitos de tejido adiposo pardo (TAP) especializado en la producción de calor para el mantenimiento de la temperatura corporal en condiciones de estrés térmico. El TAP, está compuesto por adipocitos multiloculares con abundante cantidad de mitocondrias que disipan la energía química en forma de calor gracias a la expresión de la proteína desacoplante UCP1. UCP1 es una proteína transmembrana situada en la membrana mitocondrial interna que cataliza el pasaje de H⁺ desde el espacio intermembrana hacia la matriz mitocondrial a favor de su gradiente electroquímico, desacoplando la oxidación de sustratos de la síntesis de ATP en un proceso llamado termogénesis¹⁴. En adipocitos pardos no estimulados se cree que UCP1 se encuentra inactiva, en parte, debido a la acción de nucleótidos de purina (ATP, GDP)^{15,16}. La exposición al frío desencadena la activación del sistema nervioso simpático (SNS) que en respuesta libera catecolaminas (noradrenalina, adrenalina), las cuales se unen a sus receptores adrenérgicos en los adipocitos y activan la vía intracelular del AMPc/PKA. Esto resulta en el aumento de la expresión de *Ucp1* y otros genes termogénicos (*Prdm16*, *Pgc1a*) y en la activación de la lipólisis. Los ácidos grasos producto de la lipólisis se unen y activan UCP1, y también son sustratos para la termogénesis¹⁵⁻¹⁸. Además, el TAP importa glucosa y ácidos grasos de circulación para mantener la termogénesis¹⁹. Los adipocitos pardos también secretan algunas adipoquinas (IL-6, FGF21) que, aunque no son específicas de éste depósito, sugieren una función endócrina de éstas células la cual está siendo ampliamente estudiada^{20,21}. En humanos, el TAP es prominente en infantes donde se localiza en

la región interescapular, no obstante, éste depósito disminuye con la edad²². En adultos subsisten algunos depósitos de TAP en pequeñas regiones en la zona supraclavicular, paravertebral, axilar y cervical²³. En cambio, roedores y pequeños animales adultos tienen mayor cantidad de TAP, probablemente para contrarrestar la pérdida de calor que implica una mayor relación superficie/volumen corporal.

1.4 Composición celular del TA

Además de adipocitos, el TA está formado por una población de células muy heterogénea que componen la denominada fracción estroma vascular (FEV). En la FEV coexisten células mesenquimales (CM), células precursoras adipocitarias (CPAs), pericitos, células endoteliales, células del músculo liso, eritrocitos y leucocitos (linfocitos, monocitos/macrófagos), entre otras^{24,25} (Fig. 2). La FEV se puede separar de los adipocitos por colagenización del TA y subsecuente centrifugación y utilizarse directamente para evaluar parámetros de las poblaciones celulares que la componen, o cultivarse *in vitro*. Cuando la FEV se siembra *in vitro*, las células del linaje hematopoyético, que no tienen capacidad de adherencia, se eliminan del cultivo con los subsecuentes cambios de medio y la placa se enriquece en células fibroblásticas. Aunque esta población es menos heterogénea que la FEV recién aislada, no es completamente homogénea ya que incluye a las CM, CPAs y otras no determinadas al linaje adipocitario con capacidad de adherencia⁴. Sin embargo, constituye un buen modelo para el estudio de precursores adipocitarios *in vitro* y de adipocitos diferenciados a partir de ellas, ya que se demostró que conservan muchas de las propiedades inherentes a cada depósito²⁶.



1.5 Adipogénesis

Los adipocitos en el TA son generados a partir de CM mediante el proceso de adipogénesis. En la adipogénesis se distinguen dos etapas principales que se dan de manera secuencial: la determinación, y la diferenciación terminal. Durante la determinación, las CM multipotentes se comprometen al linaje adipocitario y pierden la capacidad de diferenciarse *in vivo* a otros linajes

celulares de origen mesodérmico (miocitos, condrocitos, osteocitos), dando lugar a las células precursoras adipocitarias (CPAs). Luego, en la etapa de diferenciación terminal, las CPAs adquieren las características morfológicas y funcionales propias del adipocito maduro, tales como la capacidad de síntesis, almacenamiento y transporte de lípidos, la sensibilidad a la insulina y la capacidad de secreción de proteínas específicas del TA, entre otras^{27,28}. Durante el desarrollo embrionario y el periodo post-natal, la adipogénesis constituye el mecanismo de formación de los distintos depósitos de TA²⁹. Debido a que los adipocitos son células diferenciadas post-mitóticas (G0), en el organismo adulto, la adipogénesis en conjunto con la muerte celular por necrosis y/o apoptosis, es necesaria para el recambio normal del TA. La adipogénesis también se activa en situaciones de balance energético positivo, donde es responsable de la expansión de los depósitos de TAB por hiperplasia²⁹, y durante el *browning* de los depósitos de TAB, donde constituye uno de los mecanismos de generación de adipocitos *beige*²⁹⁻³¹. Adicionalmente, en el TAP la adipogénesis se induce durante la exposición prolongada al frío promoviendo su expansión hiperplásica²⁰.

La regulación molecular de la adipogénesis ha sido estudiada extensivamente en líneas celulares de preadipocitos (3T3-L1 y 3T3-F442A). Estudios en estas líneas sugirieron inicialmente que la adipogénesis estaba precedida por varias rondas de división celular de los precursores (expansión clonal mitótica), y que ésta era un requisito para una diferenciación normal^{32,33}. No obstante, este fenómeno no se ha demostrado en preadipocitos primarios ni en estudios *in vivo*, por lo que aún resulta controversial si es relevante en condiciones fisiológicas^{27,34,35}.

Como los preadipocitos son células ya determinadas al linaje adipocitario, la etapa de diferenciación terminal ha sido más caracterizada que la determinación. La cascada de factores de transcripción implicados en la etapa de diferenciación terminal consta de una primera fase en la cual se produce la activación de las proteínas de unión al CCAAT-*enhancer* (C/EBPs) β y δ como consecuencia del aumento en la concentración intracelular de AMPc³⁶. Éstas, están implicadas en el inicio de la segunda fase, en la que activan directamente la expresión de los factores de transcripción más importantes del proceso adipogénico: PPAR γ y C/EBP α ³⁷⁻⁴⁰. Una vez expresados, C/EBP α y PPAR γ funcionan transactivando la expresión de la mayoría de los genes característicos del fenotipo adipocitario⁴¹⁻⁴³ (ácido graso sintetasa (*Fasn*)), glicerofosfato deshidrogenasa (*Gpdh*), acetil-CoA carboxilasa (*Acc*), receptor de glucosa (*Glut-4*), receptor de insulina (IR), proteína que une ácidos grasos (*Fabp4/aP2*), entre otros. Además, C/EBP α y PPAR γ mantienen mutuamente su expresión a través de la activación cruzada⁴⁴, lo cual presumiblemente perpetúa el fenotipo adipocitario. Adicionalmente, C/EBP α posee auto-activación por unión a elementos de respuesta a C/EBPs en su propio promotor, por lo que también mantiene su propia expresión^{39,45} (Fig. 5A).

A pesar de la importancia de las CEBPs en la adipogénesis, ninguna de ellas es capaz de funcionar de manera independiente a PPAR γ , siendo éste el único factor de transcripción conocido hasta ahora necesario y suficiente para el proceso adipogénico. De acuerdo con esto, C/EBP β

no puede inducir la expresión de C/EBP α en ausencia de PPAR γ ⁴⁶, y la sobreexpresión de C/EBP α no puede rescatar la adipogénesis en fibroblastos *Pparg*^{-/-44}. Además, la sobreexpresión de PPAR γ en preadipocitos y fibroblastos no adipogénicos es suficiente para inducir la diferenciación adipocitaria^{47,48}. De manera interesante, la mayoría de los activadores o represores de la adipogénesis funcionan en parte promoviendo o inhibiendo la actividad y/o expresión de PPAR γ directa o indirectamente. PPAR γ no solo es un factor determinante en la adipogénesis, sino que también es importante en el mantenimiento del estado diferenciado. En este sentido, se observó que la transfección de adipocitos 3T3-L1 diferenciados con un vector lentiviral expresando una forma dominante negativa de PPAR γ induce su des-diferenciación con la consecuente disminución de la acumulación lipídica y disminución de la expresión de marcadores adipocitarios⁴⁹. De la misma forma, la inducción del *knock-out* de PPAR γ específicamente en adipocitos *in vivo* produce la muerte celular y la generación de nuevos adipocitos⁵⁰.

PPAR γ es un receptor nuclear del cual existen dos isoformas (PPAR γ 1 y 2) generadas a partir del mismo gen mediante el uso de distintos promotores y *splicing* alternativo^{47,51}. Ambas constan de un dominio de heterodimerización y unión al ligando, un dominio de unión al ADN, y un dominio de transactivación⁵². Aunque las dos isoformas se inducen durante el proceso adipogénico, PPAR γ 2 es la principal isoforma encontrada en los adipocitos⁵³, mientras que PPAR γ 1 también se expresa en otros tipos celulares (ej. macrófagos, epitelio del colon). PPAR γ se une a secuencias específicas de ADN (elementos de respuesta a PPAR γ), formando heterodímeros con los receptores X de retinoides (RXR) para transactivar la expresión de los genes específicos del adipocito^{54,55}. La actividad de PPAR γ puede ser promovida por la unión de ligandos. Dentro de los ligandos biológicos se han descrito a los ácidos grasos poliinsaturados y prostanoides, entre otros⁵⁶. No obstante, aún no se han encontrado ligandos endógenos específicos, ni de alta afinidad. Los ligandos sintéticos de PPAR γ con mayor afinidad conocidos hasta ahora son las tiazolidinedionas (TZDs) (ej. rosiglitazona, pioglitazona)^{57,58}. Las TZD son fármacos que han sido utilizados en el tratamiento de la DTII debido a su eficacia en la mejora de la sensibilidad a la insulina, la cual se cree que estaría mediada por la estimulación de la actividad de PPAR γ ⁵⁹⁻⁶¹. De acuerdo con esto, la deficiencia en PPAR γ se encuentra asociada al desarrollo de resistencia a la insulina^{62,63}, aunque los mecanismos moleculares implicados son desconocidos. Si bien en principio las TZD resultaron efectivas en el tratamiento de la DTII, posteriormente su uso se limitó debido a los efectos secundarios sobre otros tejidos que expresan PPAR γ ⁶⁴.

2. Browning

Además de los adipocitos termogénicos del TAP, en roedores se observó que la exposición al frío o la estimulación de las vías adrenérgicas inducen la aparición de *clusters* de adipocitos multiloculares UCP1+ en los depósitos de TAB⁶⁵. A esta remodelación de los depósitos blancos hacia un fenotipo termogénico en respuesta al estrés térmico se la llamó **browning** del TA. De

manera general, se ha observado que los depósitos subcutáneos, principalmente el inguinal, son más sensibles a la inducción del *browning* que los abdominales, lo cual podría explicar en parte su menor asociación con el desarrollo de enfermedades metabólicas^{66,67}. También se han observado variaciones en la respuesta al *browning* con la cepa de ratones utilizada, sugiriendo un componente genético en esta remodelación del TAB⁶⁸⁻⁷⁰. Además de los factores que promueven el *browning*, se han estudiado sus efectos fisiológicos. Como podía preverse debido a la activación de la termogénesis, numerosos estudios han demostrado que la remodelación del TAB en pos de un fenotipo más termogénico es capaz de contrarrestar el balance energético positivo en modelos de obesidad influyendo en el peso corporal. En este sentido, se ha observado que la promoción del *browning* en ratones obesos aumenta el gasto energético y genera resistencia al desarrollo de obesidad inducida por dietas con alto contenido en grasa⁷¹⁻⁷³. Además, se observó que las cepas de roedores con mayor respuesta al *browning* presentan mayor resistencia a la obesidad inducida por la dieta⁷⁴. De manera interesante, la activación del *browning* no solo influye en el peso corporal, sino que también mejora la tolerancia a la glucosa y la dislipidemia^{71,73}, dos de los parámetros alterados durante la obesidad que contribuyen al desarrollo de sus patologías asociadas, sugiriendo una posible contribución a la prevención y/o tratamiento de las mismas. Es importante mencionar que parte de los efectos benéficos del *browning* en el peso corporal y en el metabolismo podrían estar mediados por factores independientes de la activación de la termogénesis aún no determinados.

2.1 Adipocitos beige

Los adipocitos UCP1+ que surgen durante el *browning* del TAB se denominan adipocitos **beige** o **brite (brown-like in white)**^{75,76}. Inicialmente eran considerados meramente adipocitos pardos entremezclados con los blancos, no obstante, estudios posteriores demostraron que son distintos tanto de los pardos como de los blancos, por lo que actualmente se los considera un linaje adipocitario diferente. En primer lugar, la mayoría de la evidencia sugiere que los adipocitos pardos y los *beige* proceden de distintos precursores durante el desarrollo. Los pardos derivarían de un precursor en común con el músculo esquelético que expresa *Myf5*, mientras que la mayoría de los adipocitos *beige* no⁷⁷⁻⁷⁹. En cambio, para los adipocitos *beige* algunos estudios sugieren un origen en común con el músculo liso, ya que se encontró que poseen un perfil de expresión similar, y que parte de ellos se generan de células vasculares de músculo liso en la FEV del TA^{80,81}. En segundo lugar, los adipocitos *beige* poseen una regulación genética distinta de los pardos. Esto se evidencia en el hecho de que distintas cepas de ratones presentan variabilidad en el *browning* pero no en la inducción del TAP clásico^{68,69}. Incluso, existen diferencias a nivel epigenético en la regulación de la expresión de genes termogénicos entre estos dos tipos de adipocitos durante el *browning* y el *whitening* (adquisición de características fenotípicas de adipocitos blancos cuando los animales son transferidos de temperaturas inferiores a la de termoneutralidad hacia la termoneutralidad (30°C))⁸². Finalmente, los adipocitos *beige* expresan

selectivamente un conjunto de genes que se encuentran en bajos niveles tanto en los adipocitos pardos como en los blancos (*Tbx1*, *Cd137*, *Tmem26*)^{83,84}. De manera interesante, estos marcadores se encuentran enriquecidos en TAI (FEV y tejido completo) respecto a otros depósitos blancos menos sensibles al *browning*, y en la FEV de TAI las células con alta expresión de CD137 o TMEM26 se diferencian *in vitro* a adipocitos con mayor expresión de genes termogénicos que la población con baja expresión de esos marcadores⁸³.

En estado basal o de reposo los adipocitos *beige* son funcional y morfológicamente similares a los blancos ya que son uniloculares, tienen baja cantidad de mitocondrias y expresión de Ucp1. Consecuentemente, presentan una baja proporción de su respiración debida al desacople en comparación con los adipocitos pardos. Contrariamente, durante la estimulación del *browning* los adipocitos *beige* adquieren morfología multilocular y responden con una elevada inducción de Ucp1 y otros genes termogénicos (*Pgc1a*, *Prdm16*), así como también de la cantidad de mitocondrias, por lo que en estado estimulado serían similares a los pardos. *In vitro*, la capacidad termogénica de los adipocitos *beige* es comparable a la de los adipocitos pardos estimulados⁸³. No obstante, en ratones expuestos al frío se observó que la cantidad total de Ucp1 en el TAP es mucho mayor que la del TA inguinal, sugiriendo que el TAP sigue siendo el principal contribuyente a la termogénesis Ucp1-dependiente *in vivo*⁸⁵. Esta bifuncionalidad de los adipocitos *beige* en estado basal y ante la estimulación β -adrenérgica, implica que podrían actuar como células de reserva o de disipación energética según los requerimientos metabólicos del entorno, contribuyendo a la capacidad adaptativa del TA. Actualmente, mucha de la atención está centrada en el estudio de una posible función endócrina de los adipocitos *beige*, y en determinar su influencia en los efectos del *browning* sobre el metabolismo y la homeostasis energética.

2.2 Origen durante el *browning*

A partir de la observación de los efectos positivos de la estimulación del *browning* en modelos de obesidad, el interés en promover selectivamente la aparición y/o actividad de los adipocitos *beige* como posible terapia para el tratamiento de la obesidad y de sus patologías asociadas se incrementó considerablemente. Uno de los aspectos más estudiados es el origen de los adipocitos *beige* durante el *browning* del TA. Debido a que los adipocitos son células post-mitóticas (G0), en principio, dos mecanismos podrían explicar la biogénesis de los adipocitos *beige* durante el *browning*: la **adipogénesis de novo** a partir de un precursor indiferenciado residente en la FEV del TA, y la conversión/reprogramación de los adipocitos blancos preexistentes, también llamada **transdiferenciación** (Fig. 3).

2.2.1 Adipogenesis *de novo*

Múltiples estudios sustentan la adipogénesis *de novo* como mecanismo de generación de los adipocitos *beige*. Inicialmente se observó que la FEV de distintos depósitos de TAB contenía precursores que *in vitro* podían ser inducidos a diferenciarse a adipocitos con características

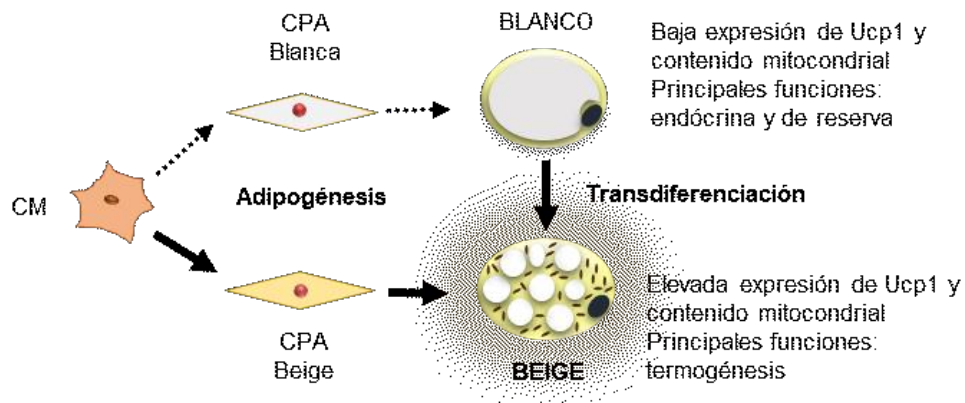


Figura 3: Esquema representativo de los posibles mecanismos de generación de adipocitos beige durante el *browning*: adipogénesis y transdiferenciación.

termogénicas^{75,86}. De manera interesante, al describir la existencia de los adipocitos *beige*, Wu et al. observaron que en la FEV de TAI existe una diversidad de precursores adipocitarios que dan lugar a adipocitos con distintas capacidades termogénicas al diferenciarse *in vitro* en las mismas condiciones⁸⁷. Incluso, un estudio posterior demostró que en la FEV de TAE, las células PDGFR α ⁺ se diferencian *in vivo* a adipocitos *beige* o blancos según la naturaleza del estímulo (estimulación β -adrenérgica o consumo de una dieta con alto contenido en grasa)³¹, sugiriendo la existencia de precursores bipotenciales. Utilizando esta concepción, más tarde Wang et al. observaron que los precursores *beige* pueden aislarse prospectivamente de la FEV de TAI mediante la expresión de PDGFR α y EBF2⁸⁴. De manera independiente, mediante el uso de un modelo genético (*AdipoChaser*) que permite marcar los adipocitos maduros previo a un estímulo, y seguir su destino en el tiempo después del mismo, Wang et al. encontraron que parte de los adipocitos UCP1+ que aparecen luego de un estímulo de *browning* no provienen de adipocitos preexistentes (con marca), sugiriendo su generación por adipogénesis *de novo*²⁹. En otro reporte los autores demostraron que al menos una parte de los adipocitos *beige* generados luego de la exposición al frío proviene de células localizadas en la vasculatura del TA que expresan marcadores de músculo liso (Myh11)⁸¹. Si bien no existe consenso en los marcadores utilizados para su identificación, el conjunto de estas evidencias indica claramente la presencia de precursores adipocitarios *beige* en la FEV del TAB, y que los adipocitos *beige* emergen de ellos ante un estímulo de *browning*.

2.2.2 Transdiferenciación

La hipótesis de la transdiferenciación adipocitaria inicialmente se fundó en las observaciones de algunos autores de que el *browning* no inducía la proliferación celular de los precursores adipocitarios, ni un aumento en el contenido de ADN total del tejido como indicador de la hiperplasia producto de la adipogénesis *de novo*^{65,88,89}. Implícitamente, esta idea asume que la proliferación de los precursores precede a la adipogénesis *in vivo*, lo cual aún no ha sido demostrado. No obstante, más tarde surgieron otros indicios independientes de esta asunción. Por ejemplo, un estudio observó en los depósitos de TAB la aparición de adipocitos con

morfología intermedia (pauciloculares) entre la de un blanco unilocular y un pardo multilocular durante la aclimatación al frío, los cuales postularon que podrían ser un estado de transición entre los adipocitos blancos y los *beige*, indicando una conversión directa⁸⁹. Sin embargo, las evidencias más fuertes en favor de la transdiferenciación provienen de modelos genéticos que permiten seguir el destino de los adipocitos marcados, y diferenciar los nuevos adipocitos que aparecen ante un estímulo, de los preexistentes. De esta manera, Lee et al. observaron que la mayoría de los adipocitos UCP1+ que aparecen ante el tratamiento con un agonista β 3-adrenérgico en TAI provienen de adipocitos blancos preexistentes⁹⁰. Siguiendo la marca de UCP1 en adipocitos, Rosenwald et al. mostraron que los adipocitos *beige* generados durante un primer estímulo de frío adquieren la morfología y patrón de expresión de un blanco cuando los animales retornan a temperatura ambiente. De manera interesante, la mitad de esos adipocitos se activan nuevamente ante una segunda exposición al frío⁹¹. Si bien los resultados de este trabajo no aclaran el origen de los adipocitos multiloculares que aparecen en la primera exposición al frío, demuestran la capacidad de los adipocitos UCP1+ de transformarse directamente de un fenotipo termogénico a uno de reserva y viceversa en respuesta a los cambios en el entorno. En relación a los mecanismos implicados en esta plasticidad de los adipocitos, se encontró que la disminución en la cantidad de mitocondrias en la transición “*beige*-blanco” requiere de la autofagia de estas organelas⁹². Asimismo, se han descrito varios factores necesarios para la transición directa entre estos dos fenotipos adipocitarios^{71,93}. El conjunto de estos hallazgos demuestra que los adipocitos *beige* también pueden originarse de adipocitos preexistentes, y exponen la plasticidad de los adipocitos para adaptarse a las demandas del medio.

2.2.3 Modelo unificado

Debido a la existencia de evidencias contundentes en favor de ambos mecanismos de generación de los adipocitos *beige*, recientemente Shao et al. indagaron sobre las posibles causas de estas discrepancias y propusieron un modelo unificado para explicar el origen de los adipocitos *beige*. En dicho estudio, los autores evidenciaron que el mecanismo de generación de los adipocitos *beige* depende de los antecedentes de estrés térmico de los animales y del tipo de estímulo adrenérgico. De manera interesante, observaron que en roedores criados en condiciones de termoneutralidad (30°C) ante la primera exposición a frío, la mayoría de los adipocitos *beige* emergen por adipogénesis *de novo*, y ante una segunda exposición lo hacen principalmente por transdiferenciación. De acuerdo con esto, en roedores criados a temperatura ambiente (22°C), lo cual representa un estrés térmico medio por ser menor a su temperatura de termoneutralidad (30°C), el porcentaje de adipogénesis *de novo* luego de la primera exposición al frío fue menor que el observado en los criados en termoneutralidad. Basándose en estos resultados, los autores propusieron que ante la primera exposición al frío los adipocitos *beige* emergen principalmente por adipogénesis *de novo*, y luego oscilan entre un estado inactivo

(uniloculares, baja expresión de UCP1) y activo (multiloculares, alta expresión de UCP1) por transdiferenciación o conversión directa dependiendo de la temperatura del entorno (Fig. 4).

En relación al estímulo adrenérgico, encontraron que el tratamiento farmacológico (agonista β 3-adrenérgico) induce la aparición de adipocitos *beige* preferentemente por transdiferenciación independientemente de la temperatura de crianza, lo cual podría ser consecuencia de que el receptor β 3 se expresa especialmente en los adipocitos y no en los precursores³⁰.

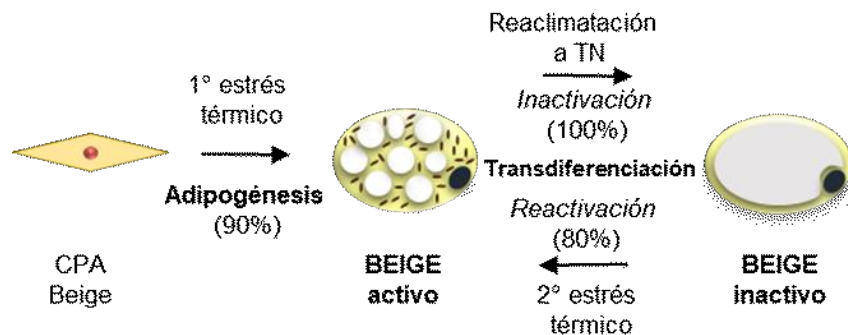


Figura 4: Modelo unificado de generación de adipocitos *beige*. Los porcentajes representan la proporción de adipocitos *beige* generados/activados/desactivados según corresponda por el respectivo mecanismo en animales criados a ternoneutralidad (TN).

2.4 Otros mecanismos termogénicos

Además de la termogénesis mediada por UCP1, en adipocitos *beige* de animales expuestos a frío se describió un mecanismo termogénico alternativo basado en un ciclo fútil del que participa la creatina. De acuerdo con esto, la expresión de genes del metabolismo de la creatina se incrementa ante la exposición al frío y se estimula de manera compensatoria en ratones deficientes en *Ucp1*. Además, en estos animales la reducción de la creatina provoca la disminución de la temperatura corporal⁹⁴. Más tarde, el mismo grupo observó que este ciclo es funcional no sólo en los adipocitos UCP1⁺ que se generan durante el *browning*, sino también en los UCP1⁻⁹⁵, indicando que no es específico de adipocitos *beige*. Aunque aún resta determinar su contribución relativa a la termogénesis, estos hallazgos demuestran que UCP1 no es el único mecanismo distinto al temblor utilizado para el mantenimiento de la temperatura corporal en condiciones de estrés térmico, y sugiere estrategias alternativas para promover el gasto energético de manera terapéutica⁹⁶.

3. Control transcripcional del programa termogénico en adipocitos pardos y *beige*

A pesar de las funciones contrapuestas de los adipocitos blancos como células de reserva, y de los pardos, como células disipadoras de energía en el organismo, e incluso de la bifuncionalidad descrita de los adipocitos *beige* en estado basal respecto al activado por un estímulo β -adrenérgico, los elementos centrales que regulan la adipogénesis descritos previamente son comunes a todos los tipos de adipocitos (Fig. 5A). Debido a su función central en la adipogénesis, PPAR γ resulta de particular interés. *In vivo* este factor es necesario para el normal desarrollo tanto de la grasa parda como blanca^{97,98}. De manera interesante estudios independientes demostraron que la mayoría de los sitios de unión de PPAR γ al ADN son comunes entre los

depósitos blancos y pardos, y que ésta propiedad se mantiene en los adipocitos primarios *in vitro*. No obstante, además de estos sitios comunes también se identificaron otros que son depósito-selectivos, es decir, que se encuentran presentes específicamente en un depósito y no en otro^{99,100}. Adicionalmente, ésta selectividad en los sitios de unión de PPAR γ en cada depósito coincide con el perfil de expresión específico del tejido, indicando que además de estar involucrado en la diferenciación adipocitaria general, participa de la determinación de la expresión génica propia de cada depósito⁹⁹. A partir de estos hallazgos surgió el interrogante de cuáles eran los factores implicados en la unión depósito-selectiva de PPAR γ a sus sitios en el ADN. Estudios posteriores demostraron que el perfil génico específico de cada linaje adipocitario es determinado principalmente por cofactores transcripcionales (activadores o represores) que no se unen directamente al ADN, pero establecen los sitios a los que se une PPAR γ , y por lo tanto, los genes que resultan activados. Dentro de los cofactores principales que determinan específicamente el programa termogénico característico de los adipocitos pardos y *beige*, que en última instancia promueven la expresión de Ucp1 se identificaron a Ebf2, Prdm16 y Pgc1a (Fig. 5A-C).

3.1 Ebf2

Ebf2 (*Early B cell factor 2*) es un factor transcripcional que dirige la unión selectiva de PPAR γ a sus sitios en el TAP, por lo que juega un papel importante en la determinación de este linaje. De acuerdo con esta función, se encontró que su expresión está enriquecida en el TAP respecto a los depósitos blancos, y que es necesaria para el establecimiento y mantenimiento de la expresión de genes termogénicos y mitocondriales en adipocitos primarios del TAP, y para el desarrollo de éste depósito *in vivo*¹⁰⁰. Ebf2 también tiene un rol determinante en el desarrollo del linaje adipocitario *beige*. En concordancia, se observó que es necesario para el *browning* de TAI, y que su sobreexpresión en adipocitos induce la reprogramación de este depósito hacia un fenotipo más termogénico, con la consecuente aparición de adipocitos multiloculares⁹³. En la FEV de TAI se encontró que EBF2 enriquece la población PDGFR α en células que se diferencian *in vitro* a adipocitos con elevada capacidad termogénica, por lo que actualmente se lo utiliza para el aislamiento prospectivo de precursores adipocitarios *beige*⁸⁴.

3.2 Prdm16

Prdm16 (*PR domain containing 16*) es otro de los factores de transcripción que juega un papel fundamental en la biogénesis de la grasa parda y *beige*. Actúa promoviendo la expresión selectiva de genes que componen el programa termogénico, e inhibiendo la expresión de genes característicos del linaje adipocitario blanco y linaje muscular. Estudios *in vivo* indican que Prdm16 es necesario para el normal desarrollo del TAP, y que sería uno de los factores involucrados en la determinación del linaje pardo sobre el muscular en los precursores mioblásticos que expresan Myf5⁷⁸. Sin embargo, la expresión de Prdm16 se produce tarde en el proceso de diferenciación, lo cual sugeriría que este factor se encuentra río abajo de la función

de Ebf2 como especificador de los linajes termogénicos durante el desarrollo¹⁰¹. Al igual que Ebf2, Prdm16 es necesario para la biogénesis de los adipocitos *beige* ya que su delección tejido adiposo-específica impide la generación de adipocitos *beige* ante un estímulo de *browning*¹⁰². Inversamente, la sobreexpresión de Prdm16 induce la aparición de adipocitos multiloculares con el consecuente aumento en el gasto energético y mejora de la sensibilidad a la insulina¹⁰³. En su función como factor de transcripción PRDM16 no se une al ADN directamente, sino que actúa conectando factores de transcripción (CEBP β , PPAR γ) y coactivadores (PGC1a), con la maquinaria general de transcripción en los *enhancers* de *Ucp1* y otros genes selectivos de los linajes adipocitarios termogénicos promoviendo su transcripción^{104,105}. De la misma manera, Prdm16 también recluta complejos multiproteicos represivos a los promotores selectivos de los linajes blanco y muscular para silenciar la transcripción de dichos genes^{106,107}.

3.3 Pgc1a

Pgc1a (*Peroxisome proliferator receptor y coactivator 1-alfa*) es un coactivador transcripcional involucrado en la respuesta termogénica de los adipocitos pardos y *beige* ante un estímulo β -adrenérgico agudo y en la biogénesis mitocondrial. A pesar de que su expresión está enriquecida en el TAP respecto a los depósitos blancos, su deficiencia en el TAP disminuye la acumulación lipídica pero no afecta la expresión de *Ucp1* ni de otros genes termogénicos, indicando que no es indispensable para el desarrollo ni para la identidad del TAP¹⁰⁸. Tampoco resulta necesario para la inducción de los genes termogénicos durante la diferenciación¹⁰⁹. En concordancia con un rol en la respuesta termogénica, se encontró que Pgc1a es requerido para la activación del *browning* en el TA ya que su delección en adipocitos impide la formación de adipocitos *beige*¹¹⁰, y también para la inducción de la termogénesis en adipocitos pardos *in vitro* ante un estímulo β -adrenérgico¹⁰⁹. De acuerdo con esto, Pgc1a se induce por la exposición al frío y es activado por fosforilación mediante la vía AMPc- PKA- p38/MAPK¹¹¹. Una vez activo, interacciona con PPAR γ y el receptor de tiroides (TR)¹¹² en el *enhancer* de *Ucp1* para inducir su expresión. De manera interesante, se observó que existiría selectividad en la activación génica dirigida por Pgc1a, ya que la sobreexpresión de Pgc1a en adipocitos blancos induce la expresión de *Ucp1*, pero no de *aP2*, otro de los genes cuya expresión es activada por PPAR γ . Respecto a su rol como promotor

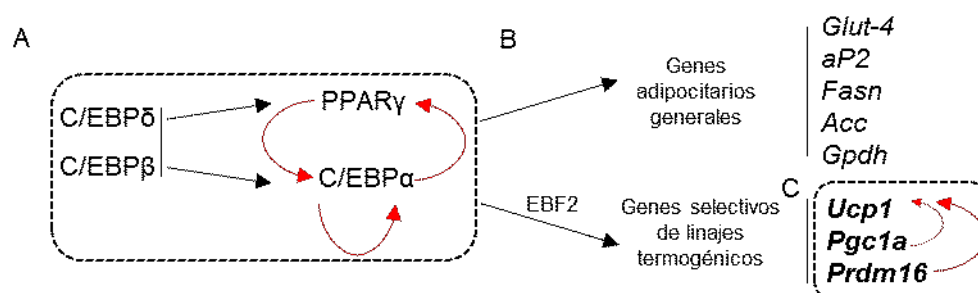


Figura 5: A. Secuencia de activación de los factores de transcripción más importantes de la etapa de diferenciación terminal de la adipogénesis. B. Genes adipocitarios generales y selectivos de los linajes termogénicos activados por PPAR γ . EBF2 determina los sitios selectivos a los que se une PPAR γ en los linajes termogénicos, por lo que se lo propone como un determinante temprano de estos linajes. C. Activación de la expresión de la expresión de *Ucp1* por Pgc1a y Prdm16.

de la biogénesis mitocondrial, Pgc1a interactúa con NFR1 y 2 (*Nuclear Respiratory Factor*) en el núcleo promoviendo su actividad como activador transcripcional de los genes mitocondriales nucleares (citocromo C, ATP sintasa subunidad β , factor de transcripción mitocondrial A (mt-TFA)). Seguidamente, mt-TFA se trasloca a la mitocondria y activa la replicación del ADN mitocondrial y la transcripción de los genes mitocondriales expresados desde el ADN mitocondrial^{113,114}.

4. Ciclo celular

El ciclo celular es una serie ordenada de eventos destinados a asegurar la correcta división celular que culmina con la generación de dos células hijas. En organismos pluricelulares es fundamental para el desarrollo y crecimiento del individuo, la reparación y el recambio tisular, la hiperplasia tisular, y también está involucrado en el establecimiento y la progresión de enfermedades tales como el cáncer. Los acontecimientos que ocurren durante el ciclo celular se agrupan en dos fases principales: la interfase, donde la célula crece en tamaño, y la fase M, donde se lleva a cabo la división celular. A su vez, la interfase comprende a las fases G1, S y G2 consecutivamente¹¹⁵. En la fase S ocurre la duplicación del material genético, uno de los acontecimientos más importantes del ciclo celular. La fase G1 y G2 son intervalos (*G, gaps*) en el ciclo de vida de una célula. En la fase G1 la célula se prepara para la síntesis de ADN, lo cual implica la síntesis de todas las proteínas necesarias para ello, mientras que en la fase G2, la célula se organiza para la división celular. El ciclo celular culmina con la fase M, la cual comprende a la mitosis (división nuclear) y la citocinesis (división del citoplasma), dando lugar así a dos células hijas^{116,117}. En tejidos adultos la mayoría de las células salen temporalmente del ciclo celular y permanecen arrestadas en G1 hasta recibir señales de proliferación. A esta etapa de quiescencia también se la conoce como G0. Otras células, sufren un proceso de diferenciación terminal y no pueden volver a ingresar en el ciclo celular (ej. neuronas y adipocitos) por lo que pierden capacidad de división¹¹⁸.

4.1 Proteínas reguladoras

El ciclo celular involucra a un conjunto de proteínas reguladoras que aseguran el correcto funcionamiento del mismo. Algunos de los procesos que se controlan son: que cada fase del ciclo celular se complete antes del comienzo de la posterior, que se lleven a cabo en el orden correcto y que el ADN se replique correctamente, lo cual incluye la reparación de daños durante la replicación^{117,119}. Estos reguladores responden a estímulos extra y/o intracelulares para promover o reprimir la progresión a través del ciclo celular. Las proteínas reguladoras más importantes incluyen a los complejos de ciclinas con quinasas dependiente de ciclinas (CDKs), y a sus inhibidores.

4.1.1 CDKs y ciclinas

Las CDKs son proteínas quinasas que fosforilan a otras proteínas promoviendo o inhibiendo su actividad. Las CDKs involucradas en la regulación del ciclo celular son CDK1, CDK2, CDK4 y

CDK6. No obstante, también existen CDKs que actúan como reguladoras de la transcripción génica basal (CDK7, CDK8 y CDK9)¹²⁰, y otras de las que aún se desconoce la función (CDK3, CDK5)^{117,118}. Las CDKs que regulan el ciclo celular son activadas por fosforilación a cargo de otras quinasas en sus residuos de serina y treonina, no obstante, solo son funcionales cuando se encuentran formando complejos con ciclinas. Generalmente, las CDKs forman complejos con un tipo específico de ciclina lo cual le otorga especificidad de sustrato, pero algunas CDKs en ciertas situaciones pueden unirse a distintas ciclinas^{118,121,122}. Las ciclinas son las proteínas reguladoras de las CDKs. Su nombre deriva del hecho de que tienen una expresión cíclica durante el ciclo celular, lo cual resulta en que ciertas CDKs sean activadas sólo en determinados momentos del mismo según la ciclina a la que se unan^{123,124}. De esta manera, una célula entra y sale de una fase del ciclo celular dependiendo de la ciclina que esté siendo expresada. Cuando una célula atraviesa por un cambio de fase, la ciclina de la fase previa es degradada y la ciclina de la fase siguiente aumenta su expresión¹²⁵.

4.1.1 Inhibidores de CDKs y ciclinas

La actividad de las ciclinas y CDKs es regulada por dos familias de inhibidores. La primera, está compuesta por los inhibidores INK4. Éstos son específicos de CDK4 y CDK6 y ejercen su función impidiendo la unión de las CDKs a las Ciclinas D, y uniéndose al dominio catalítico de CDK4 y CDK6 suprimiendo su actividad como quinasas. Esta familia incluye a las proteínas, p15INK4b, p16INK4a, p18INK4c, p19INK4d y a la proteína p19 ARF^{126,127}. La otra familia de inhibidores es la de las proteínas CIP/KIP, las cuales tienen un amplio rango inhibitorio impidiendo la actividad de CDKs de fase G1/S y S (p21Cip1, p27Kip1, p57Kip2)¹²⁸. A pesar de su función como inhibidores, existen reportes que indican que estas proteínas son importantes para el ensamblaje de los complejos entre las Ciclinas D y CDK4/6¹²⁹.

4.2 CDK4 y CDK6 en el ciclo celular

CDK4 y CDK6 son proteínas estructuralmente relacionadas que actúan en la transición de la fase G1 a la S del ciclo celular asociadas a ciclinas del tipo D (D1, D2, D3)^{130,131}. La transición de la fase G1 a la S se produce cuando la célula recibe señales mitóticas que indican disponibilidad de nutrientes para la división celular, tales como elevada concentración extracelular de glucosa, insulina u otros factores de crecimiento¹³². A diferencia de otras CDKs, los complejos Ciclina D-CDK4/6 no se ensamblan espontáneamente, sino que están sujetos a regulación por fosforilación de las CDKs, y por la acción de inhibidores (INK4, CIP/KIP) como se detalló anteriormente¹³³⁻¹³⁵. Una vez ensamblados, CDK4/6 fosforilan a las proteínas del retinoblastoma (RB1(RB), RBL1 (p107), RBL2 (p130)) en múltiples sitios^{136,137}. Las proteínas del retinoblastoma no tienen actividad catalítica, pero actúan como represores de la proliferación celular formando complejos multiproteicos represivos con los factores E2Fs impidiendo su función. Los factores E2Fs regulan la expresión de genes necesarios para la transición hacia la fase S (ciclina E, ciclina A, síntesis de dNTPs). Cuando las proteínas del retinoblastoma son fosforiladas por CDK4/6 adquieren un

estado hiperfosforilado que induce el desensamble de los complejos represivos, permitiendo el accionar de los factores E2Fs como activadores de los genes necesarios para la transición G1/S¹³⁸. Esta secuencia de activación de las proteínas ciclina D-CDK4/6- RB/p107/p130- E2Fs constituye la vía por la cual CDK4/6 regulan la progresión a través del ciclo celular. Este eje es crucial para el inicio de la proliferación celular, y consecuentemente, es uno de los más desregulados en una gran cantidad de cánceres¹³⁹⁻¹⁴¹. Algunas de las formas de saltar la regulación de esta vía más comúnmente observada en los tumores son la pérdida de RB o del inhibidor p16^{126,142}, y la promoción de la actividad de la ciclina D1 o de las propias CDK4/6¹⁴³⁻¹⁴⁵. Es por ello, que se han diseñado inhibidores específicos de estas quinasas para ser utilizados como agentes en el tratamiento del cáncer. Actualmente existen 3 inhibidores de CDK4/6 aprobados para su uso clínico: palbociclib (PD-0332991), abemaciclib (LY-283529) y ribociclib (LEE011)¹⁴⁶⁻¹⁴⁹. Éstos se utilizan solos, o combinados con terapias hormonales o con inhibidores de otras vías intracelulares para el tratamiento de tumores sensibles¹¹⁸. Por ejemplo, palbociclib se utiliza comúnmente con inhibidores de la aromatasa o antagonistas del receptor de estrógenos para el tratamiento de cánceres de mama positivos para el receptor de estrógeno (ER+)¹⁵⁰⁻¹⁵².

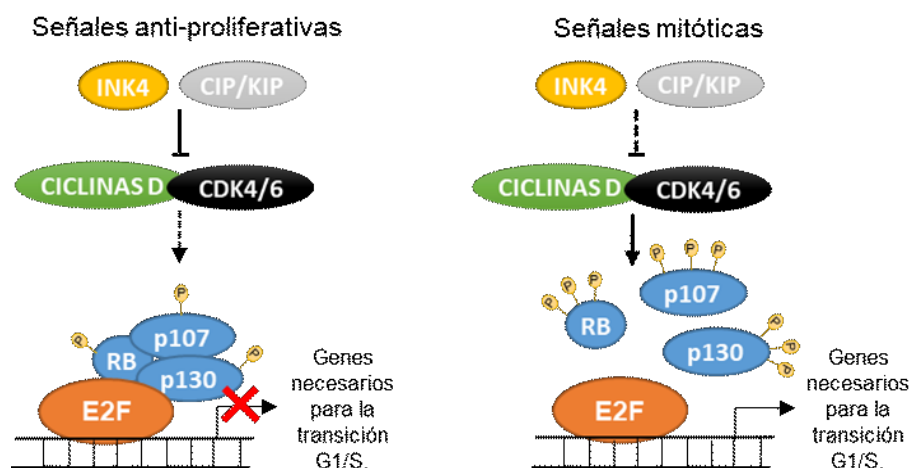


Figura 6: Regulación de la entrada en el ciclo celular (fase G1/S) por CDK4/6. La llegada de señales mitóticas activa la vía de CDK4/6 induciendo la entrada en el ciclo celular, mientras que las señales anti-proliferativas promueven la actividad de los inhibidores INK4 o CIP/KIP provocando el arresto del ciclo celular.

4.3 CDK4 y CDK6 en el metabolismo y el tejido adiposo

En los últimos años se demostró que las proteínas que participan en la progresión y control del ciclo celular, también desempeñan funciones en el metabolismo energético¹⁵³⁻¹⁵⁵. En este sentido, se postula que podrían cumplir un rol fundamental en la integración de las señales extracelulares modificando simultáneamente la proliferación y el metabolismo. En favor de esta hipótesis, se ha observado que una de las características distintivas de las células cancerígenas es la reprogramación del metabolismo, favoreciéndose la glicólisis sobre la fosforilación oxidativa mitocondrial incluso en condiciones de normoxia (*efecto Warburg*)¹⁵⁶⁻¹⁶⁰. A pesar de ser un mecanismo energéticamente desfavorable, se cree que la ventaja de la vía glicolítica reside en

proveer intermediarios metabólicos para la síntesis de biomoléculas necesarias en la división celular^{161,162}. De acuerdo con esta nueva función de las proteínas reguladoras del ciclo celular en el metabolismo, se observó que el fenotipo más común de los *knock-outs* para estas proteínas son alteraciones o enfermedades metabólicas. De nuestro interés fue el hecho que muchas de estas alteraciones están relacionadas con el funcionamiento del tejido adiposo^{153,155,163}. Por ejemplo, se observó que la Ciclina D3, CDK4 y E2F1¹⁶⁴⁻¹⁶⁶ son reguladores positivos de la adipogénesis que actúan promoviendo la actividad o expresión de PPAR γ , mientras que la Ciclina D1 y E2F4 actúan como reguladores negativos^{166,167}. De acuerdo con esto, los animales deficientes en E2F1 (*E2f1*^{-/-}) o Ciclina D3 (*Ccnd3*^{-/-}) son resistentes al aumento de peso inducido por una dieta hipercalórica, y presentan mayor sensibilidad a la insulina^{168,169}. En lo que respecta a las proteínas del retinoblastoma, y los inhibidores de ciclinas y CDKs, los efectos descritos en la adipogénesis y el TA son encontrados¹⁵³. Por otra parte, se observó que la ablación tejido adiposo-específica de RB promueve el *browning* del TA, y los animales desarrollan resistencia a la obesidad¹⁷⁰.

CDK4 ha sido una de las proteínas reguladoras más estudiadas en relación a la funcionalidad del TA. Inicialmente, estudios *in vitro* en la línea de preadipocitos 3T3-L1 demostraron que CDK4 es un regulador positivo del proceso adipogénico que actúa promoviendo la actividad de PPAR γ . En un sistema de expresión heterólogo se observó que CDK4 interacciona directamente con PPAR γ en el promotor de *aP2*, aunque no es capaz de fosforilar directamente a PPAR γ ¹⁶⁵. Unos años más tarde, el mismo grupo reportó que en adipocitos de TAE CDK4 es importante en la sensibilidad a la insulina ya que mantiene activa su cascada de señalización intracelular por fosforilación directa de IRS-2. De acuerdo con esto, se observó que la actividad de CDK4 promueve los efectos inducidos por la insulina en adipocitos y reprime los efectos opuestos¹⁷¹. Las funciones descritas para CDK4 en el TA también se ven reflejadas en el fenotipo de los modelos genéticos generados para su estudio. Los animales *CDK4*^{nc}, que son deficientes en CDK4 en todos los tejidos menos en el páncreas, presentan menor masa de TA y tamaño adipocitario producto de una lipogénesis reprimida y lipólisis aumentada, que se acompañan de una menor tolerancia a la glucosa y sensibilidad a la insulina. Contrariamente, los animales *CDK4*^{R24C/R24C}, que expresan una versión mutante de CDK4 que no puede ser inhibida por los inhibidores INK4, tienen mayor masa de TA y tamaño adipocitario producto de una lipogénesis estimulada y lipólisis reprimida. Además, presentan mayor tolerancia a la glucosa y sensibilidad a la insulina¹⁷¹. También se han descrito funciones¹⁷¹ de CDK4 en el metabolismo en otros tipos celulares y tejidos. Por ejemplo, en miocitos y fibroblastos CDK4 regula el metabolismo de ácidos grasos y la glicólisis, y en hígado fosforila a GC5N suprimiendo la producción de glucosa¹⁷²⁻¹⁷⁴. La función de CDK6 en el metabolismo y el TA ha sido mucho menos explorada respecto a otros reguladores del ciclo celular. En este sentido, existen sólo algunos reportes *in vitro* que muestran que CDK6 es importante en la proliferación de las CPAs y en la diferenciación a los linajes adipocitario y óseo^{175,176}. Además, un estudio sobre la función de la ciclina D3 en la adipogénesis,

mostró que el complejo ciclina D3-CDK6 fosforila *in vitro* a PPAR γ y que se encuentra en el promotor de genes activados por PPAR γ al igual que lo hace CDK4¹⁶⁴. Como puede observarse a partir de estas evidencias, debido a su actividad quinasa, tanto CDK4 como CDK6 también pueden actuar de manera independiente a la vía canónica descrita para el ciclo celular mediante la fosforilación directa de proteínas clave en los procesos regulados.

Aunque se han descrito diversas funciones de CDK4 y unas pocas para CDK6 en la funcionalidad del TA, aún no se ha estudiado su rol en el *browning*. Varias de las características de estas CDKs sugieren que podrían estar implicadas en la regulación de este proceso:

- Son reguladores positivos de la adipogénesis, posiblemente a través de PPAR γ , un factor de transcripción común a todos los linajes adipocitarios.
- Se expresan y llevan a cabo funciones tanto en CPAs como en adipocitos maduros, por lo tanto, podrían regular el *browning* a través de la modulación de los dos mecanismos propuestos para la generación de adipocitos *beige*: la adipogénesis *de novo* a partir de las CPAs, y/o la transdiferenciación a partir de los adipocitos blancos preexistentes.
- Son nodos de integración de múltiples vías de señalización y pueden modular la respuesta proliferativa y metabólica de una célula ante estímulos externos; dos procesos fundamentales a considerar por las CM multipotentes de la FEV del TA antes de determinarse y formar las distintas poblaciones de CPAs, que en último término originaran los distintos linajes adipocitarios.
- Algunas de las proteínas del retinoblastoma que son targets de CDK4/6 en la regulación de la proliferación celular han sido involucradas en la modulación del *browning*.

Por todo lo expuesto previamente creemos que CDK4 y CDK6 podrían cumplir un papel clave en la modulación del *browning* en el TA.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Hipótesis

Nuestra hipótesis de trabajo sostiene que **“las quinasas dependientes de ciclina 4 y 6 modulan el proceso de *browning* del TAB mediante la regulación de la generación de adipocitos *beige* por adipogénesis de novo y/o por transdiferenciación”**.

Objetivo general

Para contrastar nuestra hipótesis nos planteamos el siguiente objetivo general:

Evaluar el rol de CDK4 y CDK6 en el origen de los adipocitos *beige* y su impacto en el *browning* del TAB.

Objetivos específicos

1.
 - a. Estudiar el efecto de la inhibición *in vitro* de la actividad de CDK4/6 **en la FEV** de TAE y TAI sobre la expresión de marcadores selectivos del linaje adipocitario *beige*, y su impacto sobre la capacidad de la FEV de diferenciarse a adipocitos *beige*.
 - b. Estudiar el efecto de la inhibición *in vitro* de la actividad de CDK4/6 **en la FEV** de TAE y TAI sobre la expresión de factores transcripcionales de la adipogénesis comunes a los linajes adipocitarios *beige* y blanco.
2.
 - a. Evaluar el efecto de la inhibición *in vitro* de la actividad de CDK4/6 **en adipocitos** de TAE y TAI sobre el mantenimiento de las características propias del linaje adipocitario *beige*.
 - b. Estudiar el efecto de la inhibición *in vitro* de la actividad de CDK4/6 **en adipocitos** de TAE y TAI sobre la funcionalidad adipocitaria.
3.
 - a. Investigar el efecto de la inhibición de la actividad de CDK4/6 *in vivo* sobre la termogénesis UCP1- dependiente basal (temperatura ambiente) y sobre el *browning* (frío) en TAE y TAI.
 - b. Estudiar el efecto de la inhibición *in vivo* de CDK4/6 a temperatura ambiente y en frío sobre el número de células precursoras adipocitarias *beige* en los depósitos de TAE y TAI.
 - c. Evaluar el efecto de la inhibición *in vivo* de CDK4/6 a temperatura ambiente sobre la capacidad de la FEV de los depósitos de TAE y TAI de diferenciarse *in vitro* a adipocitos *beige*.

Con esta tesis pretendemos contribuir a la comprensión de los factores que regulan la generación de adipocitos *beige* y aportar al conocimiento de las funciones de CDK4 y CDK6 en la funcionalidad del TAB.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Animales experimentales

En todos los protocolos experimentales se utilizaron ratones macho adultos salvajes de la cepa C57BL/6J de entre 4 y 6 meses de edad criados en el bioterio del IMBICE. Los animales se mantuvieron en jaulas grupales en cuartos con ciclos de luz/oscuridad diarios de 12 h de luz y 12 h de oscuridad, con temperatura controlada ($20\pm 2^{\circ}\text{C}$) y alimentación (dieta estándar para roedores) y bebida *ad libitum*. Todos los protocolos que implicaron el uso de animales fueron aprobados por el Comité Institucional (CICUAL) del IMBICE, y fueron llevados a cabo de acuerdo a la Guía del NIH para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio¹⁷⁷.

Para los experimentos *in vitro* del capítulo I y II se usaron animales controles. Los mismos se mantuvieron en jaulas grupales desde el destete hasta el momento del sacrificio. Para los protocolos *in vivo*, animales de aproximadamente la misma edad y de la misma o diferentes camadas se agruparon de acuerdo al peso, de manera de comenzar los experimentos sin diferencias en el peso corporal medio entre los distintos grupos. El agrupamiento se llevó a cabo una semana antes del comienzo de los protocolos para evitar que el estrés debido al acostumbamiento a los nuevos compañeros de jaula y a la manipulación por el operador influya en los resultados experimentales.

2. Aislamiento de la FEV y de los adipocitos del TA

2.1 FEV

Para el aislamiento de la FEV, los depósitos de TA se disecaron en forma aséptica de los animales, se recibieron en solución salina balanceada de Hanks (HBSS) estéril y se enjuagaron dos veces por centrifugación (1000rpm x 10min) y descarte del infranadante. Luego, se limpiaron con tijera de posibles restos de otros tejidos, se cortaron en trozos pequeños y se digirieron enzimáticamente en una solución de colagenasa tipo I (0,8 mg/mL en DMEM-F12 a 37°C) con una relación 3:1 de solución:tejido. Se dio fin a la digestión cuando no se observaron restos de tejido en suspensión (25-60min según el depósito). Al homogenato resultante se le agregó HBSS y se centrifugó (1000rpm x 15min) para separar la FEV de los adipocitos. Luego de la centrifugación, se descartaron los adipocitos del sobrenadante, se resuspendió el pellet en el líquido restante, y se filtró con filtro de tela de nylon estéril ($50\mu\text{M}$) para retirar los restos de tejido no colagenizado. El filtrado se centrifugó nuevamente (1000rpm x 10min), se retiró el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 2mL de DMEM-F12 suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB). Finalmente, se realizó el recuento de CPAs viables con Azul de Tripán. Para ello, se mezclaron $10\mu\text{L}$ de la suspensión celular de la FEV aislada del TA con el mismo volumen de solución de Azul de Tripán 0,4% en solución salina. La mezcla se homogeneizó, se tomaron $10\mu\text{L}$ de la misma y se cargaron en la cámara de Neubauer. Luego, se contaron las células viables (no teñidas de azul) contenidas en los cuadrados de 1mm de lado de la cámara, y se calculó el número total de células en la suspensión inicial según la siguiente ecuación:

$$\text{Número total de CPAs} = x \times 10000 \times 2 \times v$$

Donde,

x: número promedio de células precursoras adipocitarias en los 4 cuadrantes de 1 mm de lado.

10000: factor para transformar el volumen de los cuadrados de 0,1 mm³ (1 mm de lado y 0,1 mm de profundidad) a mL.

2: factor de dilución de la suspensión celular en Azul Tripán.

v: volumen total de la suspensión celular.

2.2 Adipocitos

Los adipocitos de TA se aislaron mediante el mismo procedimiento por el cual se obtuvo la FEV, pero usando menores velocidades de centrifugación para evitar la lisis. Para el aislamiento se utilizó la capacidad de flotación de los adipocitos en soluciones acuosas. Luego de la colagenización del tejido, el homogenato se centrifugó (300rpm x 5min) 3 veces descartando el infranadante en cada una de ellas. Luego, los adipocitos se resuspendieron en HBSS y se filtraron con filtro de tela de nylon estéril para eliminar los restos de tejido no colagenizado. A continuación, la solución se centrifugó (300rpm x 3min), se retiró completamente el infranadante y se midió el volumen de adipocitos obtenido para proceder a la siembra.

3. Cultivos primarios

3.1 Cultivo de FEV y diferenciación adipocitaria *in vitro*

Luego del recuento de CPAs viables, las FEVs se sembraron a razón de 80.000 células por pozo en placa multi-well de 12 en medio basal (DMEM-F12, 10% SFB, penicilina (100UI/mL) y gentamicina (100µg/mL)). Las células se mantuvieron en medio basal hasta confluencia (día 0 (d0)), momento en el que se indujo la diferenciación adipocitaria con una mezcla proadipogénica conteniendo: 3-isobutil-1-metilxantina [IBMX] (0,5mM), dexametasona (5µM), rosiglitazona (1 µM), insulina (0,5µg/mL) y triiodotironina [T3] (1nM) en medio basal. Al día 4 post-diferenciación (d4) la mezcla de diferenciación se cambió por una mezcla de mantenimiento conteniendo sólo T3 (1nM) e insulina (5µg/mL) en medio basal⁷⁵. Las células permanecieron en medio de mantenimiento hasta el día 8 post-diferenciación (d8), o hasta el día indicado en cada protocolo en particular. Durante todo el período de cultivo el medio se renovó cada 48 h.

3.2 Incubado de adipocitos

Los adipocitos obtenidos del tejido se resuspendieron en DMEM-F12 suplementado con 1% SFB (medio basal de adipocitos) a razón de 1 parte de adipocitos en 3 partes de medio. Esta suspensión se sembró (200µL conteniendo 200.000 células aproximadamente/pozo) en placas multi-well de 24 pozos a los cuales se les agregó 700µL de medio basal de adipocitos. Luego, se llevó a volumen final de 1mL por el agregado de 100µL de medio basal conteniendo una concentración de inhibidor o vehículo 10 veces mayor a la final. Los adipocitos se incubaron en estufa a 37°C durante 24h. Pasado este tiempo, las placas se retiraron de la estufa, se pusieron inmediatamente en hielo y se retiró el infranadante de los pozos con jeringa de 1mL. Finalmente,

los adipocitos se almacenaron a -80°C para proceder a la extracción de proteínas y ARNm. Se utilizaron entre 5 y 8 pozos de adipocitos para cada muestra.

4. Diseños experimentales

Para evaluar el rol de CDK4/6 utilizamos palbociclib (PD-0332991), un inhibidor de la actividad de estas quinasas. En todos los experimentos que implicaron el uso de tejido adiposo se utilizaron los depósitos de TAE y TAI. Las muestras de plasma y las de tejido destinadas a la extracción de ARN y proteínas se conservaron en freezer a -80°C hasta su uso.

Capítulo I: Evaluación del efecto de la inhibición *in vitro* de CDK4/6 en células precursoras adipocitarias sobre la adipogénesis *beige*.

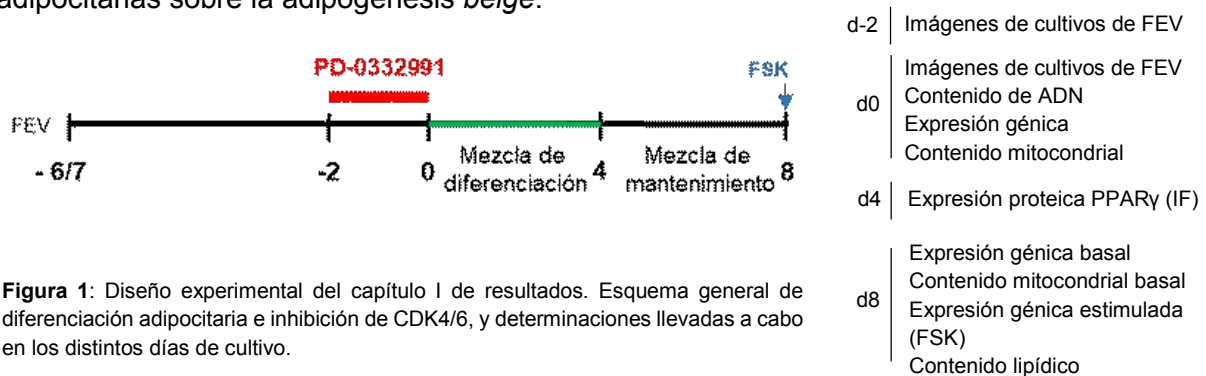


Figura 1: Diseño experimental del capítulo I de resultados. Esquema general de diferenciación adipocitaria e inhibición de CDK4/6, y determinaciones llevadas a cabo en los distintos días de cultivo.

Los cultivos de FEV de animales controles de TAE y TAI se trataron con vehículo (DMSO) o PD-0332991 ($1\mu\text{M}$)¹⁷⁸ durante 48h previo a la diferenciación, cuando el porcentaje de confluencia era de aproximadamente 75%. Finalizado el tratamiento, se retiró el inhibidor y las células se diferenciaron de acuerdo al procedimiento descrito previamente. A d8 los adipocitos se trataron durante 4h con vehículo (DMSO) o forskolina ($10\mu\text{M}$) para estimular la termogénesis¹⁰⁵.

Capítulo II: Evaluación del efecto de la inhibición de CDK4/6 en adipocitos *in vitro* sobre su programa termogénico y la funcionalidad adipocitaria.

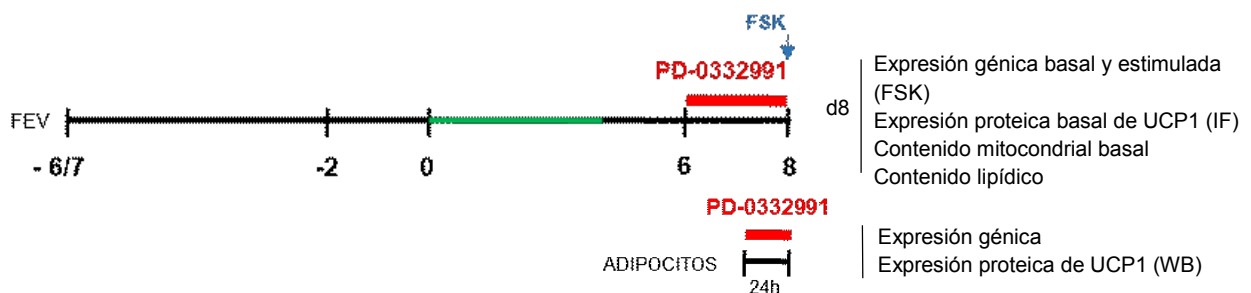


Figura 2: Diseño experimental del capítulo II de resultados. Esquema de diferenciación e inhibición de CDK4/6 en adipocitos diferenciados y determinaciones llevadas a cabo en los distintos días de cultivo. También se llevaron a cabo incubados de adipocitos provenientes de tejido.

Las FEVs de TAE y TAI se sembraron y diferenciaron al llegar a confluencia como se describió previamente. A día 6 post-diferenciación, los adipocitos se trataron con vehículo (DMSO) o PD-0332991 ($1\mu\text{M}$) durante 48h. A d8 se retiró el inhibidor y los adipocitos se trataron durante 4h con vehículo (DMSO) o forskolina ($10\mu\text{M}$) para estimular la termogénesis. Además, se incubaron adipocitos provenientes de tejido con vehículo (DMSO) o PD-0332991 ($1\mu\text{M}$) durante 24h.

Capítulo III: Evaluación del efecto de la inhibición de CDK4/6 *in vivo* sobre la termogénesis basal y el *browning* del tejido adiposo.

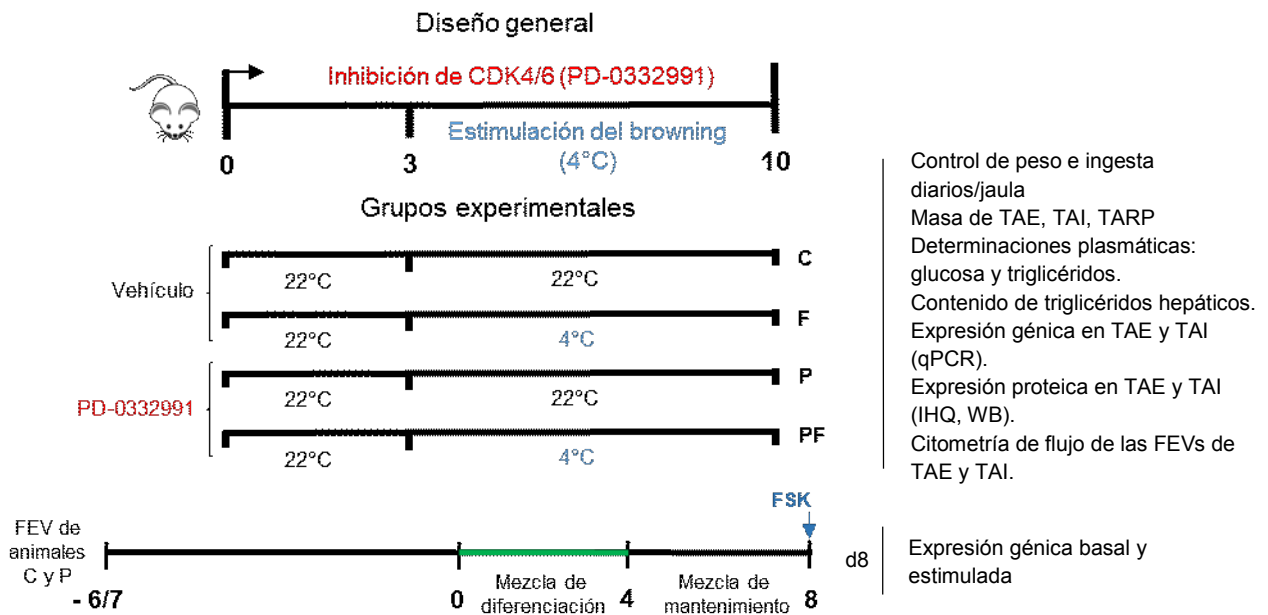


Figura 3: Diseño experimental del capítulo III de resultados. Esquema de inhibición de CDK4/6 y estimulación del *browning* *in vivo*. A la derecha se detallan las medidas y determinaciones llevadas a cabo. Además, se muestra el esquema de diferenciación de la FEV proveniente de animales C y P.

Para evaluar *in vivo* el efecto de la inhibición de la actividad de CDK4/6 sobre el *browning* del TA, a los animales se les administró el inhibidor de CDK4/6 y se estimuló el *browning* por exposición al frío. De esta manera se conformaron 4 grupos experimentales: Control (C), Palbociclib (P), Frío (F) y Palbociclib-Frío (PF). A los individuos de los grupos C y P se les administró diariamente vehículo o PD-0332991 (50mg/Kg)^{178,179} respectivamente durante 10 días a temperatura ambiente (22°C). A los individuos de los grupos en los que se estimuló el *browning*, F y PF, se les administró vehículo o PD-0332991 respectivamente durante 3 días a 22°C y seguidamente durante 7 días a 4°C para promover el *browning* del TA. PD-0332991 se administró por *gavage* oral disuelto en buffer de lactato de sodio (50mM, pH=4)¹⁷⁸.

En experimentos adicionales, se llevó a cabo el mismo protocolo con animales *in vivo*, pero solo con los grupos C y P. Finalizado el tratamiento, los depósitos de TAE y TAI se disecaron y procesaron en forma aséptica para el aislamiento de la FEV y su posterior diferenciación a adipocitos *in vitro*. A d8, un subgrupo de los adipocitos C y P se incubó con vehículo o forskolina (10µM) para estimular la termogénesis.

5. Toma de imágenes microscópicas de cultivos de FEV y adipocitos diferenciados

Para las imágenes microscópicas de los cultivos de FEV (d-2 y d0) y de adipocitos diferenciados (d8) se utilizó un microscopio invertido Nikon Eclipse Tis. Las imágenes se adquirieron con objetivos de 4X (campo claro) y 40X (contraste de fases) en las mismas condiciones ópticas y de iluminación en cada objetivo. Para los cultivos de FEV sin diferenciar, las imágenes a d-2 y

d0 se tomaron en el mismo lugar de la placa para observar el crecimiento del mismo campo de células.

6. Determinación del contenido de ADN total

Para evaluar la cantidad de ADN total la FEV se sembró en placas multiwell de 24 pozos. A d0, las células de los grupos C y P se juntaron con 600µL/pozo de buffer de lisis de ADN y se dejaron en agitación durante 3 días a temperatura ambiente. Luego se procedió a la extracción de ADN total como se detalla en el punto 7. Las muestras se resuspendieron en el mismo volumen final de buffer TE y el ADN se cuantificó en espectrofotómetro a 260nm.

7. Determinación del contenido mitocondrial relativo

Como medida de la cantidad de mitocondrias se determinó la abundancia relativa de ADN mitocondrial respecto a la de ADN nuclear. Para ello, se utilizó un gen mitocondrial (ARNt-Leu) y uno nuclear (β 2-microglobulina) localizados en regiones del ADN de las respectivas organelas con baja frecuencia de polimorfismos. En primer lugar, se procedió a la extracción del ADN total de células crecidas en placas de 12 pozos. Las células de cada pozo se lisaron con 600µL de buffer de lisis (40mM EDTA, 50mM NaCl, 100mM Tris, 0,2% SDS) diluido 2:1 en PBS, y se juntaron en un tubo de 1,5mL. Las muestras se dejaron en agitación durante 3 días a temperatura ambiente para favorecer la lisis celular. A continuación, se les agregó NaCl 5,4M (300µL) para lograr la precipitación de las proteínas, y se centrifugó (8000rpm x 20min) para separarlas del ADN en suspensión. El sobrenadante se pasó a un nuevo tubo y se adicionó igual volumen de alcohol isopropílico frío para precipitar el ADN. Las muestras se mezclaron por inversión hasta observar filamentos en suspensión (precipitado de ADN). Luego se centrifugaron (8000rpm x 10 min) para formar el pellet de ADN, y se descartó el sobrenadante. El pellet se lavó con 125µL de alcohol etílico 70% (x2). Seguidamente, el ADN se hidrató con buffer TE y se evaporó el alcohol por incubación a 37°C. Los extractos se homogeneizaron y en ellos se cuantificó el contenido de ADN a 260nm. Finalmente, el ADN se utilizó para evaluar por qPCR la abundancia de ARNt-Leu y β 2-microglobulina en cada grupo. En todas las reacciones de PCR se utilizaron 5ng de ADN total, y las mismas se llevaron a cabo por duplicado de la manera explicitada en el apartado de qPCR. Para el cálculo de la abundancia de ADN mitocondrial relativo al nuclear en cada grupo se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{Cantidad de genomas mitocondriales} = 2 \times 2^{-(\text{Ct ARNtLeu} - \text{Ct } \beta 2\text{microglobulina})}$$

8. Determinación del contenido lipídico intracelular por Oil Red O

Para evaluar la acumulación lipídica se utilizó la tinción de Oil Red O con normalización por contenido de ADN¹⁸⁰. Las células crecidas y diferenciadas en placas de 24 pozos, se lavaron con PBS (x3) y se fijaron a temperatura ambiente con paraformaldehído 4% en PBS durante 10min. Luego, se lavaron con PBS, y posteriormente, con una solución 60% de alcohol isopropílico en agua. Inmediatamente se incubaron con una solución de Oil Red O 0,3 % en alcohol isopropílico

durante 1 hora. Esta solución se preparó por dilución de una solución madre (Oil Red O 0,5% en alcohol isopropílico) con agua destilada en una proporción 3:2 (solución madre: agua destilada) y se filtró inmediatamente antes de su uso. Transcurrida la incubación, se retiró la solución de Oil Red O, y las células se lavaron con PBS (x2). A continuación, se incubaron con alcohol isopropílico (200µL/pozo) durante 10 min en agitación para extraer el colorante incorporado por los adipocitos y se determinó la absorbancia del Oil Red O a 505 nm en espectrofotómetro. Finalmente, las células se lavaron con PBS (x3) y se incubaron (200µL) con una solución de tripsina 0,25% en buffer de lisis de ADN por 24h. Para la determinación de la cantidad de ADN, se recolectó el contenido de cada pozo, se centrifugó (8000g x 1min) y se midió la absorbancia del sobrenadante a 260nm. Esta medida se utilizó para normalizar la absorbancia del Oil red O medida previamente.

9. Análisis de la expresión génica

9.1 Aislamiento de ARN total

El ARN total se aisló a partir de células en cultivo y de muestras de TA con reactivo Trizol y subsecuente extracción con cloroformo. Las células (2 pozos de placa multi-well de 12) o el tejido (50-100mg) se homogeneizaron con 0,5mL de Trizol y se les agregó 100 µL de cloroformo a cada tubo. Los tubos se agitaron a mano y se dejaron reposar 5 minutos a temperatura ambiente. Luego se centrifugaron (12000g x 10min) para separar la fase orgánica de la acuosa. La fase acuosa superior se retiró con micropipeta y se pasó a un tubo limpio. Seguidamente, se agregó alcohol isopropílico (250µL) para precipitar el ARN de la fase acuosa y se invirtieron los tubos 5 veces manualmente. Las muestras se dejaron reposar a temperatura ambiente 10min y se centrifugaron (12000g x 10min). Luego se descartó el sobrenadante y se lavó el pellet de ARN con alcohol etílico 75% despegándolo del tubo mediante el uso de vortex. El pellet se centrifugo nuevamente (12000g x 10min) para retirar el sobrenadante. Este paso se repitió una vez más. Luego del último lavado, se retiró el sobrenadante y los tubos se dejaron secar invertidos sobre papel 10 min. Finalmente, el pellet de ARN se resuspendió con pipeta en agua libre de ADNAsas y ARNAsas (20-30µL) y se evaporó el etanol por incubación de las muestras en baño (55°C x 10 min). El ARN total se cuantificó en espectrofotómetro de gota (Nanodrop 2000, Thermo Scientific) y la calidad del mismo se verificó utilizando las relaciones de absorbancias 260/280 y 260/230. La relación de absorbancias entre 260nm y 280nm se utilizó para verificar la contaminación con proteínas de la muestra, restos de fenol del Trizol o con otros contaminantes que absorban a 280nm. Generalmente un valor de 2 para el ARN indica una preparación pura, mientras que un valor menor indica la posible presencia de contaminantes. La relación de absorbancias entre 260nm y 230nm se usó como una medida secundaria de verificación de la pureza del ARN. El valor normal esperado para muestras puras se encuentra entre 2 y 2,2 pero si existen contaminantes que absorban a 230nm (ej.: fenol, EDTA) este valor se reduce.

9.2 Transcripción reversa del ARN total a ADN complementario

Para la transcripción reversa de todas las muestras se usaron 0,5µg de ARN total. La transcripción reversa se llevó a cabo en dos fases: en la primera se mezcló el volumen de muestra conteniendo 0,5µg de ARN con 1µL de *random* primers (0,01µg/µL) y agua libre de nucleasas hasta un volumen final de 13µL y se incubó 5min a 65°C seguido de 2 min a 4°C para romper las posibles estructuras secundarias del ARN molde. En la segunda fase se agregaron a la mezcla el buffer de reacción (4µL, 5X), los dNTPs (2µL, 0,25mM de cada tipo) y la transcriptasa reversa (1µL). Finalmente, las muestras se incubaron en un ciclador (Biometra T3000) para permitir la transcripción reversa: 10min a 25°C, 1h a 42°C, 70°C 10min.

9.3 Análisis de expresión de ARNm por PCR cuantitativa (qPCR)

Para la qPCR en todas las reacciones se utilizó 1µL de ADNc el cual se amplificó con primers específicos (0,25µM), agua libre de nucleasas, y mix de reacción comercial (buffer, ADN polimerasa, dNTPs, colorante Eva Green y 12,5mM de MgCl₂) en un equipo de ciclado Rotor-Gene Q. El esquema de ciclado utilizado fue el siguiente: 1 ciclo de 15 min a 95°C, seguido de 40 ciclos de 15seg a 95°C, 20seg a 60°C y 20seg a 72°C. Finalizada la amplificación se llevó a cabo una curva de *melting* (72°C a 99°C con rampa de 1°C) para determinar la especificidad y pureza del amplificado. La eficiencia de la reacción de PCR fue aproximadamente 1 para todos los pares de primers utilizados. Las reacciones para cada muestra y gen se hicieron por duplicado. Se utilizó β-actina como gen de referencia, y se calcularon las expresiones relativas de los genes de interés por el método del ΔΔCt:

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{tratado}} - \Delta Ct_{\text{control}} = [Ct_{\text{gen X(tratado)}} - Ct_{\beta\text{-actina (tratado)}}] - [Ct_{\text{gen X(control)}} - Ct_{\beta\text{-actina (control)}}]$$

$$\text{Expresión relativa del gen X en el grupo tratado respecto al control} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

Los resultados se refirieron a la expresión relativa del gen de interés en el grupo control, tomando ésta como 1. Por lo tanto, en los gráficos se representan las veces de aumento o disminución de la expresión del gen de interés en los grupos tratados respecto a 1 (grupo control).

| Gen | Primer directo (5'-3') | Primer reverso (5'-3') |
|-----------------|-------------------------|---------------------------|
| <i>β-actina</i> | TTTGCAGCTCCTTCGTTGCC | ACCCATTCCCACCATCACAC |
| <i>Ucp1</i> | GGATTGGCCTCTACGACTCAG | GCATTCTGACCTTCACGACC |
| <i>Pgc1a</i> | AAAAGCTTGACTGGCGTCAT | ACACCACTTCAATCCACCCAG |
| <i>Prdm16</i> | CCGTTCTTCATGGATCCCATCT | AAAGCTCTCCAGCTTCTCCG |
| <i>Cox8b</i> | CCGAGAATCATGCCAAGGCT | TCCTGCTGGAACCATGAAGC |
| <i>Cd137</i> | TGGGTCAGGGGTTCTGAGTTC | CTTCTCACAGCCCCTAGCAG |
| <i>Tbx1</i> | AGATGATCGTCACCAAGGCAG | TCATCTACGGGCACAAAGTCC |
| <i>Ebf2</i> | TCTTATCCTACATCCCACACCC | TGAGTCTGGTTTCTGTGGTGG |
| <i>Pparg2</i> | ACCCAGAGCATGGTGCCTTCG | TGCGAGTGGTCTTCCATCACGGA |
| <i>aP2</i> | ACA CCG AGATTTCTTCAAAGT | CCATCTAGGGTTATGATGCTCTTCA |
| <i>Cdk4</i> | AGCCGAGCGTAAGATCCCCT | CAGCTGCTCCTCCATTAGGA |

Tabla 1: Pares de primers utilizados para la amplificación de los genes en la PCR cuantitativa.

10. Análisis de la expresión proteica

10.1 Inmunofluorescencia

La técnica de inmunofluorescencia se llevó a cabo en adipocitos diferenciados a d8 post-diferenciación para determinar la expresión de UCP1, y a d4 post-diferenciación para evaluar la expresión de PPAR γ . Para esto, a diferencia de los cultivos destinados a aislamiento de ARN, la FEV se sembró sobre vidrios circulares de 1,2mm de diámetro tratados con poli-L-lisina y se diferenciaron tal como se describió anteriormente. Finalizado el cultivo (d8 para UCP1- d4 para PPAR γ), se retiró el medio de los pozos y las células se lavaron con PBS 0,1% Tween frío (PBST) (x3). Luego se fijaron con paraformaldehído 4% en PBS a temperatura ambiente durante 10 min y se lavaron con PBS frío (x3). Seguidamente, se permeabilizaron con Tritón 100X 0,2% en PBS durante 15 minutos a temperatura ambiente y se lavaron nuevamente. Finalizada la permeabilización, se bloqueó el pegado inespecífico del anticuerpo primario con 1% BSA en PBST+25,52mg/mL de Glicina durante 1 h. Luego, se realizó la incubación con el anticuerpo primario anti-UCP1 (1:500, Abcam) o anti-PPAR γ (1:200, Santa Cruz) *overnight* a 4°C en cámara húmeda. Al otro día, las células se lavaron con PBS (x3), y se incubaron con el anticuerpo secundario anti-IgG de conejo conjugado a Alexa Fluor 488 (1:1000, Santa Cruz) durante 2 h en oscuridad. Luego, se lavaron con PBST (x3), y los vidrios se montaron sobre portaobjetos con medio de montaje para preservar la fluorescencia e integridad de las células (1% DABCO, 0,0005% Hoescht, 50% glicerol en PBS) y se sellaron con esmalte. Las muestras se guardaron protegidas de la luz a 4°C. Las imágenes se adquirieron en microscopio de epifluorescencia Nikon Eclipse 50i y cámara digital Nikon DS-Ri1 con un adaptador 0,55X. Las imágenes se tomaron en formato TIFF en las mismas condiciones ópticas y de excitación con objetivos de 10X y 40X. El procesamiento de las imágenes y cuantificación de la fluorescencia se realizó con el programa FIJI.

Para la cuantificación de la expresión proteica determinamos la intensidad de fluorescencia media (IFM) y el porcentaje de células positivas. La IFM se calculó en el canal verde al cual se le sustrajo la fluorescencia verde debida a la auto-fluorescencia. Para UCP1 se calculó la IFM total de la foto, mientras que para PPAR γ se calculó la IFM dentro del área delimitada por el núcleo. La cuantificación del porcentaje de células positivas se realizó en el canal verde sobre la foto sustraída. Para ello, se estableció un valor umbral a partir del cual la fluorescencia se consideró debida al fluorocromo y no a la unión inespecífica del anticuerpo secundario. Para establecer este umbral, se utilizaron controles de pegado inespecífico del anticuerpo secundario que no contienen anticuerpo primario. El porcentaje de células positivas se calculó como el número de células con señal positiva para UCP1/PPAR γ sobre el número de células totales multiplicado por 100. Para determinar la cantidad de células totales se realizó el recuento de núcleos, a los cuales identificamos mediante la señal de fluorescencia positiva para el colorante nuclear Hoechst.

10.2 Inmunohistoquímica

Los depósitos de tejido adiposo se recibieron en formaldehído 4% en PBS y se fijaron durante 24h. Luego, se lavaron durante la noche con agua de la canilla para quitar los restos de solución de fijación y se deshidrataron en una serie de soluciones de concentración creciente de etanol: etanol 70% (24h), etanol 96% (3 x 2h), etanol 100% (2h). Al final de la deshidratación se aclararon con xileno (2h) y se embebieron en parafina (6h). Seguidamente, se cortaron secciones de 5-7 μ M de espesor de diferentes partes del bloque de parafina y se montaron en portaobjetos gelatinizados. Luego, las muestras se desparafinizaron (5min xileno) y rehidrataron en una serie de soluciones de concentración decreciente de etanol (100%, 96%, 70%). A continuación, se llevó a cabo la recuperación antigénica para lo cual los preparados se incubaron durante 1h en buffer citrato pH=6 a 95°C. Luego, se enjuagaron con PBS y se bloqueó la actividad de la peroxidasa endógena con H₂O₂ 0,3% en PBS durante 15min. Los preparados se lavaron nuevamente con PBS y se bloqueó la unión inespecífica del anticuerpo primario con 1% de BSA, 10% SFB en TBST durante 1h. Luego se procedió a la incubación con el anticuerpo primario anti-UCP1 (1:500, Abcam) overnight en cámara húmeda. Al día siguiente se realizaron 2 lavados con PBS y los preparados se incubaron con el anticuerpo secundario anti-IgG de conejo conjugado a la enzima HRP (1:500, Santa Cruz) durante 2h a temperatura ambiente. Finalmente, la inmunohistoquímica se reveló con el uso de 0,05% DAB y 0,015% H₂O₂ en PBS por 10min, y se llevó a cabo una contratinción con hematoxilina durante 30 seg para la tinción de los núcleos. Seguidamente, las muestras se deshidrataron siguiendo el procedimiento inverso al de hidratación. Los preparados se incubaron en xileno durante 30min y se montaron con Bálsamo de Canadá para ser preservados. Se realizaron controles de unión inespecífica del anticuerpo primario (sólo con anticuerpo secundario) y de actividad de la peroxidasa endógena (sin anticuerpo primario ni secundario). Finalmente, se adquirieron imágenes en campo claro con microscopio Nikon 50i y cámara digital Nikon DS-Ri1 con un adaptador 0,55X. Todas las fotos se adquirieron en las mismas condiciones ópticas y de iluminación con los objetivos de 10X/0.30 y 40X/0.65.

10.3 Western blot

La puesta a punto de la técnica de western blot estuvo incluida dentro de los experimentos de esta tesis¹⁸¹. Se utilizó para evaluar los niveles relativos de UCP1 y la fosforilación de RB en muestras de TA de animales tratados *in vivo*, y la expresión de UCP1 en adipocitos de tejido incubados *in vitro*.

Inicialmente se realizó la extracción de proteínas totales. Para ello, las muestras se homogeneizaron en buffer RIPA con inhibidores de proteasas (2 μ L/ μ g de tejido o adipocitos) y se mantuvieron en hielo durante 30min, agitándose en vórtex cada 10 min. Luego, se centrifugaron a 12000g durante 20 min a 4°C para separar el extracto de proteínas de los restos celulares. Las proteínas, que quedaron en la fase intermedia del tubo, se extrajeron con jeringa

de 1mL y se guardaron a -80°C para su posterior cuantificación y corrida electroforética. La cuantificación se llevó a cabo mediante la técnica de Lowry.

Para la separación de las proteínas según su masa, las muestras se corrieron en gel desnaturante de acrilamida:bisacrilamida (4-12%). Luego, las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF previamente activada con metanol. Finalizada la transferencia, se controló la eficiencia de la misma por tinción del gel con Coomassie Blue y de la membrana de PVDF con Ponceau S. La membrana se cortó horizontalmente con ayuda del marcador de peso molecular seleccionando las regiones donde se encontraban las proteínas de interés. En este caso, se utilizaron las regiones de membrana entre 25 y 37 KDa para UCP1; entre 37 y 50 KDa para β -actina, entre 50 y 75 KDa para β -tubulina, y entre 75 y 150 KDa para RB y p-RB. Las membranas se lavaron con TBST para quitar completamente el Ponceau S y se bloquearon (5% BSA en TBST) en agitación durante 1h para disminuir la unión no específica del anticuerpo primario. Luego, se incubaron overnight a 4°C con el anticuerpo primario correspondiente: UCP1 (1:1000, Abcam), β -ACTINA (1:1000, Bioss), β -TUBULINA (1:10000, Sigma), RB (1:2000, Cell signaling), p-RB (1:1000, Cell Signaling). Al día siguiente, las membranas se lavaron con TBST (3 x 5min) y se incubaron con el anticuerpo secundario anti-IgG de conejo conjugado a la enzima HRP (1:7500, Santa Cruz) en agitación a temperatura ambiente durante 2 h. Seguidamente, se lavaron con TBST (3 x 5min) y se revelaron. Para ello, se incubaron con reactivo de quimioluminiscencia (1,125mM Luminol, 0,46mM ácido para-cumárico, 26mM H_2O_2 en 100mM buffer Tris) en oscuridad. La señal se detectó con placas radiográficas (Carestream) a distintos tiempos luego del agregado del sustrato. Seguidamente, las placas se revelaron, fijaron y digitalizaron para su posterior cuantificación con la función de densitometría del programa FIJI.

11. Citometría de flujo

La técnica de citometría de flujo se utilizó para evaluar la población de células precursoras adipocitarias *beige* en la FEV de TAE y TAI de los animales tratados *in vivo* (C, P, F, FP). Previo a los experimentos, llevamos a cabo la puesta a punto de las concentraciones de los anticuerpos y del protocolo de permeabilización e inmunomarcación en cada depósito con animales control. Para el protocolo experimental, se aisló la FEV de los depósitos epididimal e inguinal de un pool de dos animales por grupo. Luego de realizar el recuento de viables, las células se resuspendieron en buffer FACS (0,5% BSA en PBS) a razón de 300.000 células cada $90\mu\text{L}$ y se distribuyeron en los tubos correspondientes a cada grupo (300000 células/tubo). Con las células sobrantes de los distintos grupos en cada depósito se realizó un pool, el cual se distribuyó en los tubos de simple marca (PDGFR α y EBF2) y de células sin marca (control negativo). A continuación, se llevó a cabo la inmunomarcación. Para ello, inicialmente se bloqueó la unión inespecífica del anticuerpo de superficie (PDGFR α) por el agregado de $10\mu\text{L}$ de SFB (SFB 10%) a los tubos con células e incubación en hielo durante 10min. Luego, las células se incubaron con el anticuerpo de superficie anti-PDGFR α -PE/Cy7 (1:200, Biolegend) durante 30 min en hielo.

Finalizada la incubación, se lavaron con 300µL de buffer FACS y posterior centrifugación (300g x 5min) para retirar el anticuerpo no unido. Luego se realizó la fijación, para lo cual las células se resuspendieron en paraformaldehído 2% en PBS y se incubaron 30 min a temperatura ambiente. Al finalizar, se lavaron por agregado de 500µL de buffer FACS y posterior centrifugación (300g x 5min) y se permeabilización por tratamiento con Tritón 100X 0,1% en PBS durante 15min a temperatura ambiente. Luego, se lavaron nuevamente y se resuspendieron en 100 µL de buffer FACS, donde fueron incubadas con el anticuerpo anti-EBF2-Alexa Fluor 647 (1:400, RD Systems) durante 30min en hielo. Finalmente, se realizó otro lavado para retirar el anticuerpo no unido y las células se resuspendieron en buffer FACS (100µL) y se guardaron a 4°C en oscuridad hasta el otro día. La adquisición se llevó a cabo con citómetro de flujo FACS Calibur Becton Dickinson (BD Bioscience). El análisis de los datos se hizo con el programa Flow Jo V10.

12. Determinaciones plasmáticas

La sangre troncal obtenida de los animales tratados *in vivo* se centrifugó (3000rpm x 15min, 4°C) inmediatamente luego de ser extraída para separar el plasma de la fracción celular y las plaquetas. El plasma se guardó en freezer a -80°C hasta el momento de uso.

En el plasma se determinaron las concentraciones plasmáticas de glucosa y triglicéridos mediante *kits* colorimétricos (Wiener lab.). De manera general, estos *kits* utilizan reacciones enzimáticas en la cual la glucosa o los triglicéridos son los sustratos de dichas reacciones que al ocurrir generan un producto coloreado del cual se mide la absorbancia a una longitud de onda específica, que por la ley de Lambert-Beer se relaciona directamente con la concentración de sustrato en la muestra. Los kits que utilizamos para las determinaciones utilizan un estándar (muestra comercial de concentración de glucosa o triglicéridos conocida), que sirve como control positivo de la reacción, y como referencia para calcular la concentración en las muestras, y agua como control negativo y blanco de reacción. Ambos se dejan reaccionar en las mismas condiciones que las muestras de concentración desconocida y se miden las absorbancias de los productos a 505nm. De esta manera, la concentración conocida del estándar y su absorbancia, y la absorbancia de la muestra desconocida se utilizan para calcular directamente la concentración de glucosa o triglicéridos en la muestra desconocida.

13. Análisis estadísticos

Para la confección de los gráficos y los análisis estadísticos se utilizó el programa GraphPad Prism 6.0. En primer lugar, se evaluó la normalidad de la distribución de los datos mediante el test de D'Agostino-Pearson¹⁸². Los datos normales se representaron con la media \pm el error estándar medio (EEM). Los datos que no siguieron una distribución normal se representaron con la mediana de la población y los valores individuales en cada grupo experimental. En los casos donde el n de la población fue grande ($n > 200$), los datos también se representaron en histogramas de frecuencias relativas.

Para determinar las diferencias estadísticas entre grupos en los experimentos con una variable independiente y dos grupos experimentales se utilizaron: el test t de Student pareado para datos con distribución normal, y el test no paramétrico pareado de Wilcoxon para datos sin distribución normal. En los ensayos con dos variables independientes se utilizó el análisis de varianzas (ANOVA) de dos vías para determinar el efecto de cada variable y la interacción entre ellas (Fig. 4). Las variables y la interacción se consideraron con efectos significativos cuando el valor p fue menor que 0,05. Cuando la interacción no fue significativa, se utilizó el efecto de las variables individuales y no se realizaron post-tests¹⁸³. Cuando la interacción resulto significativa ($V1 \times V2 < 0,05$), comparamos los grupos de interés mediante tests-t de Student corregidos por múltiples comparaciones^{184,185} por el método de Holm-Sidak¹⁸⁶⁻¹⁸⁸ (* $p < 0,05$ para la familia de comparaciones). El tamaño de la muestra y el análisis estadístico utilizado en cada experimento se indican en la leyenda de cada figura.

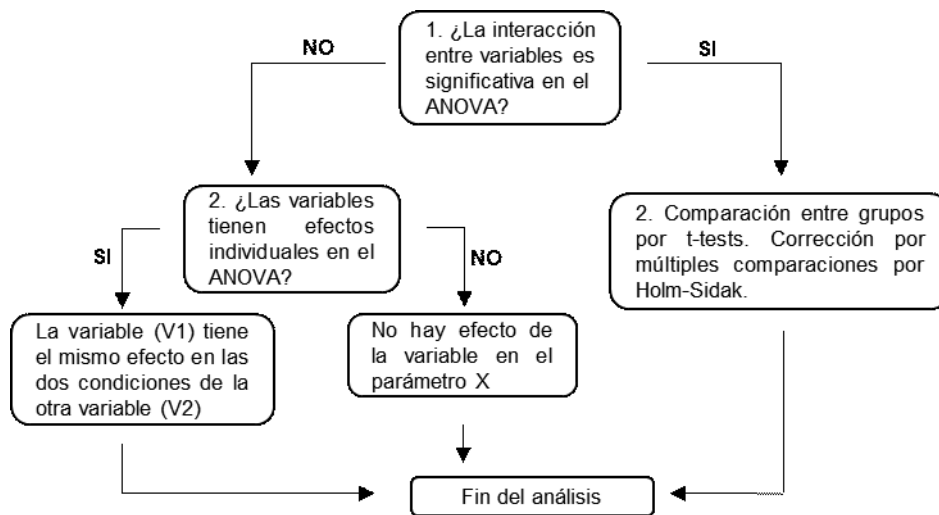


Figura 4: Esquema de análisis de los ensayos con dos variables independientes por ANOVA de dos vías.

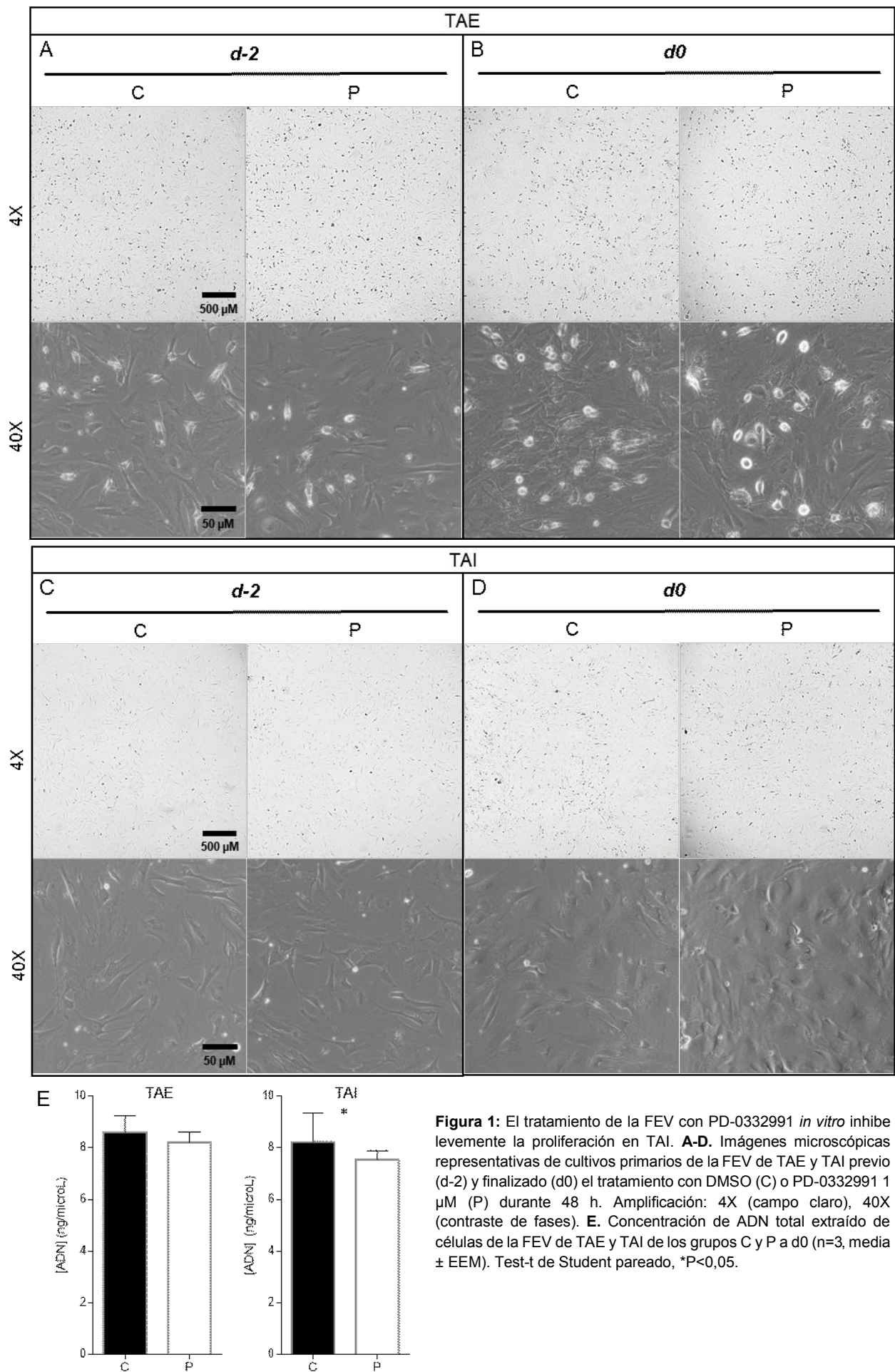
RESULTADOS

CAPÍTULO I: Efecto de la inhibición *in vitro* de CDK4/6 en la FEV de TAB sobre la adipogénesis *beige*

Para estudiar el rol de CDK4/6 en el *browning*, nuestra estrategia inicial consistió en inhibir su actividad *in vitro* en cada uno de los tipos celulares del TAB a partir de los cuales se originan los adipocitos *beige*. En este primer capítulo evaluamos si la inhibición de CDK4/6 en las CPAs afecta su capacidad de generar adipocitos *beige* por adipogénesis *de novo*. Considerando que los depósitos de TAB en roedores presentan distinta sensibilidad a la adquisición de características *beige* ante un estímulo de *browning*, en todos los experimentos de esta tesis estudiamos la respuesta de dos depósitos con diferente localización anatómica: el TAI se utilizó como representante de los depósitos subcutáneos, y el TAE para estudiar la respuesta de los depósitos de la cavidad abdominal.

1. Efecto de la inhibición de CDK4/6 en la FEV sobre su capacidad de proliferación *in vitro*

Debido a las funciones de CDK4 y CDK6 como proteínas reguladoras del ciclo celular, y a que la FEV contiene células con proliferación activa tanto *in vitro* como *in vivo* (CM, CPAs, entre otras), inicialmente estudiamos si la concentración de PD-033299 elegida para nuestros ensayos en base a referencias previas ($1\mu\text{M}$)¹⁷⁸ y el tiempo de tratamiento (48h) afectaba su proliferación. Para ello, evaluamos al microscopio óptico la densidad relativa de células previo, y luego del tratamiento de cultivos primarios de FEV de TAE y TAI con DMSO (C) o PD-0332991 (P). Al analizar cualitativamente las imágenes de los cultivos, a d-2 observamos que tanto en TAE como en TAI la densidad celular fue similar entre los grupos C y P, lo cual sugiere que las células de ambos grupos crecen a una velocidad semejante antes del agregado del inhibidor (Fig. 1 A y C). Finalizada la incubación (d0), tampoco observamos diferencias evidentes en la confluencia entre los grupos C y P en ninguno de los tejidos (Fig. 1 B y D). De acuerdo con esto, a d0 en TAE hallamos niveles de ADN que no difirieron entre ambos grupos. No obstante, al determinar la cantidad de ADN en TAI encontramos que los pozos tratados con PD-0332991 contenían aproximadamente un 10% menos de ADN respecto a los tratados sólo con DMSO, indicando una reducción de la cantidad de células por el tratamiento con el inhibidor en la FEV de este tejido (Fig. 1 E). Además, en las imágenes observamos que los cultivos de FEV de ambos depósitos proliferaron entre los días -2 y 0, mostrando que las células no estaban en su máxima confluencia cuando se les agregó el inhibidor. Estos resultados nos indicaron que el tratamiento de la FEV de TAE con PD-0332991 $1\mu\text{M}$ durante 48 h previo a la diferenciación no afecta su proliferación, pero si tiene un leve efecto inhibitorio sobre la proliferación de la FEV de TAI.



2. Efecto de la inhibición de CDK4/6 en la FEV sobre su determinación hacia el linaje adipocitario beige

Una de las características que distingue al linaje *beige* es la expresión de genes selectivos que se expresan en bajos niveles en los linajes blanco y pardo (*Tbx1*, *Cd137*). Además, se han descrito algunos marcadores capaces de identificar CPAs *beige* (*Ebf2*) en la FEV de los depósitos blancos. Haciendo uso de estas herramientas continuamos con el estudio del rol de CDK4/6 en la determinación del linaje *beige*, evaluando como se modifica la expresión de estos marcadores en cultivos de FEV de TAE y TAI cuando se inhiben CDK4/6 (Fig. 2). En TAE observamos que la incubación de la FEV con PD-0332991 redujo los niveles de expresión tanto de los genes selectivos del linaje *beige*, como de CPAs *beige*. Un resultado similar hallamos en TAI, aunque en este tejido la incubación con PD-0332991 disminuyó la expresión de *Tbx1* y *Ebf2*, pero no modificó la de *Cd137*. Estos resultados sugirieron un efecto negativo de la inhibición de CDK4/6 en la FEV del TA sobre la determinación hacia el linaje *beige*.

Además de su rol en el ciclo celular, se ha descrito que CDK4 y CDK6 son factores promotores del proceso adipogénico. Por lo tanto, para investigar un posible efecto de la inhibición de estas

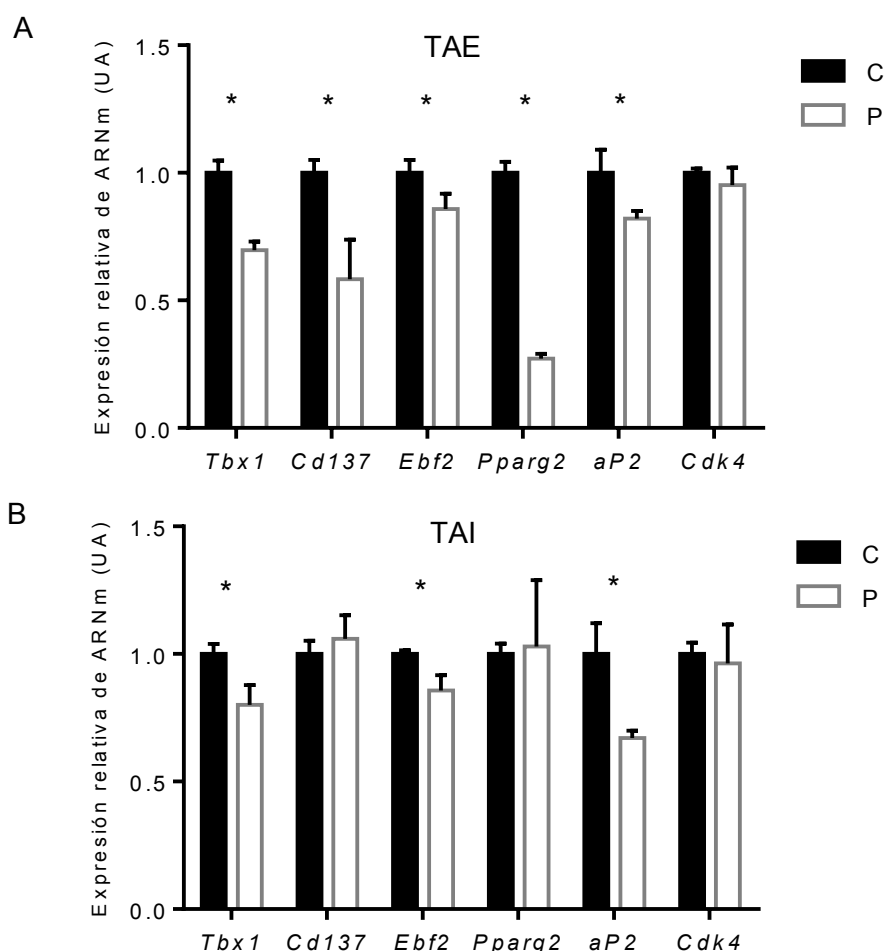


Figura 2: La inhibición de CDK4/6 en la FEV reduce la expresión de genes selectivos del linaje adipocitario beige. Niveles relativos de ARNm de genes selectivos del linaje beige (*Tbx1*, *Cd137*), CPAs beige (*Ebf2*), adipogénicos generales (*Pparg2*, *aP2*) y *Cdk4*, en cultivos primarios de FEV de TAE (A) y TAI (B) de animales control tratadas con DMSO (C) o PD-0332991 1 μ M (P) durante 48 h previo a la confluencia. (n=4, media \pm EEM). Test-t de Student pareado, *P<0,05.

quinasas sobre la adipogénesis general, seguidamente determinamos la expresión de genes comunes a los tres linajes adipocitarios (*Pparg2*, *aP2*). En TAE observamos que la incubación de la FEV con PD-0332991 reduce la expresión de ambos genes, mientras que en TAI sólo hallamos una reducción en la expresión de *aP2*. Estos hallazgos están de acuerdo con un posible efecto inhibitorio de la inhibición de CDK4/6 en la FEV sobre la adipogénesis general en ambos tejidos. Finalmente, evaluamos si la expresión de *Cdk4* se modificaba por la inhibición farmacológica. De manera coincidente con una acción de PD-0332991 a nivel de la funcionalidad proteica, la expresión de *Cdk4* no se modificó en ninguno de los dos depósitos por el tratamiento con el inhibidor (Fig. 2A y B).

3. Efecto de la inhibición de CDK4/6 en la FEV sobre la adipogénesis temprana

Para profundizar en el estudio del efecto de la inhibición de CDK4/6 sobre la adipogénesis, a continuación, evaluamos por inmunofluorescencia la expresión proteica nuclear de PPAR γ a día 4 (d4) post-diferenciación en cultivos primarios de la FEV de TAE y TAI tratados previo a la diferenciación con DMSO (C) o PD-0332991 (P). Elegimos d4 porque en estudios previos de nuestro laboratorio determinamos que en este estadio ocurre la máxima expresión del mensajero de *Pparg2*¹⁸⁹, lo cual previmos que nos permitiría detectar mejor las posibles diferencias entre grupos. En primer lugar, determinamos la intensidad de fluorescencia media nuclear (IFMn) y representamos los valores en un histograma de frecuencias relativas. Como puede observarse tanto en el histograma como en el gráfico de barras (Fig. 3A-a y C-c), la distribución de las IFMn no fue normal en ninguno de los dos tejidos, encontrándose la mayoría de los núcleos en valores de intensidad de fluorescencia bajos. En ambos tejidos observamos un desplazamiento del histograma del grupo P hacia menores valores de IFMn respecto al histograma del grupo C. Estas diferencias en la distribución de la IFMn entre el grupo P y C resultaron estadísticamente significativas (Fig. 3a y c), indicando una disminución en la expresión nuclear de PPAR γ en los cultivos tratados con PD-0332991. Luego, para evaluar si esta reducción en la expresión de PPAR γ afectaba la proporción de células que lo expresan, cuantificamos el porcentaje de células con señal nuclear positiva para PPAR γ (Fig. 3B y D). En ambos tejidos observamos que aproximadamente el 100% de las células a d4 post-diferenciación expresan PPAR γ en el grupo C. En TAE este porcentaje no se modificó por la incubación previa con PD-0332991, no obstante, en TAI se redujo en forma significativa aproximadamente un 20%. Estos resultados mostraron que en ambos tejidos la inhibición de CDK4/6 en la FEV previo a la diferenciación reduce la expresión nuclear de PPAR γ a d4 post-diferenciación. Adicionalmente, en TAI afecta negativamente el porcentaje de células PPAR γ +. Estos hallazgos son coincidentes con lo obtenido en la expresión génica a d0, y muestran nuevamente una atenuación del proceso adipogénico ante la inhibición de CDK4/6.

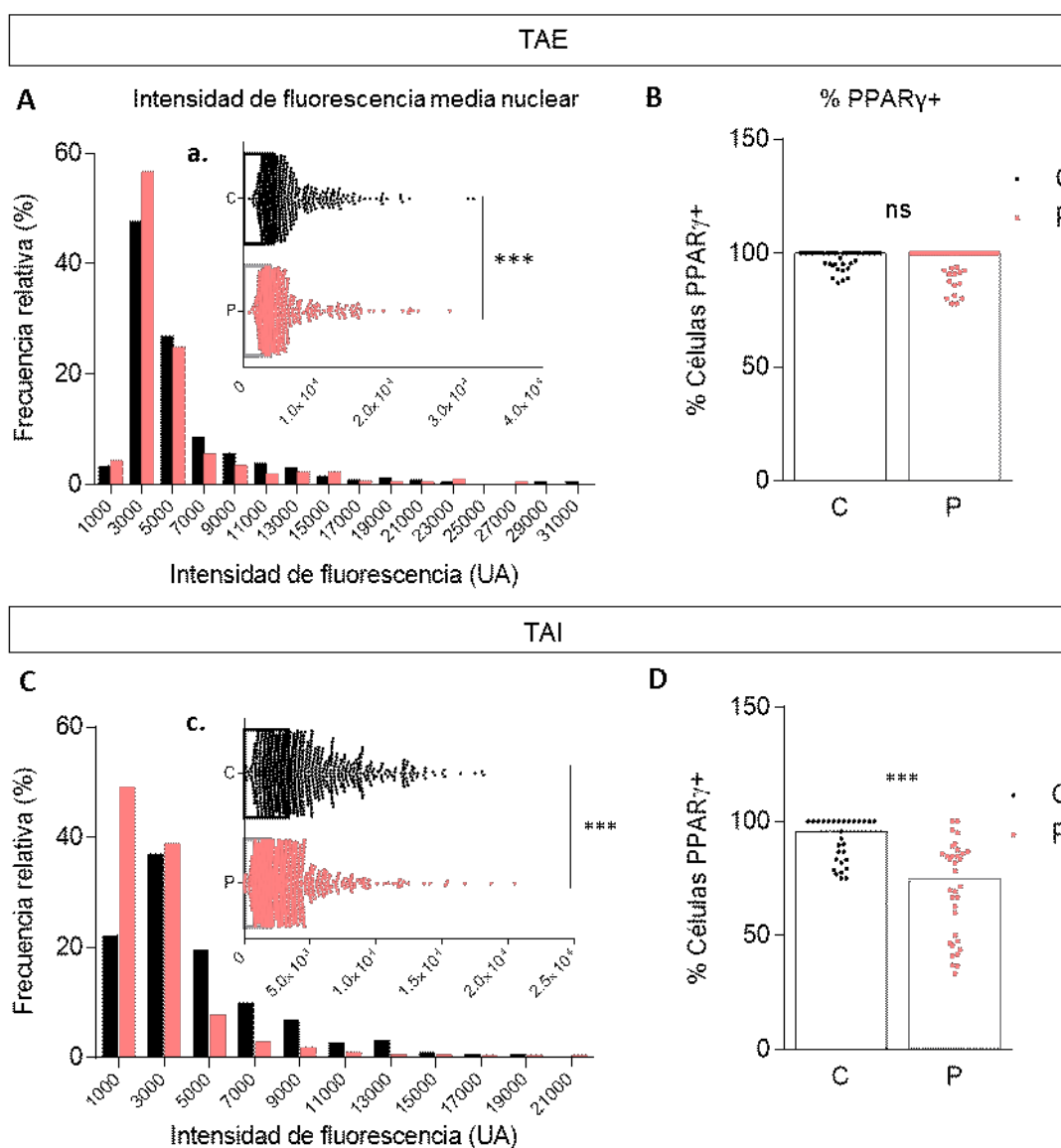


Figura 3: La inhibición de CDK4/6 en la FEV reduce la expresión proteica de PPAR γ a d4 post-diferenciación en TAE y TAI. **A y C.** Cuantificación de la señal nuclear de PPAR γ en los respectivos tejidos. Histograma de IFMn de PPAR γ a d4 post-diferenciación en cultivos primarios de FEV de TAE y TAI de animales control tratadas con DMSO (C) o PD-0332991 1 μ M (P) durante 48 h previo a la diferenciación. **a y c.** Gráfico de la mediana de la población y los valores de IFMn individuales. (n=600 núcleos totales, 3 experimentos independientes) **B y D.** Cuantificación del porcentaje de células PPAR γ + a d4 post-diferenciación. Gráfico representando la mediana de la población y los valores individuales. Test pareado no paramétrico de Wilcoxon, ***P<0,001.

4. Efecto de la inhibición de CDK4/6 en la FEV sobre su capacidad de diferenciarse a adipocitos *beige*

4.1 Efecto en la termogénesis basal

Siguiendo con el estudio del rol de CDK4/6 en la adipogénesis *beige*, a continuación evaluamos el efecto de la inhibición de CDK4/6 en la FEV sobre su capacidad de diferenciarse a adipocitos *beige*. Para ello, después del tratamiento de la FEV con DMSO (C) o PD-0332991 (P), indujimos la diferenciación con una mezcla pro-*beige* (promueve la generación de adipocitos con elevada capacidad termogénica) y evaluamos la expresión de marcadores termogénicos y mitocondriales en adipocitos diferenciados. De manera similar a lo observado en la FEV, en ambos depósitos los adipocitos del grupo P mostraron una disminución en la expresión de genes característicos

del programa termogénico (*Ucp1*, *Pgc1a*, *Prdm16*), y de un gen que codifica para uno de los transportadores de electrones mitocondriales (citocromo oxidasa, subunidad VIII (*Cox8b*)) (Fig. 4A y B). Esto sugiere una reducción de su capacidad termogénica basal respecto a los adipocitos C, indicando un efecto inhibitorio sobre la generación de adipocitos *beige* por adipogénesis *de novo*.

Además, determinamos la expresión de marcadores adipogénicos generales para evaluar el efecto de la inhibición de CDK4/6 en estadios avanzados del proceso adipogénico. En coincidencia con lo observado en la FEV, en los adipocitos P hallamos una menor expresión de *aP2* en ambos tejidos. Por su parte, la expresión de *Pparg2* mostró una tendencia a ser menor en los adipocitos P en TAE, pero no se modificó en TAI (Fig. 4A y B). Este resultado sugiere una posible restitución de la expresión de *Pparg2* durante el proceso de diferenciación en los adipocitos P de TAE a niveles similares a los del C. No obstante, la disminución en la expresión de *aP2* indica que ciertos factores comunes del proceso adipogénico en adipocitos *beige* y blancos permanecen afectados en estadios avanzados del mismo.

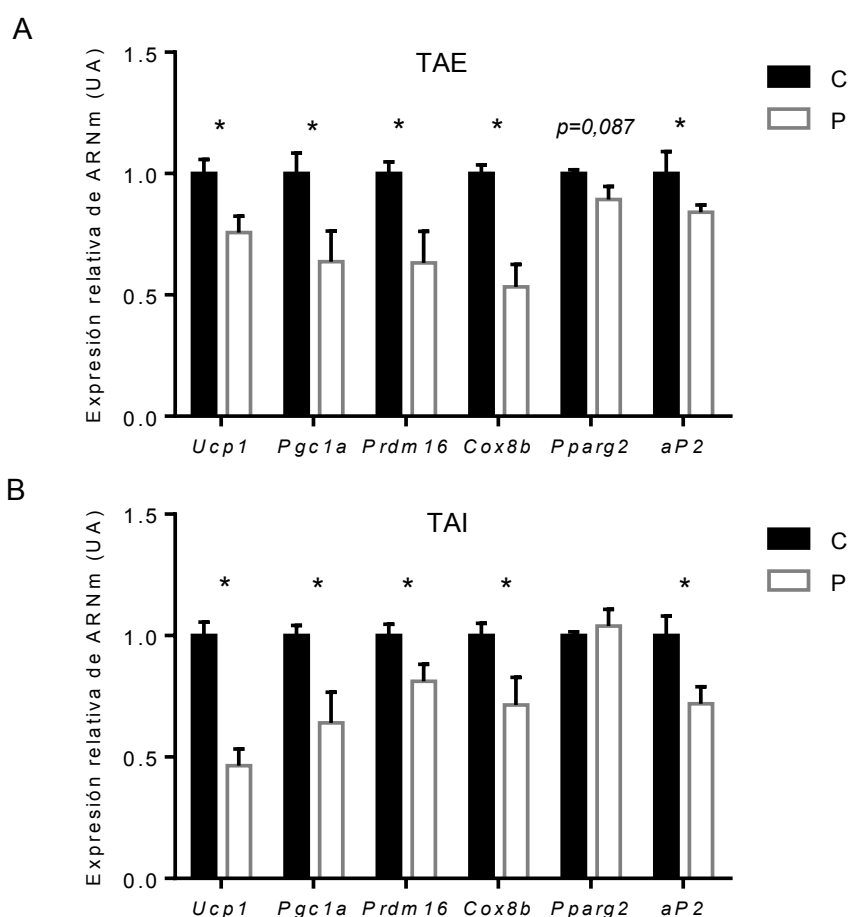
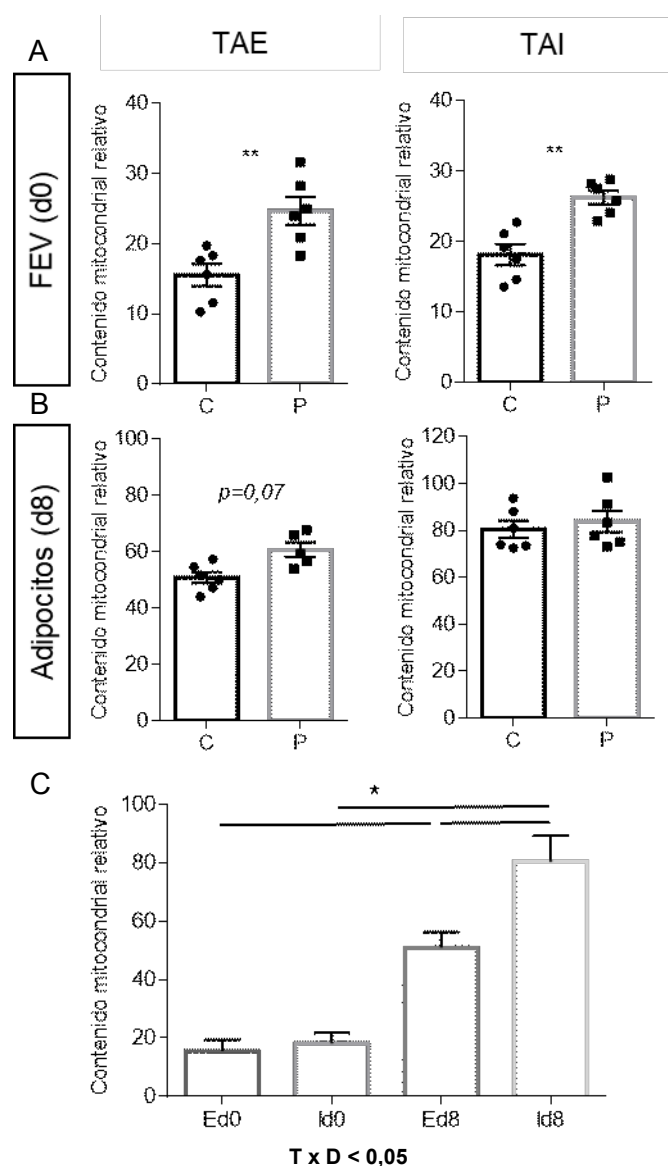


Figura 4: La inhibición de CDK4/6 en la FEV reduce su capacidad de diferenciarse a adipocitos termogénicos *in vitro*. Niveles relativos de ARNm de genes termogénicos (*Ucp1*, *Pgc1a*, *Prdm16*), un gen mitocondrial (*Cox8b*) y genes adipogénicos generales (*Pparg2*, *aP2*) en adipocitos a d8 post-diferenciación obtenidos por diferenciación de la FEV de TAE (A) y TAI (B) de animales control tratada durante 48 h previo a la confluencia con DMSO (C) o PD-0332991 1 μ M (P) (n=4, media \pm EEM). Test-t de Student pareado (* $P < 0,05$).

4.2 Efecto en el contenido mitocondrial

Además de la expresión de genes termogénicos, especialmente Ucp1, otro de los factores que contribuyen a la capacidad termogénica aumentada de los adipocitos *beige* respecto de los blancos es su elevado contenido mitocondrial. En este sentido, varios estudios han reportado la participación de CDK4 en la regulación de la dinámica mitocondrial, aunque los efectos descritos hasta ahora son encontrados entre los distintos tipos celulares y organismos estudiados^{190,191}. Por lo tanto, complementariamente a la expresión de marcadores del linaje *beige* evaluamos el contenido mitocondrial relativo en los grupos C y P tanto en las FEV (d0) como en los adipocitos diferenciados (d8). El análisis de los resultados mostró que el tratamiento con PD-0332991 de la FEV induce un aumento de aproximadamente 50% en su contenido mitocondrial en ambos tejidos (Fig. 1A). En TAE, esta diferencia tiende a mantenerse en los adipocitos P respecto de los C aún a d8 post-diferenciación, sin embargo, en TAI el contenido mitocondrial no se encontró modificado en los adipocitos en este estadio de la diferenciación por el tratamiento de la FEV con el inhibidor (Fig. 1B). Esto sugiere un restablecimiento de los niveles normales de mitocondrias en el grupo P durante la diferenciación. De acuerdo con esto, el



aumento en el contenido mitocondrial en los adipocitos de TAE fue menor en magnitud (aproximadamente 20%) que el observado en la FEV (Fig. 5. A y B). De manera complementaria, cuando comparamos los grupos C (Fig. 5C) observamos una mayor cantidad de genomas mitocondriales en los adipocitos

Figura 5: La inhibición de CDK4/6 en la FEV aumenta su contenido mitocondrial pero no modifica el de los adipocitos generados al diferenciarse. Niveles de ADN mitocondrial (ARNt-Leu) respecto a los de ADN nuclear (β 2-microglobulina) en cultivos primarios de FEV de TAE y TAI tratados con DMSO (C) o PD-0332991 1 μ M (P) durante 48 h previo a la confluencia (FEV d0) (A), o en adipocitos diferenciados a partir de FEVs C o P (Adipocitos d8) (B). (n=6-8, media \pm EEM). Test-t de Student pareado, **P<0,01. C. Comparación del contenido mitocondrial entre TAE y TAI en los distintos estadios del proceso de diferenciación. Contenido mitocondrial en cultivos control (C) de TAE (E) y TAI (I) en la FEV (d0) y en adipocitos diferenciados (d8). Para evaluar el efecto de las variables tiempo (T), depósito (D) y su interacción (T x D) utilizamos un ANOVA de dos vías. Las variables se consideraron con efectos significativos cuando P<0,05. La interacción entre las variables fue significativa (T x D<0,05), por lo tanto, para determinar el efecto del tiempo y del depósito comparamos los grupos (Ed0 vs Id0, Ed8 vs Id8, Ed0 vs Ed8, y Id0 vs Id8) mediante tests-t de Student corregidos por múltiples comparaciones por el método de Holm-Sidak (*P<0,05 para la familia de comparaciones). El resultado del ANOVA de dos vías se muestra en la parte inferior del gráfico.

respecto a la FEV en ambos depósitos, y en los adipocitos de TAI respecto a los de TAE. Por su parte, las FEVs de TAE y TAI no difirieron en su contenido mitocondrial promedio por célula. Estos resultados nos indicaron que: (1) el contenido mitocondrial se incrementa con la inhibición de CDK4/6 en la FEV del TA, pero se normaliza durante el proceso de diferenciación, (2) la cantidad de mitocondrias aumenta durante la diferenciación adipocitaria *in vitro*, y (3) que la FEV de TAI responde a la mezcla de diferenciación pro-*beige* con una mayor inducción del contenido mitocondrial que la de TAE.

4.3 Efecto en la termogénesis estimulada

Al igual que los adipocitos pardos, los adipocitos *beige* responden a la estimulación β -adrenérgica con una elevada inducción de la respiración desacoplada. Teniendo en cuenta la inhibición observada en la termogénesis basal cuando inhibimos CDK4/6 en la FEV, a continuación, investigamos los efectos en su capacidad termogénica estimulada. Con este fin, en adipocitos C y P diferenciados *in vitro* con una mezcla pro-*beige* estimulamos la termogénesis a d8 con forskolina (F), la cual promueve la actividad de la adenilato ciclasa imitando la cascada de señalización intracelular activada por la unión de los efectores β -adrenérgicos a sus receptores, y analizamos la expresión de genes termogénicos. Tal como esperábamos, los resultados mostraron una estimulación de la expresión de todos los marcadores termogénicos ante el tratamiento con forskolina (Fig. 6). En ambos tejidos, la mayor estimulación la encontramos en *Ucp1*, mientras que *Pgc1a* y *Prdm16* resultaron menos estimulados, probablemente por encontrarse río arriba en la cascada de activación de la expresión de *Ucp1*. Al evaluar el efecto de PD-0332991, observamos que tanto en TAE como en TAI provocó una inhibición de la expresión basal de *Ucp1*, al igual que habíamos observado previamente (Fig. 6A). Sin embargo, ante la estimulación con forskolina los adipocitos provenientes de CPAs tratadas con PD-0332991 (PF) desarrollaron mayores niveles de expresión de *Ucp1* que los controles (F). Para *Pgc1a* también hallamos una menor expresión basal en ambos tejidos en el grupo P respecto al C, confirmando nuestros resultados previos (Fig. 6B). En TAE, PD-0332991 adicionalmente inhibió la estimulación de *Pgc1a* por forskolina, mientras que en TAI no la afectó, encontrándose similares niveles de expresión en los adipocitos F y PF. Finalmente, al evaluar la expresión del marcador de linaje pardo/*beige* *Prdm16*, no encontramos efectos significativos de PD-0332991 en TAE, y en TAI sólo hallamos una inhibición en su expresión basal (Fig. 6C). Globalmente, estos resultados mostraron que la menor capacidad termogénica basal de la población de adipocitos diferenciados a partir de la FEV tratada con PD-0332991 puede ser revertida por un estímulo termogénico agudo en ausencia del inhibidor.

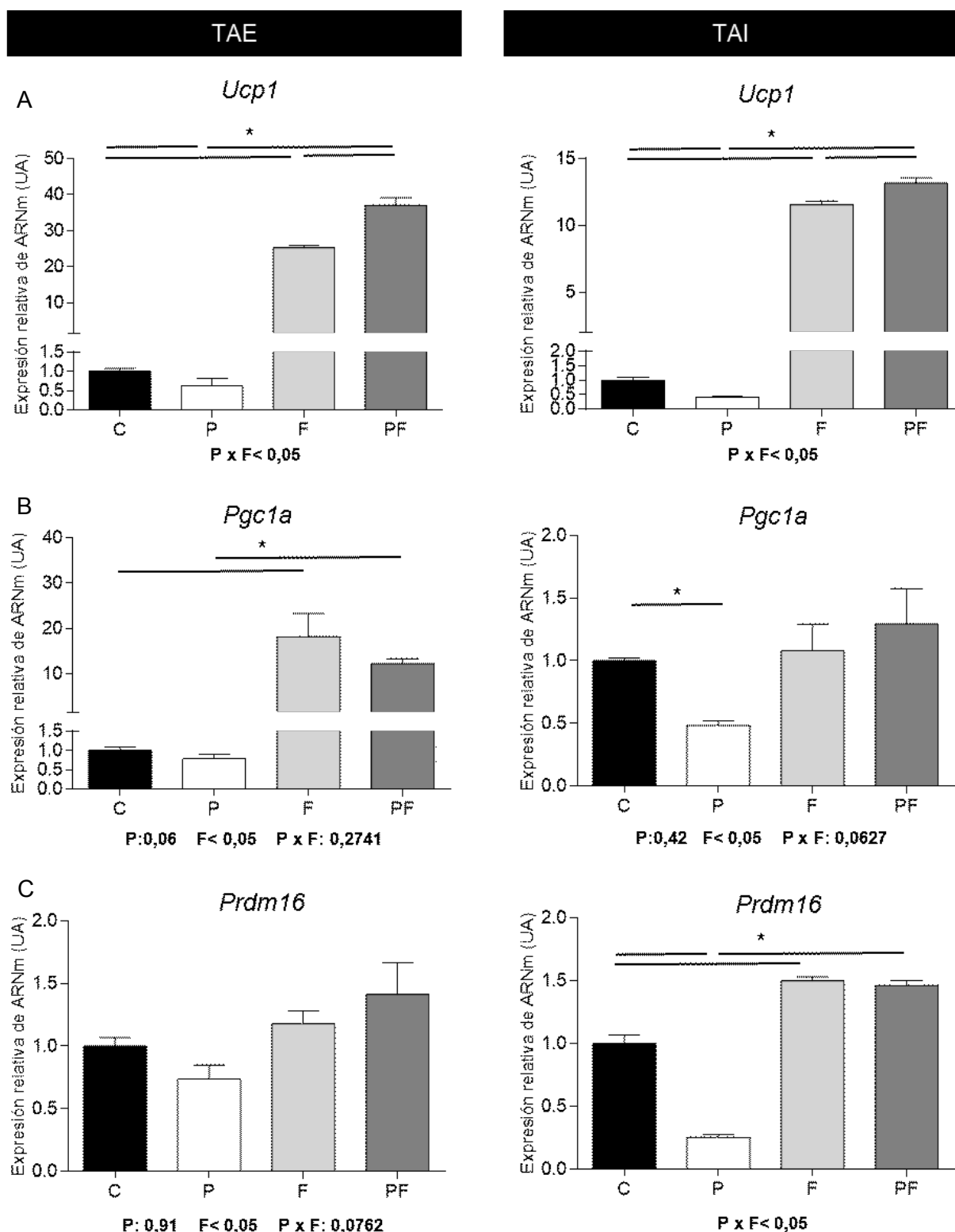


Figura 6: La inhibición de CDK4/6 en la FEV del TAB produce una población de adipocitos con menor capacidad termogénica basal, lo cual puede ser revertido por un estímulo termogénico agudo. Niveles relativos de ARNm de genes termogénicos en adipocitos diferenciados a partir de FEV de TAE y TAI de animales control tratadas con DMSO (C) o PD-0332991 1 μ M (P) durante 48 h previo a la confluencia, tratadas a d8 post diferenciación con vehículo (C, P) o Forskolina (F, PF). (n=6-8, media \pm EEM). Para evaluar el efecto de las variables PD-0332991 (P), Forskolina (F) y su interacción (P x F) utilizamos un ANOVA de dos vías. Las variables se consideraron con efectos significativos cuando $P < 0,05$. Cuando hallamos interacción entre las variables (P x F $< 0,05$), comparamos los grupos (P vs C, F vs C, PF vs P y PF vs F) mediante test-t de Student corregidos por múltiples comparaciones por el método de Holm-Sidak (* $P < 0,05$ para la familia de comparaciones) para determinar el efecto de PD-0332991 y Forskolina. El resultado del ANOVA de dos vías se muestra en la parte inferior de los gráficos. Cuando la interacción fue significativa no se muestra el resultado de las variables P y F.

5. Efecto de la inhibición de CDK4/6 en parámetros de diferenciación tardíos

Nuestros resultados en parámetros tempranos de diferenciación indicaron que la inhibición de CDK4/6 en la FEV tendría un efecto negativo sobre la adipogénesis general. No obstante, la expresión génica de *Pparg2* en TAE en adipocitos a d8-post diferenciación sugirió una recuperación de su expresión durante el proceso adipogénico. Debido a esta aparente controversia entre los estadios iniciales de la diferenciación y más avanzados, decidimos evaluar el efecto de la inhibición de CDK4/6 en la FEV sobre un marcador tardío de diferenciación como es la acumulación lipídica. Para ello, determinamos el contenido lipídico a d8 post-diferenciación de adipocitos diferenciados a partir de FEVs tratadas con DMSO (C) o PD0332991 (P), y en un subgrupo de los mismos tratados con forskolina a d8 (F y PF). Además, tomamos imágenes de los adipocitos en condiciones basales (C y P). Cualitativamente, las imágenes mostraron un

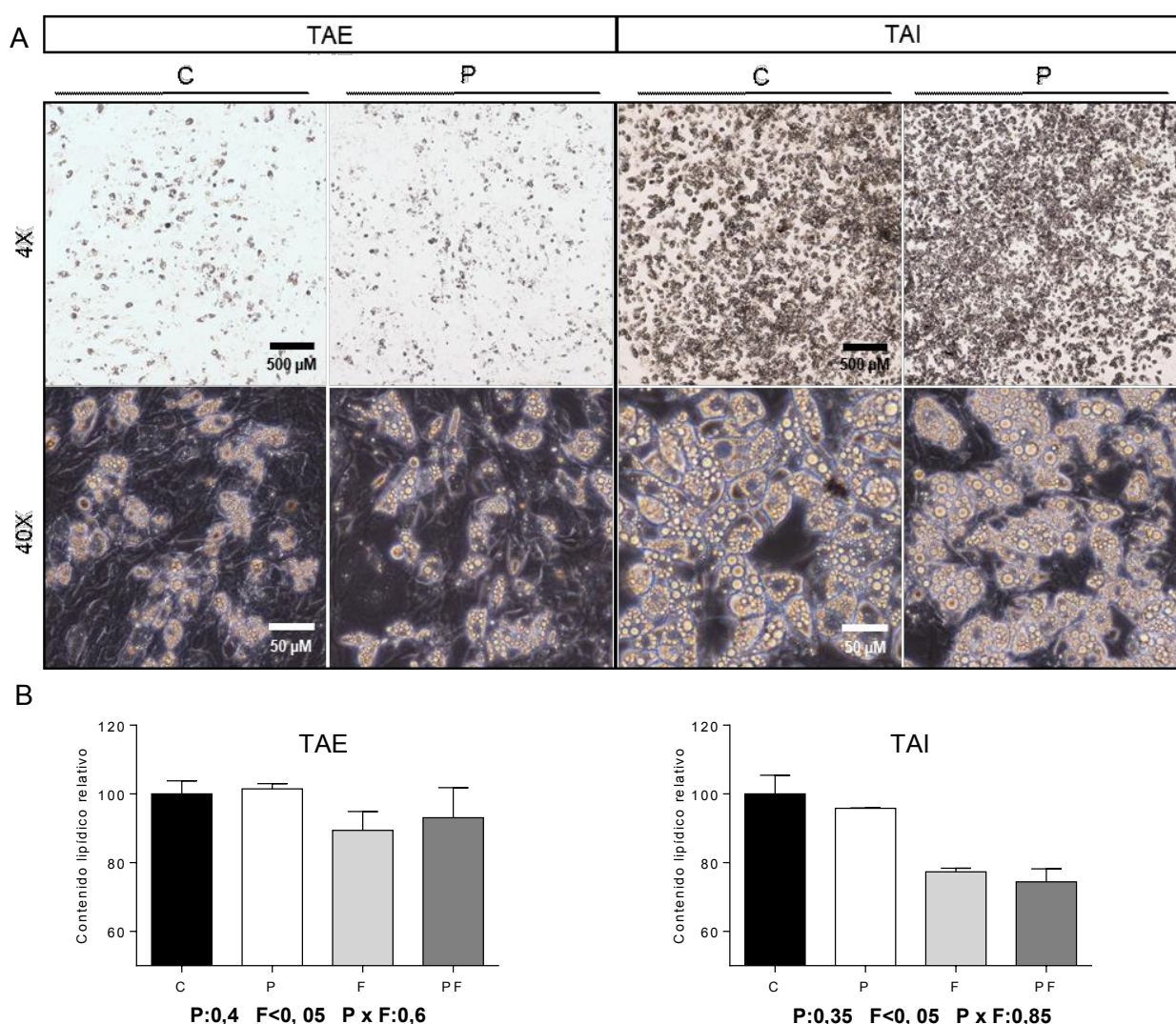


Figura 7: La inhibición de CDK4/6 en la FEV no modifica el contenido lipídico de los adipocitos generados al diferenciarse. **A.** Imágenes representativas de cultivos de adipocitos diferenciados (d8) a partir de FEV de TAE y TAI de animales control tratadas con DMSO (C) o PD-0332991 1 μ M (P) durante 48 h previo a la confluencia. Aumento: 4X (campo claro), 40X (contraste de fases). **B.** Contenido lipídico en los adipocitos C y P tratados a d8 post-diferenciación con vehículo (C, P) o Forskolina (F, PF). El contenido lipídico se determinó como la absorbancia del colorante Oil Red O internalizado por los adipocitos normalizado por la cantidad de células totales, determinada por la absorbancia del ADN total. Los valores se expresaron en porcentajes relativos al contenido medio del grupo control ($n=3$, media \pm EEM). Para evaluar el efecto de las variables PD-0332991 (P), Forskolina (F) y su interacción (P x F) utilizamos un ANOVA de dos vías. Las variables se consideraron con efectos significativos cuando $P < 0,05$. No hallamos interacción entre ellas ni en TAE ni en TAI. El resultado del ANOVA de dos vías se muestra en la parte inferior de los gráficos.

patrón de diferenciación similar entre los dos grupos de adipocitos en ambos tejidos (Fig. 7A). No obstante, el porcentaje de diferenciación en TAI fue mucho mayor que en TAE, característica que se repitió en todos los cultivos de adipocitos diferenciados de esta tesis e indicaría una mayor respuesta de la FEV de TAI a la mezcla de diferenciación pro-*beige*.

Al cuantificar la acumulación lipídica (Fig. 7B), al igual que sugirieron las imágenes, no hallamos efecto del tratamiento de la FEV con PD-0332991 sobre este parámetro ni en condiciones basales, ni estimuladas en ninguno de los dos tejidos. Este resultado es coincidente con el hecho de que la expresión de *Pparg2* tampoco resulto alterada en adipocitos P. Por su parte, tal como esperábamos según la función descrita como activador de la lipólisis y la termogénesis, el estímulo con Forskolina disminuyó el contenido lipídico de los adipocitos en ambos tejidos. De manera interesante, la disminución observada respecto al contenido basal de triglicéridos fue mayor en TAI que en TAE (~25% vs 10% respectivamente), lo cual está de acuerdo con una mayor sensibilidad de este tejido a la estimulación adrenérgica. De manera general, estos resultados mostraron que, si bien la inhibición de CDK4/6 en la FEV afecta factores adipogénicos durante la adipogénesis temprana, no modifica la acumulación lipídica de los adipocitos en estadios avanzados de la diferenciación.

En conjunto, los resultados de este capítulo mostraron que la inhibición de CDK4 y CDK6 en la FEV de TAE y TAI in vitro reprime su expresión de marcadores del linaje beige y la de los adipocitos generados al diferenciarse. No obstante, estos adipocitos mostraron niveles normales de mitocondrias. Adicionalmente, observamos que la inhibición de CDK4/6 en la FEV tiene un efecto inhibitorio sobre la adipogénesis en estadios tempranos de la diferenciación, el cual no fue observado en parámetros tardíos. De manera general, en este capítulo hallamos que la inhibición de CDK4/6 en las CPAs afecta negativamente su determinación hacia el linaje beige y su capacidad de diferenciarse a adipocitos beige. Además, produce una inhibición temprana de la adipogénesis general.

CAPÍTULO II: Efecto de la inhibición *in vitro* de CDK4/6 en adipocitos sobre su capacidad termogénica

Habiendo comprobado en el capítulo previo que la actividad de CDK4/6 en las CPAs es necesaria para la generación de adipocitos *beige* por adipogénesis *de novo*, en este segundo capítulo nos propusimos evaluar su rol en el control del programa termogénico de los adipocitos para investigar su posible implicancia en la generación de adipocitos *beige* por transdiferenciación.

1. Efecto de la inhibición de la actividad de CDK4/6 sobre el programa termogénicos de adipocitos diferenciados *in vitro*

1.1 Efecto en la expresión a nivel del ARNm

En primer lugar, estudiamos el efecto de la inhibición de CDK4/6 en adipocitos diferenciados sobre la termogénesis basal y estimulada. Para ello, tratamos adipocitos diferenciados de TAE y TAI a d6 post-diferenciación con DMSO (C) o PD-0332991 (P) por 48h, y analizamos la expresión de genes implicados en el proceso termogénico en condiciones basales, y luego de la estimulación de la termogénesis con forskolina a d8. De acuerdo con su función como estimulante de la cascada de señalización adrenérgica, el tratamiento con forskolina indujo un aumento en la expresión de todos los genes termogénicos (*Ucp1*, *Pgc1a*, *Prdm16*) en ambos tejidos, indicando una activación de la respiración desacoplada (Fig. 1). Al evaluar el efecto de PD-0332991 en TAE, hallamos una inhibición de la expresión de *Pgc1a* y *Prdm16* tanto basalmente como de la estimulada por Forskolina (Fig. 1B y C). En *Ucp1*, si bien la variable PD-0332991 no resultó estadísticamente significativa, observamos una disminución en su expresión en los adipocitos P y PF respecto a sus controles basales y estimulados, respectivamente ($p=0,12$) (Fig. 1A). A diferencia de lo observado en TAE, en TAI el tratamiento de los adipocitos con PD-0332991 no tuvo efecto en la expresión de *Pgc1a* y *Prdm16* (Fig. 1B y C). Cuando analizamos *Ucp1* en TAI, encontramos que los adipocitos P expresaban menores niveles que los C basalmente. No obstante, la estimulación de los mismos con forskolina (PF) indujo su expresión a niveles superiores a los del control (F) (Fig. 1A). De manera general, estos resultados nos mostraron que la inhibición de CDK4/6 en adipocitos de TAE tendría un efecto inhibitorio sobre la expresión basal de genes termogénicos, y sobre la estimulación desencadenada por un estímulo β -adrenérgico, mientras que en TAI los efectos sobre el programa termogénico serían menores, afectándose sólo la expresión de *Ucp1*.

1.2 Efecto sobre la expresión proteica basal de *Ucp1*

Debido al rol central de *Ucp1* en la termogénesis, a continuación, nos propusimos estudiar si la reducción en su expresión génica en condiciones basales se traducía en un cambio en los niveles proteicos. Con este fin, luego del tratamiento de adipocitos diferenciados de TAE y TAI con DMSO (C) o PD-0332991 (P) durante las últimas 48 h de la etapa de diferenciación, llevamos a cabo una inmunofluorescencia contra UCP1 (Fig. 2). Cualitativamente, de acuerdo con las

escasas zonas de citoplasma remanente en un adipocito maduro donde podrían localizarse las mitocondrias, observamos que la señal de UCP1 se encontraba localizada en la región nuclear

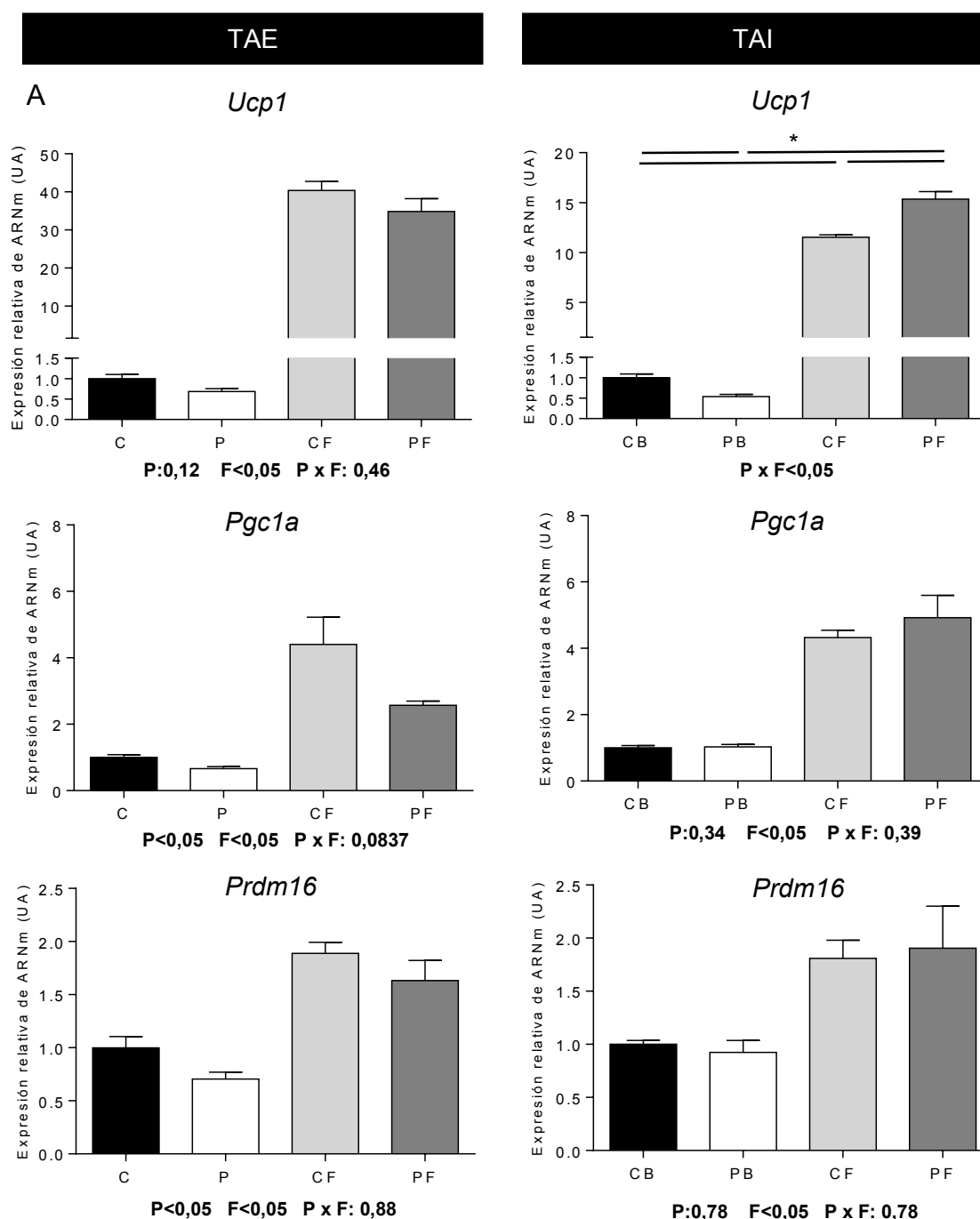


Figura 1: La inhibición de CDK4/6 en adipocitos beige inhibe la expresión de marcadores termogénicos en TAE y de *Ucp1* en TAI. **A-C.** Niveles relativos de ARNm de genes termogénicos (*Ucp1*, *Pgc1a*, *Prdm16*) en adipocitos diferenciados a partir de FEV de TAE y TAI de animales control tratados a d6 post-diferenciación con DMSO (C) o PD-0332991 1 μ M (P) durante 48 h y con vehículo (C, P) o Forskolina (F, PF) a d8. (n=4-6, media \pm EEM). Para evaluar el efecto de las variables PD-0332991 (P), Forskolina (F) y su interacción (P x F) utilizamos un ANOVA de dos vías. Las variables se consideraron con efectos significativos cuando $P < 0,05$. Cuando hallamos interacción entre las variables (P x F < 0,05), comparamos los grupos (P vs C, F vs C, PF vs P y PF vs F) mediante tests-t de Student corregidos por múltiples comparaciones por el método de Holm-Sidak (* $P < 0,05$ para la familia de comparaciones) para determinar el efecto de PD-0332991 y Forskolina. El resultado del ANOVA de dos vías se muestra en la parte inferior de los gráficos. Cuando la interacción fue significativa no se muestra el resultado de las variables P y F.

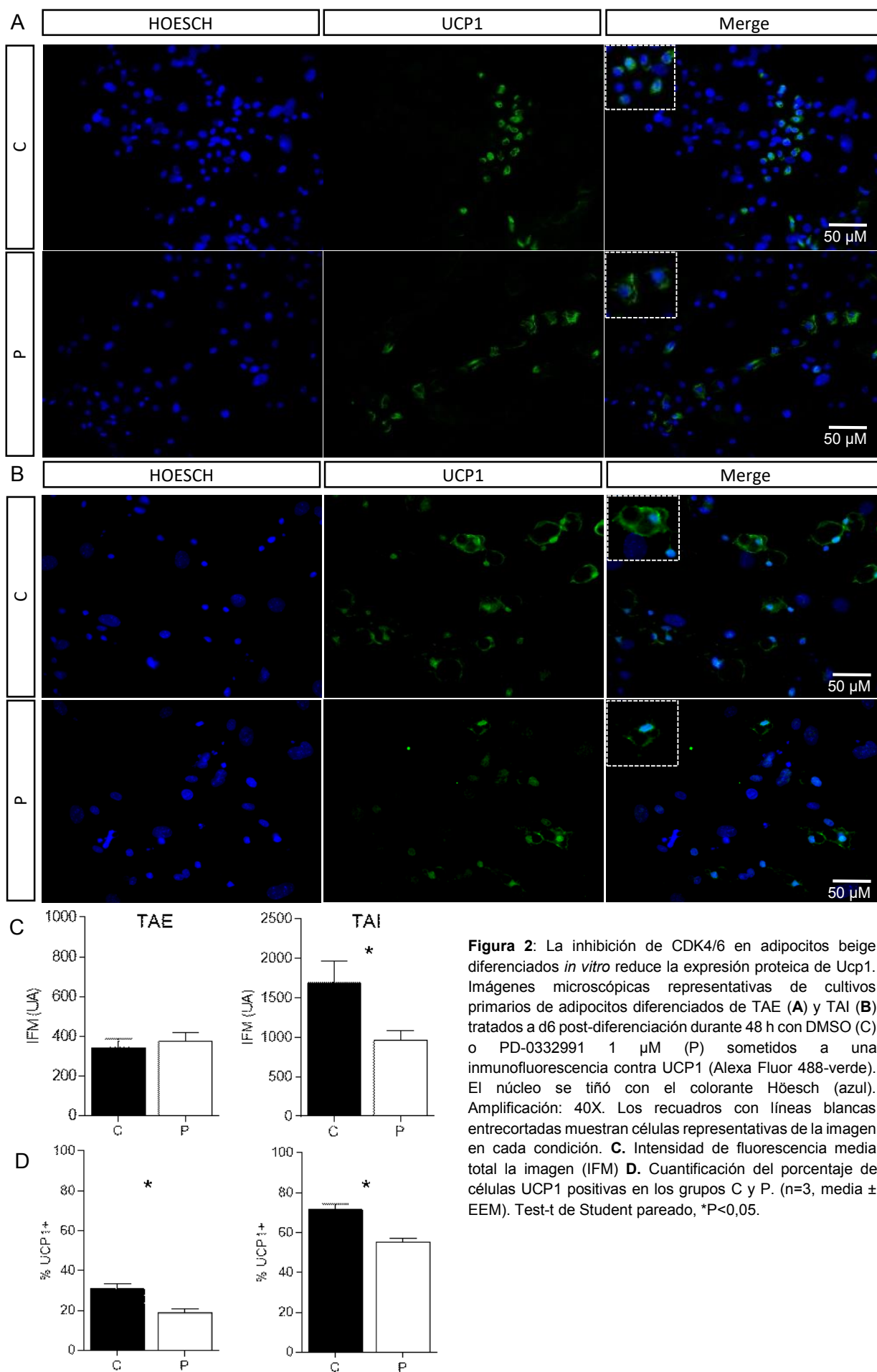


Figura 2: La inhibición de CDK4/6 en adipocitos beige diferenciados *in vitro* reduce la expresión proteica de Ucp1. Imágenes microscópicas representativas de cultivos primarios de adipocitos diferenciados de TAE (A) y TAI (B) tratados a d6 post-diferenciación durante 48 h con DMSO (C) o PD-0332991 1 μ M (P) sometidos a una inmunofluorescencia contra UCP1 (Alexa Fluor 488-verde). El núcleo se tiñó con el colorante Hoesch (azul). Amplificación: 40X. Los recuadros con líneas blancas entrecortadas muestran células representativas de la imagen en cada condición. **C.** Intensidad de fluorescencia media total la imagen (IFM) **D.** Cuantificación del porcentaje de células UCP1 positivas en los grupos C y P. (n=3, media \pm EEM). Test-t de Student pareado, *P<0,05.

y en regiones estrechas alrededor de las vacuolas lipídicas en ambos tejidos (Fig. 2A y B). Como medida de los niveles de expresión de UCP1 en primer lugar determinamos la intensidad de fluorescencia media (IFM) en el canal verde de imágenes microscópicas tomadas a un aumento de 40X (Fig. 2C). Los resultados mostraron que en TAE, el tratamiento de los adipocitos con PD-0332991 no modificó la IFM de UCP1, no obstante, en TAI indujo una disminución significativa de este parámetro a aproximadamente la mitad de su valor en el grupo C indicando una reducción en su expresión. Seguidamente, cuantificamos el porcentaje de células UCP1+ como el número de células con señal positiva para UCP1 (UCP1+) sobre el número de células totales en cada campo multiplicado por 100 (Fig. 2D). En los cultivos de adipocitos diferenciados de TAE encontramos que en el grupo C el 30% de las células expresaba UCP1, mientras que en el grupo P este porcentaje fue del 20%, y resultó significativamente menor. Un resultado similar observamos en TAI, donde el porcentaje se redujo de 70% en el grupo C, a 55% en el grupo P. Esta disminución en el porcentaje de células UCP1+ ante el tratamiento con PD-0332991, sugiere una disminución de la cantidad de adipocitos *beige* de la población. Adicionalmente, en los cultivos de TAI observamos una mayor IFM y proporción de células UCP1+ que en los de TAE, lo cual podría ser consecuencia del mayor porcentaje de diferenciación *in vitro* de la FEV de TAI respecto a la de TAE con este coctel de diferenciación, tal como apreciamos en el capítulo anterior. Estos resultados mostraron que la inhibición de CDK4/6 en adipocitos *beige* también afecta negativamente la expresión proteica de Ucp1, y son coincidentes con lo observado a nivel del ARNm. En conjunto, indican que CDK4/6 regulan la termogénesis basal en adipocitos *beige in vitro* y sugieren un rol en la transdiferenciación adipocitaria.

1.2 Efecto de la inhibición de CDK4/6 sobre el contenido mitocondrial

Seguidamente, en los cultivos de adipocitos diferenciados estudiamos si la inhibición de CDK4/6 modificaba el contenido mitocondrial. Para ello determinamos el número relativo de genomas mitocondriales respecto al nuclear en los grupos C y P (Fig. 3). Al igual que observamos en la FEV, el tratamiento de los adipocitos diferenciados de TAE con PD-0332991 indujo un aumento significativo en el contenido de genomas mitocondriales respecto a la condición control. Este aumento fue aproximadamente de 25%, lo cual representa la mitad del incremento hallado en la FEV de TAE. Al evaluar el contenido mitocondrial en adipocitos de TAI, a diferencia de lo encontrado en TAE e incluso en la FEV de TAI, observamos que el mismo no se modificó por la incubación con PD-0332991. De manera complementaria, evidenciamos que los niveles de genomas mitocondriales en adipocitos fueron comparables con los hallados en el capítulo previo, y mayores a los de la FEV, confirmando un mayor contenido mitocondrial de los adipocitos respecto a sus precursores. Estos resultados nos permitieron concluir que la inhibición de CDK4/6 en cultivos de adipocitos incrementa el contenido mitocondrial en TAE, pero no lo modifica en TAI.

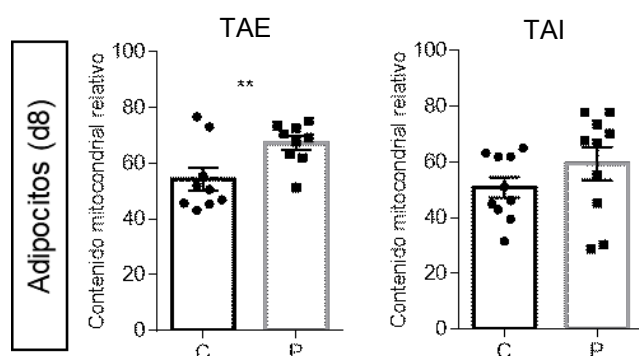


Figura 3: La inhibición de CDK4/6 en adipocitos diferenciados aumenta el contenido mitocondrial en TAE. Contenido relativo mitocondrial. Niveles de ADN mitocondrial (ARNt-Leu) respecto a los de ADN nuclear (β -microglobulina) en cultivos de adipocitos diferenciados de FEV de TAE y TAI de animales control tratados a d6 con DMSO (C) o PD-0332991 1 μ M (P) durante 48 h. (n= 8-10, media \pm EEM). Test-t de Student pareado, **P<0,01.

1.3 Efecto de la inhibición de CDK4/6 en la funcionalidad adipocitaria

Además de sus funciones como reguladores de la actividad de PPAR γ durante la adipogénesis, recientemente se describieron roles de CDK4 y CDK6 en la regulación de funciones primordiales en el adipocito, tales como la sensibilidad a la insulina y la acumulación lipídica^{171,175}. A raíz de estas evidencias, decidimos evaluar si la inhibición de CDK4/6 en adipocitos afectaba parámetros indicadores de la funcionalidad adipocitaria. Para ello, determinamos la expresión de *Pparg2* y el contenido lipídico en adipocitos diferenciados tratados a d6-postdiferenciación con DMSO (C) o PD-0332991 (P) por 48h. Como control positivo de la técnica de Oil Red O, a un subgrupo de los adipocitos P y C se los estimuló a d8 con forskolina (F, PF). Los resultados mostraron que los niveles de ARNm de *Pparg2* en adipocitos de TAE disminuyeron significativamente ante el tratamiento con PD-0332991, no obstante, en TAI no se modificaron (Fig. 4A). De acuerdo con la disminución en la expresión de *Pparg2*, en TAE encontramos una tendencia (p=0,07) a que el tratamiento con PD-0332991 reduzca el contenido lipídico de los adipocitos. Al evaluar este parámetro en TAI, coincidentemente con la expresión de *Pparg2*, tampoco hallamos efecto de PD-0332991 mostrando una respuesta diferencial de los adipocitos de TAI respecto a TAE (Fig.

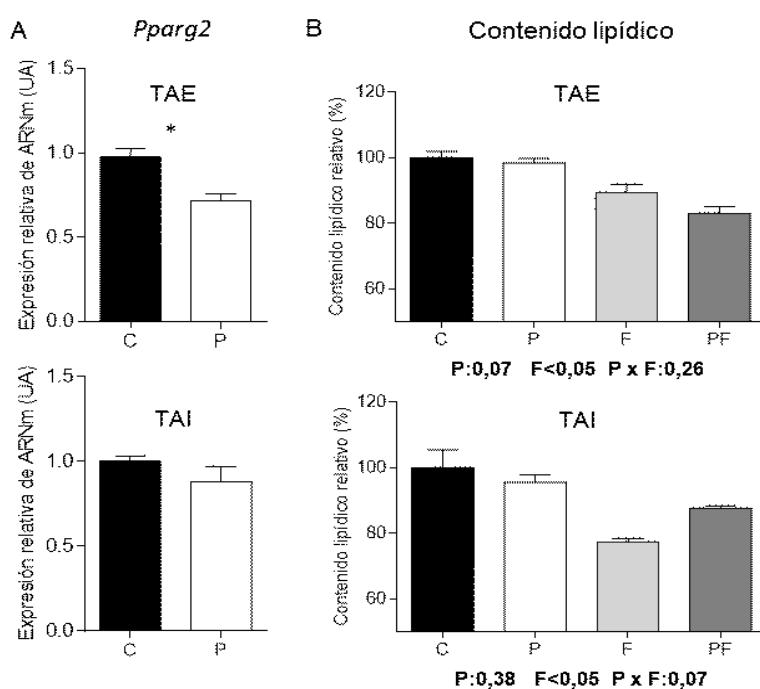


Figura 4: La inhibición de CDK4/6 en adipocitos disminuye la expresión de *Pparg2* y tiende a reducir el contenido lipídico en TAE. **A.** Niveles relativos de ARNm de *Pparg2* en adipocitos diferenciados *in vitro* a partir de la FEV de TAE y TAI tratados a d6 post-diferenciación con DMSO (C) o PD-0332991 1 μ M (P) durante 48 h. (n=4, media \pm EEM). Test-t de Student pareado (*P<0,05). **B.** Contenido lipídico en adipocitos C y P tratados a d8 post-diferenciación con vehículo (C, P) o Forskolina (F, PF). El contenido lipídico se determinó como la absorbancia del colorante Oil Red O internalizado por los adipocitos normalizado por la cantidad de células totales, determinada por la absorbancia del ADN total. Los valores se expresaron en porcentajes relativos al contenido medio del grupo control (n=3, media \pm EEM). Para evaluar el efecto de las variables PD-0332991 (P), Forskolina (F) y su interacción (P x F) utilizamos un ANOVA de dos vías. Las variables se consideraron con efectos significativos cuando P<0,05. El resultado del ANOVA de dos vías se muestra en la parte inferior de los gráficos.

4B). Finalmente, según su función como agente lipolítico, forskolina indujo una disminución significativa de la acumulación lipídica en los adipocitos de ambos tejidos (Fig. 4B). De manera general, los resultados de este experimento sugieren que además de la expresión de marcadores termogénicos, la inhibición de CDK4/6 en adipocitos *beige* de TAE afecta negativamente funciones generales del adipocito. No obstante, en los adipocitos de TAI las mismas no se modifican, al menos con este tiempo de tratamiento.

2. Efecto de la inhibición de CDK4/6 sobre el programa termogénico de adipocitos provenientes de tejido

Para finalizar con el estudio de CDK4/6 en el programa termogénico de los adipocitos, decidimos utilizar un modelo conformado puramente por adipocitos ya que representa de manera más adecuada la conversión directa entre los distintos tipos adipocitarios. Para ello, en esta sección utilizamos adipocitos aislados directamente del tejido y los incubamos *in vitro* con DMSO (C) o PD-0332991 (P) durante 24 h para evaluar posteriormente la expresión de genes característicos del linaje *beige*. De acuerdo con un efecto inhibitorio sobre la termogénesis basal, los resultados mostraron que la incubación con PD-0332991 redujo la expresión de Ucp1 en adipocitos de TAE tanto a nivel del ARNm como proteico (Fig. 5A, C y D). En TAI también hallamos una reducción en la expresión del ARNm de Ucp1 en los adipocitos incubados con PD-0332991 (Fig. 5B), no obstante, los niveles de proteína no se vieron afectados significativamente (Fig. 5E y F). En el resto de los marcadores (*Pgc1a*, *Prdm16*, *Cd137*, *Cox8b*) no evidenciamos diferencias

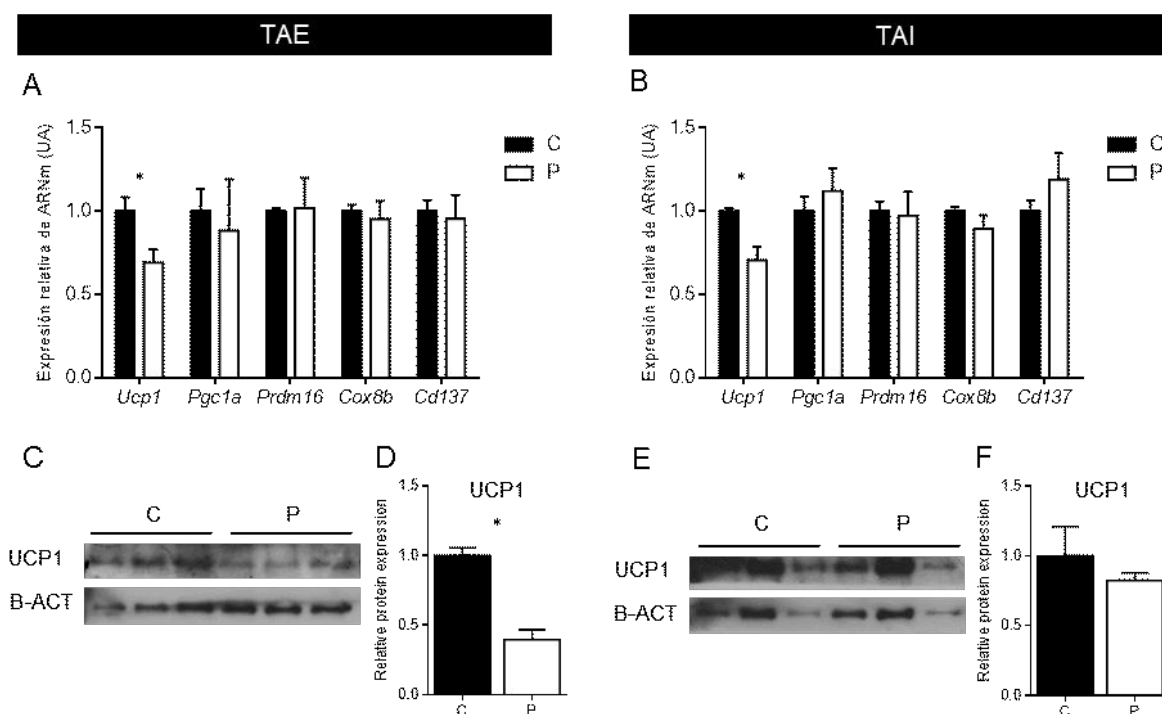


Figura 5: La inhibición de CDK4/6 en adipocitos provenientes de tejido reprime la expresión de Ucp1 en TAE y TAI. Niveles relativos de ARNm de genes termogénicos (*Ucp1*, *Pgc1a*, *Prdm16*), un gen mitocondrial (*Cox8b*) y un gen selectivo del linaje beige (*Cd137*) en adipocitos obtenidos del TAE (A) y TAI (B) de animales control criados y mantenidos a temperatura ambiente incubados *in vitro* durante 24 h con DMSO (C) o PD-0332991 1 μ M (P). (n=4-6, media \pm EEM). Expresión proteica de UCP1 determinada por western blot en adipocitos C y P de TAE (C) y TAI (E). Cuantificación de los niveles de UCP1 relativos a la expresión de β -actina de los grupos C y P en TAE (D) y TAI (F). (n=3, media \pm EEM). Test-t de Student, *P<0,05.

significativas entre el grupo C y P en ninguno de los tejidos, indicando que la incubación con PD-0332991 no afecta su expresión, al menos con este tiempo de incubación. Estos resultados mostraron que la inhibición de CDK4/6 también afecta negativamente la expresión de Ucp1 en adipocitos provenientes del TAB, corroborando un efecto inhibitorio sobre la termogénesis UCP1-dependiente. Además, revelan que la actividad de CDK4/6 podría ser relevante en la regulación de la expresión de Ucp1 *in vivo*, modulando la conversión directa entre los distintos tipos de adipocitos.

Los resultados de este capítulo mostraron que la inhibición de CDK4 y CDK6 en adipocitos de TAE y TAI in vitro tiene un efecto inhibitorio sobre su programa termogénico basal, principalmente sobre la expresión de Ucp1. No obstante, en cultivos de adipocitos diferenciados de TAI el contenido mitocondrial no se modificó, e incluso en TAE aumentó. Adicionalmente, en TAE observamos una desregulación de la funcionalidad adipocitaria. De manera general, en esta sección encontramos que la actividad de CDK4/6 en adipocitos es necesaria para el mantenimiento de la termogénesis mediada por Ucp1.

CAPÍTULO III: Efecto de la inhibición *in vivo* de CDK4/6 sobre la termogénesis basal y el *browning* del TAB

En los capítulos previos, nuestros estudios *in vitro* mostraron que la inhibición de CDK4/6 tiene un efecto inhibitorio sobre la generación de adipocitos termogénicos a partir de CPAs y sobre el programa termogénico de los adipocitos maduros, sugiriendo un posible rol de estas quinasas en la regulación de la termogénesis basal y el *browning* del TA. Esta evaluación inicial *in vitro* nos permitió realizar una primera aproximación a su rol en el *browning*, y no menos importante, demostrar que existirían mecanismos celulares intrínsecos del TA mediando una posible acción de estas quinasas sobre el *browning in vivo*. Basándonos en los hallazgos *in vitro*, en este capítulo nos propusimos estudiar la relevancia fisiológica de la inhibición de la actividad de CDK4/6 sobre la termogénesis basal y el *browning* del TA. Para ello, a ratones macho adultos les administramos vehículo o PD-0332991 a 22°C o 4°C durante 10 días. Así se conformaron 4 grupos experimentales: Control (C), para evaluar los niveles basales de termogénesis del TA; PD-0332991 (P), para evaluar el efecto de la inhibición de CDK4/6 sobre la termogénesis basal del TA; Frío (F), para estimular el *browning* del TA y PD-0332991 + Frío (PF), para evaluar el efecto de la inhibición de CDK4/6 sobre el *browning* del TA.

1. Efecto de la inhibición de CDK4/6 y de la estimulación del *browning in vivo* sobre indicadores del estado metabólico de los animales

En primer lugar, evaluamos parámetros tales como el peso, la ingesta, y metabólicos en los animales experimentales para determinar el efecto del tratamiento con PD-0332991 y de la exposición al frío sobre la homeostasis energética. Los resultados mostraron que el peso corporal cambió significativamente con el tiempo, aunque no fue afectado por la administración de PD-0332991 ni por la exposición al frío (Fig. 1A). En este sentido, observamos una leve disminución del peso durante de la mayor parte del período experimental en todos grupos por igual, lo cual podría ser consecuencia del procedimiento de administración oral. No obstante, durante los últimos dos días de experimentación todos los grupos comenzaron a recuperar el peso. Cuando examinamos el cambio de peso total durante el tratamiento (Fig. 1C), si bien todos los grupos mostraron cambios negativos, no encontramos efecto del frío ni de PD-0332991 en este parámetro. Esto nos llevó a concluir que el peso corporal no cambia durante el período experimental ni por la exposición al frío ni por la inhibición de CDK4/6.

Además, registramos la ingesta calórica diaria (Fig. 1B). El análisis de los resultados mostró que la misma se incrementó significativamente por la exposición al frío en el grupo F a partir del primer día de exposición, y en el PF a partir del segundo día, respecto a la ingesta de sus respectivos controles a temperatura ambiente. Un resultado similar observamos en el consumo calórico total (Fig. 1D), donde el frío indujo un aumento de las calorías respecto al consumo a temperatura ambiente en el grupo F y FP. Por su parte, el tratamiento con PD-0332991 no modificó el consumo calórico diario ni el acumulado. Considerando que la exposición al frío no

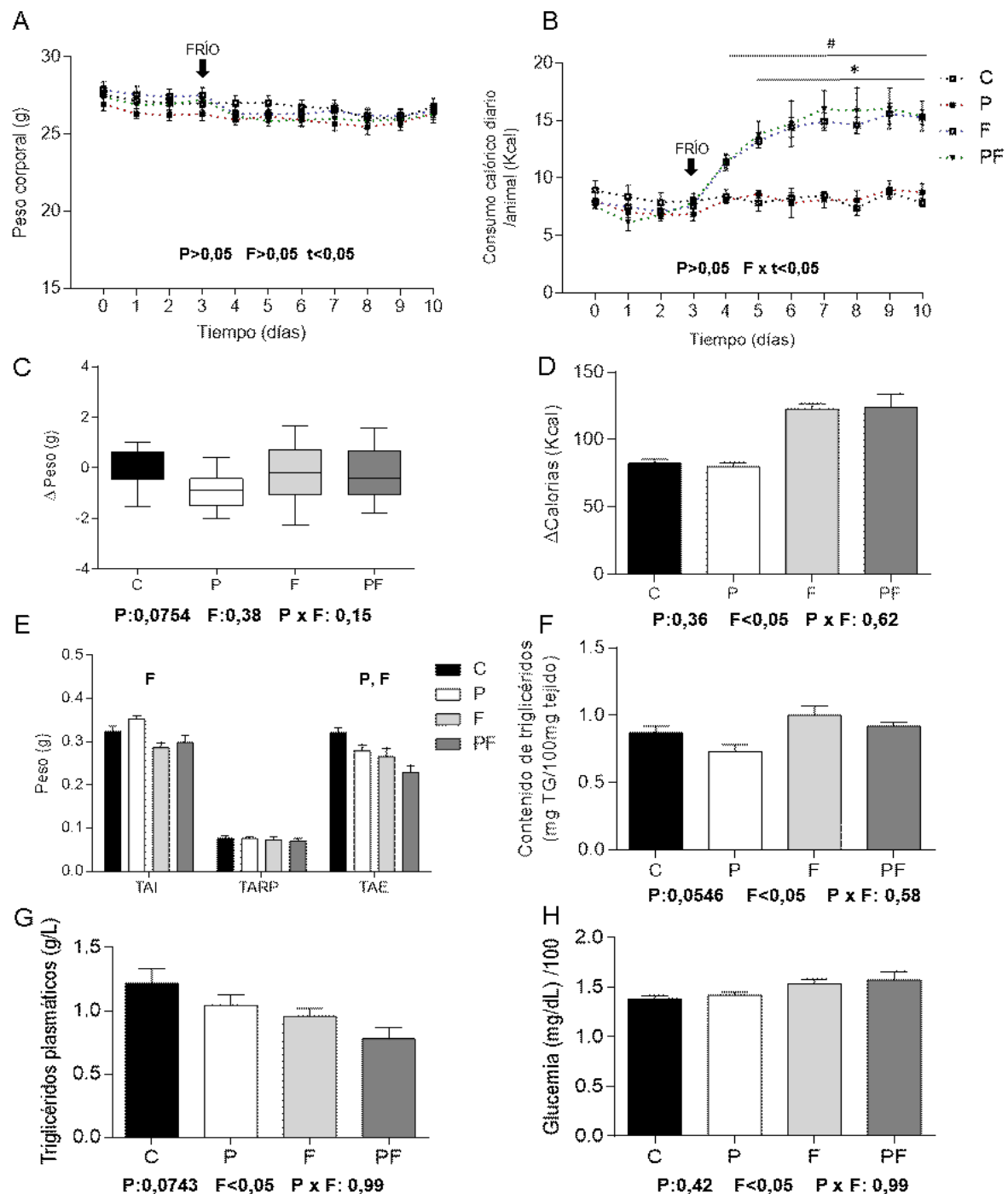


Figura 1: La inhibición de CDK4/6 *in vivo* con PD-0332991 y la estimulación del browning por frío inducen un cambio en la homeostasis energética. **A.** Peso corporal diario, **B.** Consumo calórico diario, **C.** Cambio total en el peso corporal, **D.** Consumo calórico total, **E.** Masa absoluta de distintos depósitos de TAB: TAI, TAE y TARP (TA retroperitoneal), **F.** Contenido de triglicéridos hepático, **G.** Niveles de triglicéridos plasmáticos, y **H.** Niveles de glucosa plasmática en animales tratados con vehículo o PD-0332991 a temperatura ambiente (C, P) o en frío (F, PF). El efecto del tiempo (t), el frío (F) y PD-0332991 (P) en el peso corporal y el consumo calórico diario se evaluaron mediante un ANOVA de dos vías de medidas repetitivas. ($n=6-8$, media \pm EEM) Para ello, inicialmente se evaluó el efecto sólo de dos de las variables independientes, siendo una de ellas siempre el tiempo, y la otra Frío o PD-0332991. De esta forma comparamos en el tiempo los grupos: P vs C, PF vs F, F vs C y PF vs P. Para el peso corporal sólo hallamos efecto del tiempo en todas las comparaciones, y las variables no interaccionaron en ninguna de ellas. Para el consumo calórico, no encontramos efecto de PD-0332991 en ninguna de las comparaciones. En P vs C tampoco hallamos efecto del tiempo. En FP vs F sólo hallamos efecto del tiempo. Finalmente, en F vs C y PF vs P las variables tiempo y frío interaccionaron, por lo tanto, utilizamos el post-test de Holm-Sidak para determinar el efecto del frío en cada punto del tiempo. # $P < 0,05$ para F vs C. * $P < 0,05$ para FP vs P. En los gráficos **C-H** para evaluar el efecto de las variables PD-0332991 (P), Frío (F) y su interacción (P x F) utilizamos un ANOVA de dos vías ($n=6-8$, media \pm EEM). Las variables se consideraron con efectos significativos cuando $P < 0,05$. En ninguno de los parámetros hallamos interacción entre las mismas. El resultado del ANOVA de dos vías se muestra en la parte inferior de los gráficos. En las masas de los depósitos de TAB se muestran dentro del gráfico las variables significativas para cada uno.

influyó el peso corporal, este resultado sería indicativo de un aumento en el gasto energético de los animales aproximadamente al doble del valor registrado a temperatura ambiente. Este hecho está de acuerdo con una activación de los mecanismos de mantenimiento de la temperatura corporal, incluida la termogénesis.

Al examinar las masas de distintos depósitos de TAB (Fig. 1E) para evaluar la movilización de reservas lipídicas, observamos que el frío redujo la masa absoluta y porcentual (no mostrado) de TAI y TAE, pero no modificó la de TARP. Por otro lado, el tratamiento con PD-0332991 provocó la disminución de la masa de TAE, pero no afectó la de los demás depósitos.

Cuando estudiamos los niveles de triglicéridos plasmáticos (Fig. 1G), en los animales expuestos a frío observamos una reducción significativa respecto a los mantenidos a temperatura ambiente. Esto podría indicar una mayor importación de triglicéridos desde el torrente sanguíneo para suplir el aumento del gasto energético observado en frío. Asimismo, encontramos una tendencia a que los niveles de triglicéridos también sean menores en los animales tratados con PD-0332991. De manera sorprendente, al evaluar la acumulación de triglicéridos hepática (Fig. 1F), observamos que el frío indujo un aumento significativo. Al igual que observamos en plasma, el contenido de triglicéridos en hígado se redujo ante el tratamiento con PD-0332991.

Por último, encontramos que los niveles de glucosa en plasma (Fig. 1H) aumentaron en los animales expuestos al frío respecto a los mantenidos a temperatura ambiente, pero no se modificaron en los tratados con PD-0332991 respecto a los que se les administró vehículo.

En conjunto, estos resultados comprobaron el aumento en el gasto energético descrito para los animales sometidos a un estrés térmico, y sugirieron una función de CDK4/6 en la homeostasis energética del organismo ya que su inhibición redujo el contenido de triglicéridos en hígado, los niveles plasmáticos, y la masa de TAE.

2. Efecto de la inhibición de CDK4/6 *in vivo* sobre la termogénesis basal y el *browning* del TAB

2.1 Efecto de la inhibición de CDK4/6 en la fosforilación de RB en el TAB

Previo a la evaluación de la expresión de marcadores termogénicos, nos propusimos verificar el funcionamiento de PD-0332991 como inhibidor de CDK4/6 en el TA en nuestras condiciones experimentales. Para ello, estudiamos la fosforilación de RB en los depósitos de TAB de animales tratados con vehículo o PD-0332991 a temperatura ambiente (Fig. 2). El análisis de los resultados mostró que la administración 50 mg/Kg diarios de PD-0332991 durante 10 días reduce significativamente la fosforilación de RB en los residuos de serina 807 y 811 en TAE y en TAI. Mediante este experimento, no solo comprobamos el funcionamiento de PD-0332991 como inhibidor de CDK4/6 *in vivo*, sino que también evidenciamos su acción en los dos depósitos estudiados en esta tesis. Estas observaciones nos permitieron concluir que PD-0332991 alcanza los depósitos de TAE y TAI con actividad farmacológica luego de su administración oral, y disminuye la actividad de la vía clásica de CDK4/6.

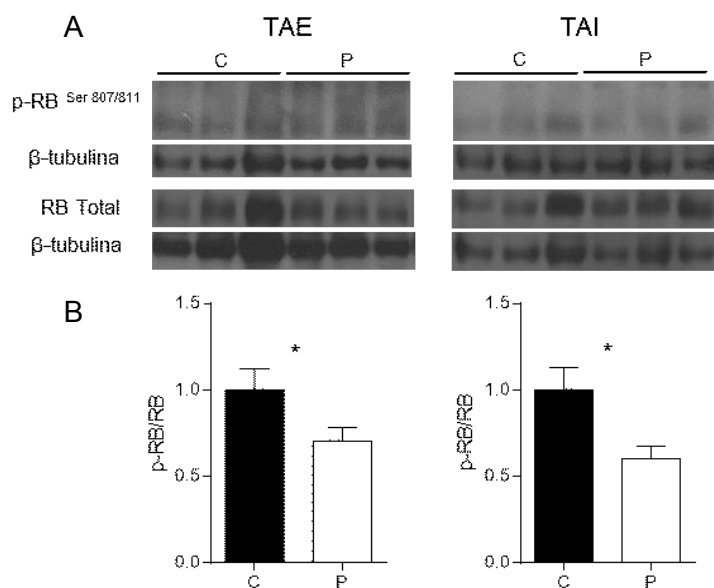


Figura 2: La administración del inhibidor de CDK4/6 *in vivo* reduce la fosforilación de RB en TAE y TAI. **A.** Análisis por western blot de los niveles proteicos de RB total, p-RB^{Ser 807/811} y β-tubulina en lisado total de proteínas de TAE y TAI de animales tratados *in vivo* con vehículo (C) o PD-0332991 (P) a temperatura ambiente. **B.** Cuantificación de los niveles de fosforilación de RB en los residuos de Serina 807/811 respecto a la expresión total de RB (p-RB/RB). En primer lugar, los niveles de p-Rb y RB se normalizaron respecto a la expresión de su correspondiente β-tubulina debido a que se corrieron en geles distintos, y luego se calculó el cociente entre ellos (p-RB/RB). (n=3-4, media ± EEM). Test-t de Student no pareado, *P<0,05.

2.2 Efecto de la inhibición de CDK4/6 en la expresión de marcadores termogénicos a nivel del ARNm

Seguidamente nos dispusimos a evaluar la expresión a nivel ARNm de marcadores termogénicos (*Ucp1*, *Pgc1a*, *Prdm16*) y mitocondriales (*Cox8b*) para investigar específicamente el efecto de la inhibición de CDK4/6 sobre la termogénesis basal y la capacidad de *browning* del TAB de los animales tratados *in vivo* (Fig. 3. 1). Coincidentemente con su función como estimulante de las vías adrenérgicas, el frío indujo un incremento en la expresión de todos los marcadores termogénicos y mitocondriales en ambos depósitos, a excepción de *Pgc1a* en TAE (Fig. 3.1 A-D). Además, de acuerdo con la mayor sensibilidad de los depósitos subcutáneos al *browning*, observamos una estimulación más pronunciada en la expresión de los marcadores de termogénesis (*Ucp1*, *Pgc1a*, *Cox8b*) en TAI que en TAE respecto a sus niveles basales (ANOVA de dos vías. Variables: depósito y frío). En este sentido, encontramos que en TAI la expresión de *Ucp1* aumentó aproximadamente unas 400 veces respecto a sus niveles a temperatura ambiente, mientras que en TAE, el aumento observado fue sólo de 4 veces (Fig. 3.1A). Un resultado similar observamos en la expresión de *Pgc1a* y *Cox8b*, aunque las diferencias en la inducción entre ambos tejidos fueron menores para estos marcadores (~3 veces) (Fig. 3.1B y D). De manera interesante, *Prdm16* fue el único marcador que incrementó su expresión en la misma proporción en TAE y TAI (Fig. 3.1C). Estos resultados indicaron un proceso de *browning* activo tanto en TAI como en TAE luego 7 días de exposición al frío, y evidenciaron una menor respuesta a la estimulación adrenérgica de los depósitos abdominales respecto a los subcutáneos.

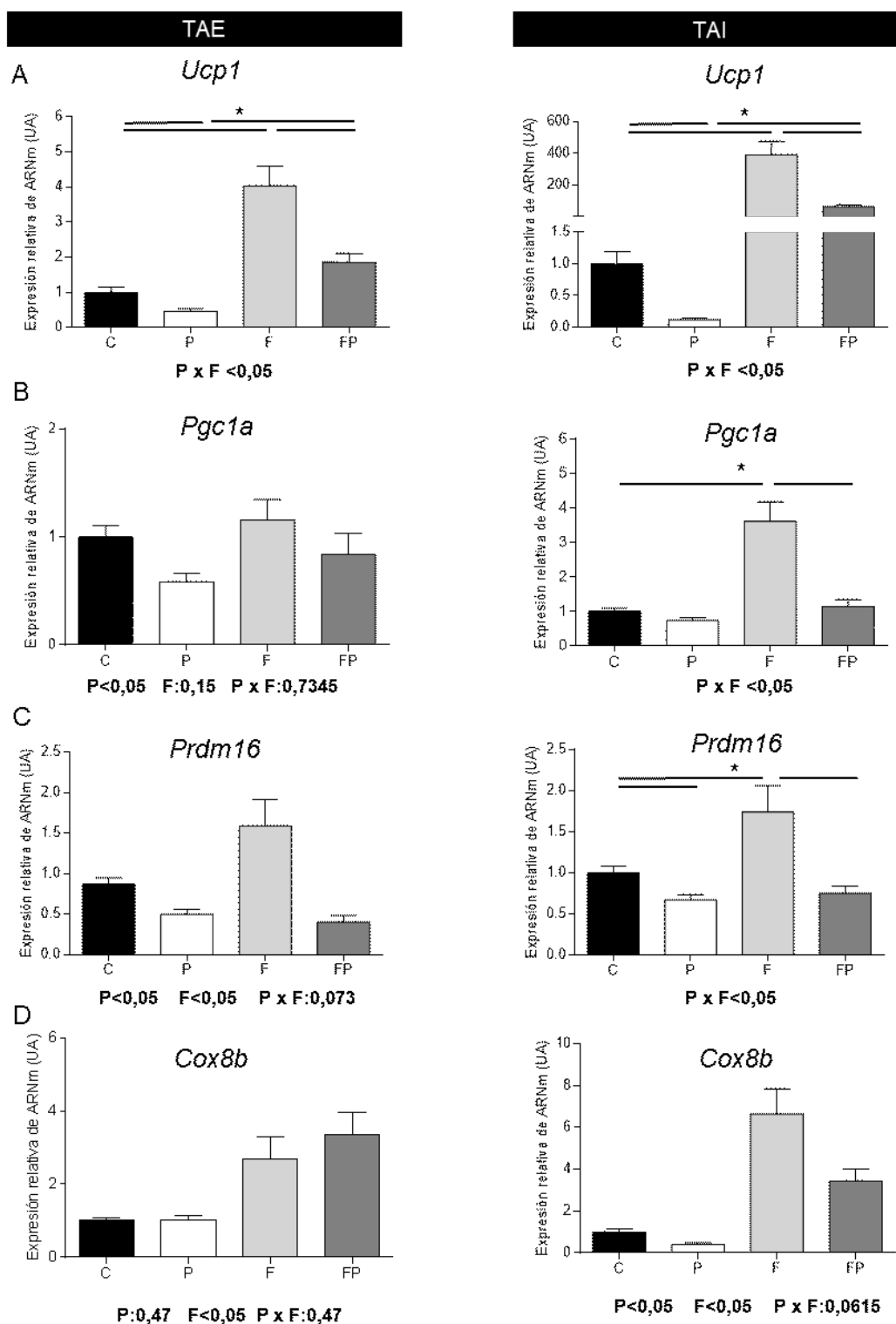


Figura 3.1: La inhibición farmacológica de CDK4/6 *in vivo* inhibe el programa termogénico de TAE y TAI basalmente, y el aumento en su capacidad termogénica inducida por un estímulo de browning. **A-D** Niveles relativos de ARNm de genes termogénicos (*Ucp1*, *Pgc1a*, *Prdm16*) y un gen mitocondrial (*Cox8b*) en TAE y TAI de animales tratados *in vivo* con vehículo o PD-0332991 a temperatura ambiente (C, P) o en frío (F y FP). En cada tejido los niveles de expresión se refirieron al grupo C, considerando la relación entre el gen específico y β -actina en este grupo como 1. ($n=5-8$, media \pm EEM). Para evaluar el efecto de las variables PD-0332991 (P), Frío (F) y su interacción (P x F) en la expresión de cada gen utilizamos un ANOVA de dos vías. Las variables se consideraron con efectos significativos cuando $P < 0,05$. Cuando hallamos interacción entre las mismas ($P \times F < 0,05$), comparamos los grupos (P vs C, F vs C, PF vs P y PF vs F) mediante test-t de Student corregidos por múltiples comparaciones por el método de Holm-Sidak (* $P < 0,05$ para la familia de comparaciones) para determinar el efecto de PD-0332991 y Frío. El resultado del ANOVA de dos vías se muestra en la parte inferior de los gráficos. Cuando la interacción fue significativa no se muestra el resultado de las variables P y F.

Adicionalmente, para determinar el aporte relativo de cada depósito a la termogénesis UCP1-dependiente basal y estimulada, comparamos los niveles de expresión a temperatura ambiente y luego de la exposición al frío entre TAE y TAI sólo en los animales tratados con vehículo (Fig. 3.2). El análisis de los resultados mostró que, además de una mayor respuesta termogénica a la estimulación adrenérgica, TAI expresa mayores niveles de *Ucp1*, *Pgc1a*, *Prdm16* y *Cox8b* que TAE, tanto a temperatura ambiente como en frío. Incluso, la expresión inducida por la exposición al frío de todos los marcadores termogénicos en TAE, resultó menor que la expresión de los mismos en TAI a temperatura ambiente. Estos hallazgos indicaron una mayor contribución de TAI a la termogénesis UCP1-dependiente en condiciones basales y durante el *browning* inducido por frío.

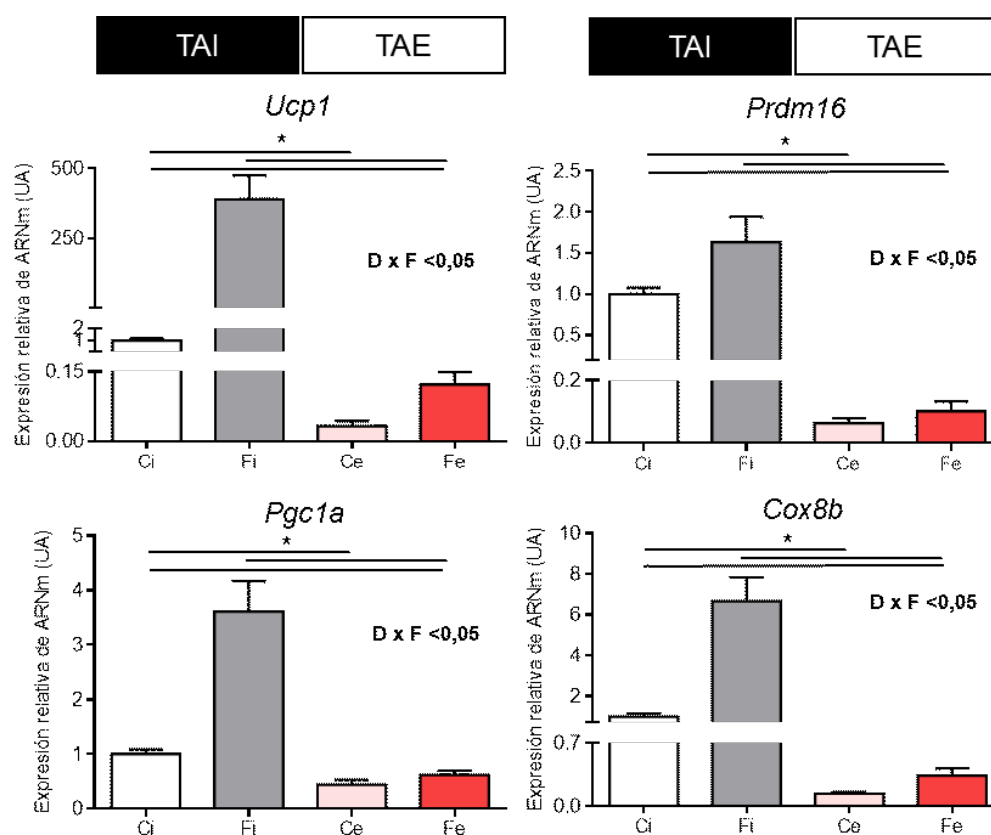


Figura 3.2: TAE expresa niveles menores de genes termogénicos que TAI basalmente, y ante un estímulo de *browning*. Niveles relativos de ARNm de genes termogénicos (*Ucp1*, *Pgc1a*, *Prdm16*) y un gen mitocondrial (*Cox8b*) en TAE(e) y TAI(i) de animales tratados *in vivo* con vehículo a temperatura ambiente (C) o en frío (F). Los niveles de expresión se refirieron al grupo Ci de TAI, considerando la relación entre el gen específico y β -actina en este grupo como 1. (n=5-8, media \pm EEM). Para evaluar el efecto de las variables depósito (D), Frío (F) y su interacción (D x F) en la expresión de cada gen utilizamos un ANOVA de dos vías. Las variables se consideraron con efectos significativos cuando $P < 0,05$. Cuando hallamos interacción entre las mismas (D x F < 0,05), comparamos los grupos (Ce vs Ci, Fe vs Fi y Ci vs Fe) mediante test-t de Student corregidos por múltiples comparaciones por el método de Holm-Sidak (* $P < 0,05$ para la familia de comparaciones) para determinar el efecto de la temperatura entre depósitos. El resultado del ANOVA de dos vías se muestra en el vértice superior derecho de los gráficos. La interacción fue significativa para todos los genes por lo que no se muestra el resultado de las variables D y F individualmente.

Luego de haber comprobado la activación del *browning* en ambos depósitos de TAB y su respuesta diferencial a la estimulación adrenérgica, evaluamos el efecto de PD-0332991 en el perfil de expresión de marcadores termogénicos (Fig. 3.1). En TAE observamos una inhibición de la expresión basal y de la estimulación inducida por frío de *Ucp1* y *Prdm16*. Por su parte, la

expresión de *Pgc1a*, que no fue estimulada por frío, se redujo a niveles similares ante el tratamiento con PD-0332991 a temperatura ambiente y en frío. A diferencia de los marcadores anteriores, la expresión de *Cox8b* en TAE no se vio afectada por la administración de PD-0332991. Cuando examinamos el efecto sobre el perfil termogénico en TAI, coincidentemente con la inhibición hallada en TAE, observamos que la expresión de *Ucp1*, *Prdm16* y *Cox8b* disminuyó ante el tratamiento con PD-0332991 tanto a temperatura ambiente como en frío respecto a la de sus respectivos controles. Para *Pgc1a*, si bien PD-0332991 no modificó su expresión basal, inhibió su estimulación por frío. Con base en estos resultados concluimos que a nivel del ARNm la inhibición de CDK4/6 *in vivo* tiene un efecto inhibitorio sobre la termogénesis basal de TAE y TAI, y más interesante aún, inhibe la estimulación de la termogénesis inducida por frío, sugiriendo un efecto inhibitorio sobre el *browning* del TAB.

2.3 Efecto de la inhibición de CDK4/6 en la expresión proteica de UCP1

Complementariamente a los análisis de expresión génica del programa termogénico, evaluamos la expresión a nivel proteico de UCP1 como proteína funcional de la termogénesis. En primera instancia, realizamos una inmunohistoquímica en secciones de TAE y TAI de los animales tratados *in vivo* (C, P, F, PF) (Fig. 4A). Las imágenes microscópicas mostraron que en animales tratados con vehículo a temperatura ambiente (C), ambos depósitos están conformados principalmente por adipocitos uniloculares, de los cuales sólo algunos son positivos para UCP1, localizándose la señal principalmente en la periferia de la célula. Tanto en TAE como en TAI, la exposición al frío indujo un aumento en la señal positiva de UCP1 conjuntamente con la aparición de adipocitos multiloculares, dos características indicativas de la activación del *browning*. En el tejido de animales expuestos a frío, la señal de UCP1 se localizó predominantemente alrededor de las múltiples vacuolas lipídicas en los adipocitos multiloculares, pero también observamos un aumento de la señal periférica en los adipocitos uniloculares. Si bien el *browning* se estimuló en ambos depósitos, de acuerdo con la mayor sensibilidad descrita para los depósitos subcutáneos, la inducción en TAI fue mucho mayor que en TAE, como puede notarse tanto por la cantidad de señal positiva para UCP1 como de adipocitos multiloculares. Por otra parte, al evaluar el efecto de la inhibición de CDK4/6, observamos que en ambos depósitos el tratamiento con PD-0332991 disminuyó la marca de UCP1 en los adipocitos a temperatura ambiente, e inhibió el aumento de expresión inducido por la exposición al frío. De manera interesante y en concordancia con una inhibición del *browning*, en frío la disminución de UCP1 en los animales tratados con PD-0332991 estuvo acompañada por una represión de la aparición de adipocitos multiloculares.

A continuación, para cuantificar las diferencias en la expresión proteica de UCP1, llevamos a cabo un western blot de lisado de proteína total de TAE y TAI (Fig. 4B-C). De acuerdo con la inducción del *browning*, en ambos depósitos la expresión de UCP1 se incrementó por la exposición al frío. Al igual que observamos a nivel génico, la respuesta fue mayor en TAI que en

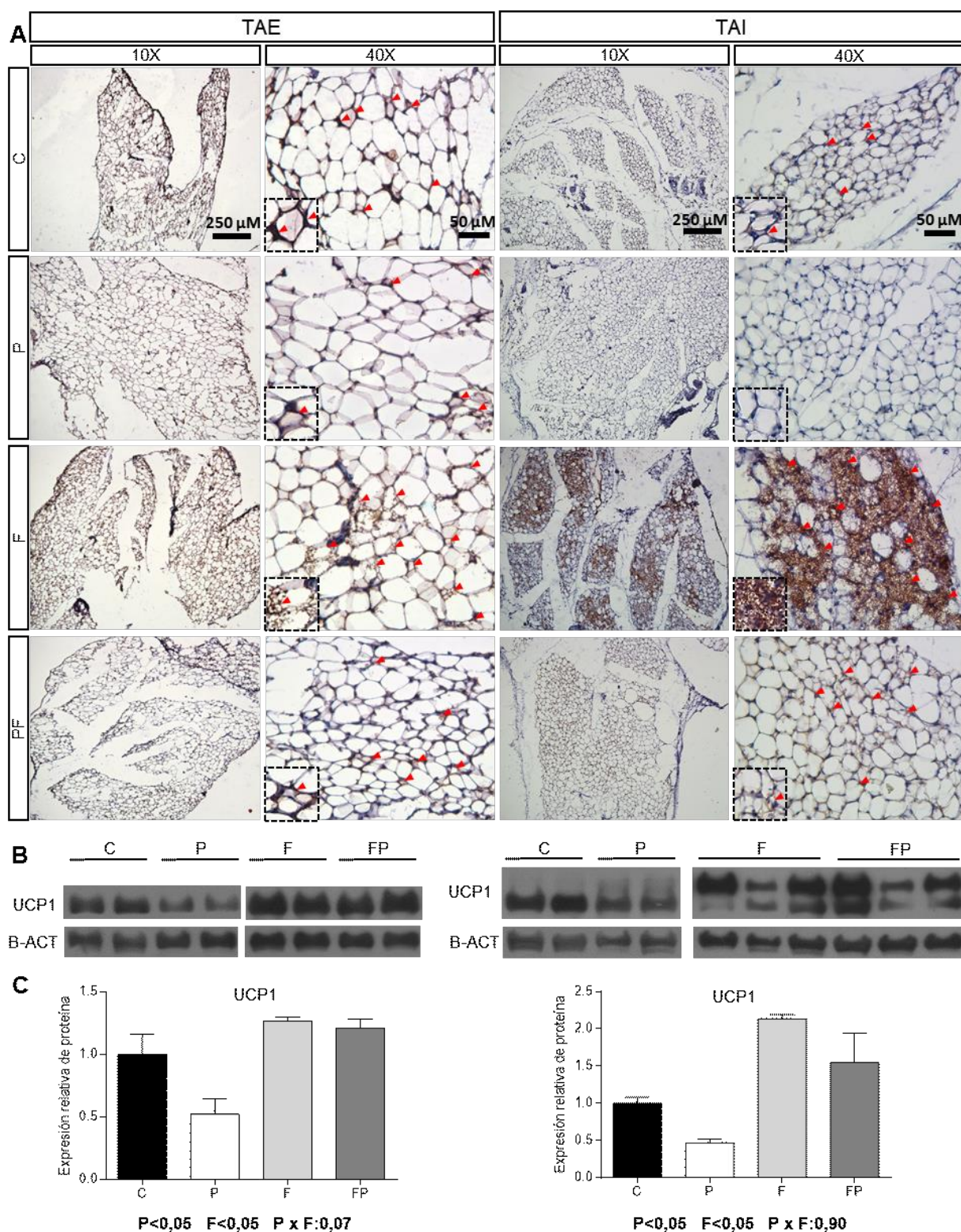


Figura 4: La inhibición de CDK4/6 *in vivo* reduce la expresión proteica basal de Ucp1 y la estimulación inducida por la exposición al frío. **A.** Imágenes microscópicas representativas de secciones de TAE y TAI de animales tratados *in vivo* con vehículo o PD-0332991 a temperatura ambiente (C, P) o en frío (F y FP) inmunomarcadas con UCP1 (zonas marrones) y teñidas con hematoxilina para la observación de los núcleos (azules). Aumento: 10X y 40X. **B.** Análisis por western blot de los niveles proteicos de UCP1 y β -actina en lisado total de proteínas de TAE y TAI de animales (C, P, F, PF). **C.** Cuantificación de los niveles de expresión de UCP1 normalizados por la expresión de β -actina y expresados relativos a los niveles del grupo C en cada tejido. (n=4-6, media \pm EEM). Para evaluar el efecto de las variables PD-0332991 (P), Frío (F) y su interacción (P x F) en la expresión de UCP1 utilizamos un ANOVA de dos vías. Las variables se consideraron con efectos significativos cuando $P < 0,05$. Cuando hallamos interacción entre las mismas ($P \times F < 0,05$), comparamos los grupos (P vs C, F vs C, PF vs P y PF vs F) con test-t de Student corregidos por múltiples comparaciones por el método de Holm-Sidak (* $P < 0,05$ para la familia de comparaciones) para determinar el efecto de PD-0332991 y Frío. El resultado del ANOVA de dos vías se muestra en la parte inferior de los gráficos.

TAE (Fig. 4C); en TAI observamos una estimulación aproximadamente al doble de los niveles basales, mientras que en TAE la misma fue sólo del 30%, mostrando nuevamente la respuesta diferencial de los depósitos a la estimulación adrenérgica. Finalmente, cuando evaluamos la influencia de la inhibición de CDK4/6, observamos que el tratamiento con PD-0332991 disminuyó la expresión de UCP1 a temperatura ambiente y en frío en ambos depósitos. Estos resultados apoyan nuestras observaciones a nivel génico, y muestran que la inhibición de CDK4/6 *in vivo* también afecta negativamente la expresión de UCP1 a nivel proteico basalmente, y durante la estimulación del *browning* en ambos depósitos de TA, sugiriendo una menor funcionalidad del proceso termogénico.

En conjunto, los resultados de expresión génica y proteica evidenciaron la activación del *browning* en ambos depósitos de TA por la exposición al frío, y mostraron un evidente efecto inhibitorio de la inhibición de CDK4/6 sobre la termogénesis UCP1-dependiente basal del tejido, así como también de la estimulada durante el *browning*.

3. Efecto de la inhibición de CDK4/6 *in vivo* sobre la capacidad de la FEV del TAB de generar adipocitos *beige*

Hasta acá observamos que el efecto sobre la adipogénesis *beige* y el programa termogénico de los adipocitos ante el tratamiento con PD-0332991 *in vitro* se correspondía con el mismo efecto inhibitorio en el TA *in vivo*. Esto sugirió una implicancia de ambos procesos en la respuesta del tejido a la inhibición de CDK4/6. Por lo tanto, en esta sección nos propusimos investigar la posible contribución de la generación de adipocitos *beige* por adipogénesis a la inhibición de la termogénesis del TAB *in vivo*.

3.1 Efecto de la inhibición de CDK4/6 y de la exposición al frío sobre el número de CPAs *beige* de la FEV

Inicialmente evaluamos si la inhibición de CDK4/6 *in vivo* modificaba la población de CPAs *beige* en la FEV del TAB. Para ello, analizamos por citometría de flujo las FEVs de TAE y TAI de animales tratados *in vivo* con vehículo o PD-0332991 a temperatura ambiente (C, P) o en frío (F, FP). Para identificar la población de CPAs *beige* utilizamos la doble marcación PDGFR α ⁺; EBF2⁺⁸⁴. En el TA, PDGFR α es un marcador de células multipotentes capaces de diferenciarse a adipocitos *beige* o blancos según el estímulo al que son expuestas³¹. Por su parte, EBF2 es un factor de transcripción que regula positivamente la expresión de genes termogénicos tanto en adipocitos marrones como *beige*. En la FEV del TA, se ha observado que EBF2 enriquece la población PDGFR α ⁺ en CPAs que generan adipocitos con elevada capacidad termogénica cuando se diferencian⁸⁴. Para el análisis de las poblaciones celulares la estrategia de *gating* consistió en identificar dentro de la FEV las regiones en el gráfico SSC-H vs FSC-H donde pueden ubicarse las CPAs según tamaño/volumen y complejidad. Para delimitar dicha población eliminamos gráficamente los debris, las posibles células muertas, los dobletes, y los linfocitos. A la población resultante la denominamos FEVr, porque es una fracción reducida de la FEV

completa. Además de las CPAs, la FEVr comprende células endoteliales y macrófagos, entre otros tipos celulares (Fig. 5.1 A). Para delimitar las células $\text{PDGFR}\alpha^+$ utilizamos un gráfico de un fotomultiplicador (FL) donde no se detecta ninguno de los fluoróforos utilizados en esta marcación, en función del FL que detecta la fluorescencia de $\text{PDGFR}\alpha$ (FL1-H vs FL3-H) (Fig. 5.1 B). Se procedió de esta forma ya que en la FEV del TA la auto-fluorescencia forma una diagonal que dificulta la detección de las poblaciones positivas. El uso de un FL vacío (sin marca) favorece la separación de las poblaciones del FL con marca. El análisis de la población EBF2^+ lo realizamos mediante un gráfico de FSC en función de la fluorescencia para EBF2 (FSC-H vs FL4-H) (Fig. 5.1 C). Entonces, para identificar las CPAs *beige* seleccionamos la población $\text{PDGFR}\alpha^+$ en FEVr, y a partir de ésta evaluamos las EBF2^+ (Fig. 5.1 A-C). Para la delimitación de las poblaciones positivas en cada depósito utilizamos controles negativos (pool de FEVs de los cuatro grupos no marcadas) y controles de marca positiva de cada uno de los dos anticuerpos utilizados (pool de FEVs de los 4 grupos marcados con $\text{PDGFR}\alpha$ o EBF2).

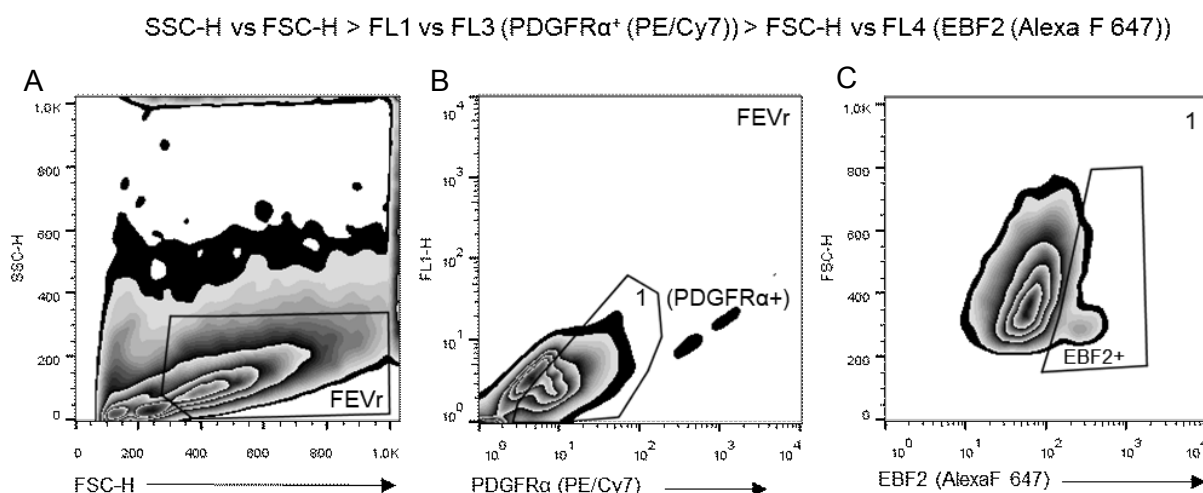


Figura 5. 1: Estrategia de delimitación de las poblaciones de CPAs beige en la FEV de TAE y TAI. Gráficos representativos del análisis de las poblaciones por citometría de flujo. **A.** Primero en la FEV completa del TA se identificó la región donde se localizan las CPAs según su tamaño/volumen y complejidad (SSC-H vs FSC-H; FEVr). Dentro de esa población se identificó a la población $\text{PDGFR}\alpha^+$ (FL1 vs FL3 ($\text{PDGFR}\alpha^+$ (PE/Cy7))). Finalmente, dentro de las $\text{PDGFR}\alpha^+$ se seleccionaron las EBF2^+ (FSC-H vs FL4 (Ebf2 (AlexaF 647))). En la parte superior del gráfico se encuentra el resumen de la estrategia utilizada en orden secuencial.

El análisis de los resultados mostró que la población $\text{PDGFR}\alpha^+$ en ambos depósitos representa aproximadamente un 50% de la FEVr y no se modifica por la administración de PD-0332991, ni por la exposición al frío (Fig. 5.3 A), indicando que ninguno de estos factores afecta la población de células multipotentes en la FEV de TAE y TAI. Seguidamente, analizamos la población de precursores *beige*; es decir las células que co-expresan $\text{PDGFR}\alpha^+$ y EBF2^+ (Fig. 5.2 y 5.3B). Los resultados mostraron que la población de células $\text{PDGFR}\alpha^+$; EBF2^+ en la FEV de TAE y TAI se redujo significativamente por el tratamiento con PD-0332991 tanto a temperatura ambiente como en frío, indicando una reducción en la abundancia de precursores *beige*. Sorpresivamente, observamos que la población $\text{PDGFR}\alpha^+$; EBF2^+ también disminuyó por la exposición al frío en ambos depósitos. De manera interesante, nuestros resultados mostraron que basalmente (grupo

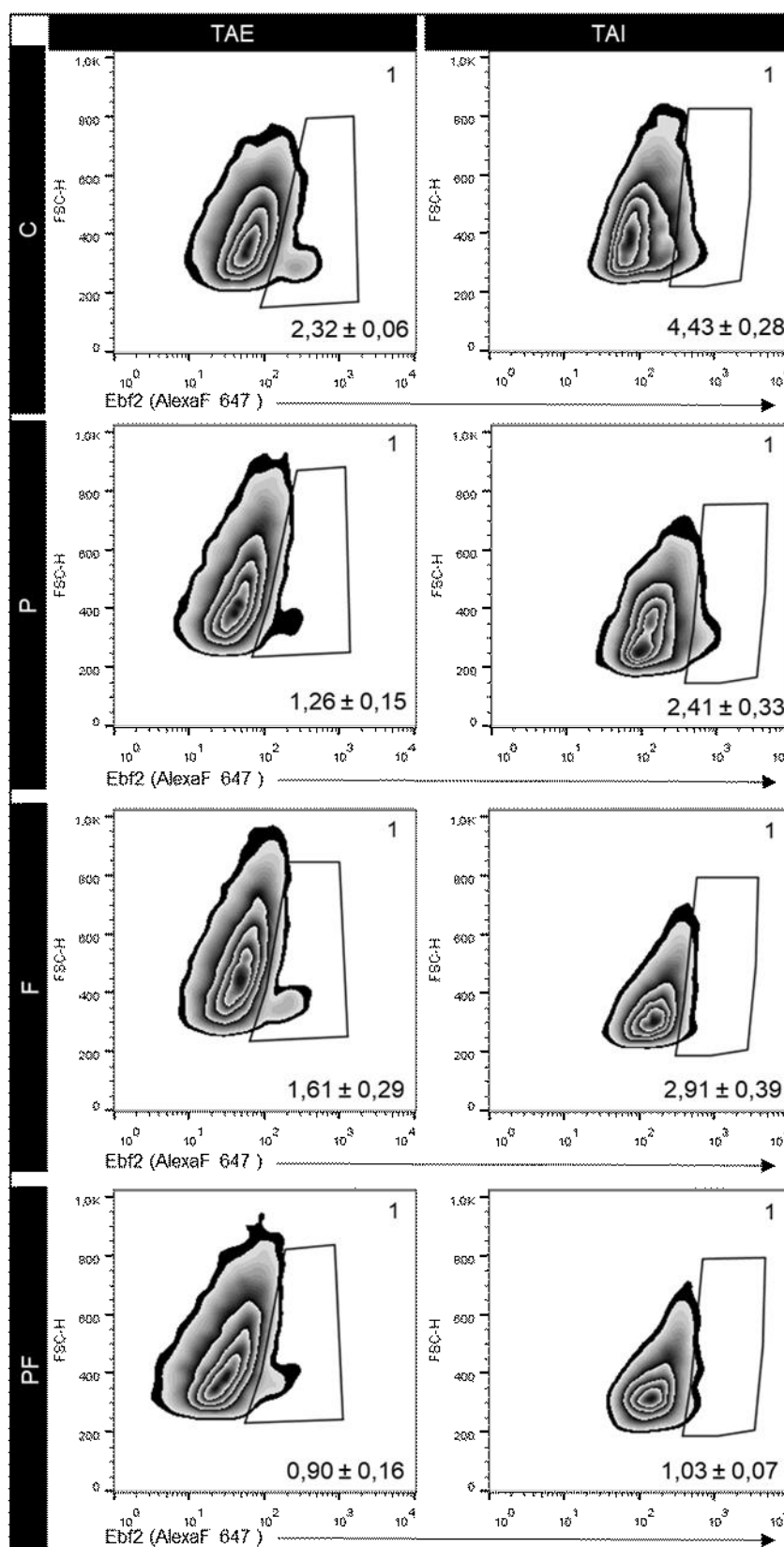


Figura 5. 2: La inhibición de CDK4/6 *in vivo* con PD-0332991 y la estimulación del browning con frío reducen la población de precursores beige en la FEV del TA. Gráficos representativos del análisis por citometría de flujo de la población de precursores beige (PDGFR α^+ ; EBF2 $^+$) en la FEV de TAE y TAI de animales tratados *in vivo* con vehículo o PD-0332991 a temperatura ambiente (C, P) o en frío (F, PF). La región delimitada representa la marca positiva para EBF2 dentro de la población PDGFR α^+ . En el vértice inferior derecho de los gráficos se indica el porcentaje de células PDGFR α^+ ; EBF2 $^+$ respecto del total de células en el gate FEVr. Media \pm EEM (n=5-6 experimentos independientes).

C) el porcentaje de células PDGFR α ⁺; EBF2⁺ es mayor en la FEV de TAI que en la de TAE. Este dato sería indicativo de un mayor pool de CPAs *beige* en TAI respecto a TAE capaz de generar adipocitos *beige* ante un estímulo adipogénico. En conjunto, los hallazgos de este apartado revelaron que tanto la inhibición de CDK4/6 como la exposición al frío reducen la población de CPAs *beige* en la FEV de TAE y TAI.

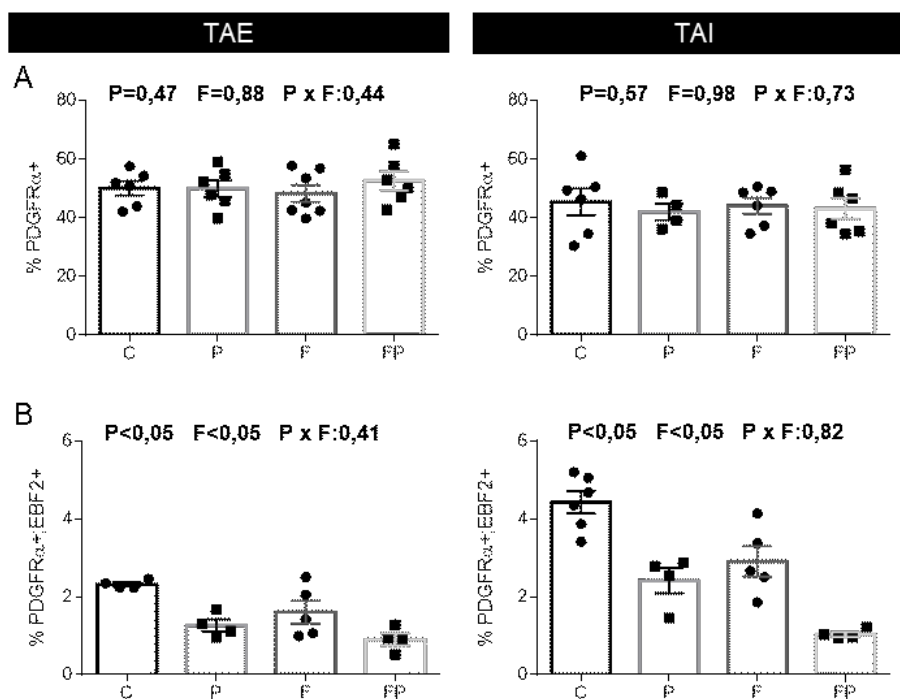


Figura 5. 3: La inhibición de CDK4/6 *in vivo* y la estimulación del browning reducen la población de precursores beige en la FEV del TAB. Cuantificación de las poblaciones identificadas en el análisis por citometría de flujo de la FEV de TAE y TAI de animales tratados *in vivo* con vehículo o PD-0332991 a temperatura ambiente (C, P) o en frío (F, PF). **A.** Porcentaje de células PDGFR α ⁺ en la FEVr. **B.** Porcentaje de CPAs beige (PDGFR α ⁺; EBF2⁺) en la FEVr. (n=5-6, media \pm EEM). Para evaluar el efecto de las variables PD-0332991 (P), Frío (F) y su interacción (P x F) en la abundancia de las distintas poblaciones utilizamos un ANOVA de dos vías. Las variables se consideraron con efectos significativos cuando $P < 0,05$. No hallamos interacción entre las mismas en ningún caso. El resultado del ANOVA de dos vías se muestra en la parte superior de los gráficos.

3.2 Efecto de la inhibición de CDK4/6 *in vivo* sobre la capacidad de la FEV de generar adipocitos beige *in vitro*

Finalmente, nos propusimos estudiar si esta disminución en el pool de CPAs *beige* en la FEV del TAB inducida por la inhibición de CDK4/6 *in vivo*, afectaba su capacidad de generar adipocitos *beige in vitro*. Para ello, diferenciamos las FEVs de TAE y TAI de animales tratados *in vivo* con vehículo (C) o PD-0332991 (P) a temperatura ambiente y determinamos la expresión génica de marcadores termogénicos en los adipocitos. Además, evaluamos su respuesta termogénica a la estimulación adrenérgica (Fig. 6.1). Los resultados mostraron que forskolina estimuló la expresión de todos los marcadores de termogénesis (*Ucp1*, *Pgc1a*, *Prdm16*) en TAI, y de *Ucp1* y *Pgc1a* en TAE. Para *Prdm16* en TAE no hallamos estimulación. Contrariamente a lo observado en el tejido ante la exposición al frío, los adipocitos de TAE respondieron más al estímulo de forskolina que los de TAI, observándose una mayor cantidad de veces de aumento de la expresión de *Ucp1* y *Pgc1a* en relación a las veces de aumento en TAI. Este hecho también lo

observamos en experimentos de capítulos previos, y plantea que podría existir una diferencia en el estímulo adrenérgico fisiológico inducido por la exposición al frío, y el promovido por la aplicación de forskolina *in vitro*.

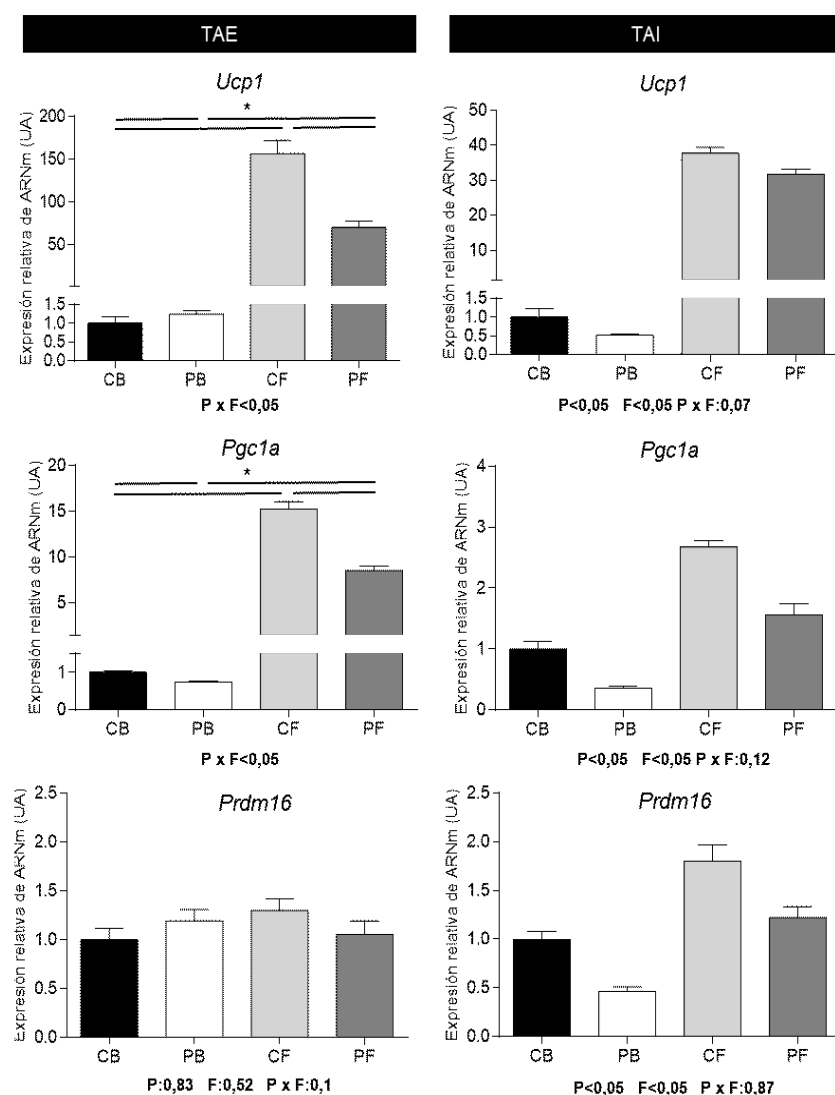
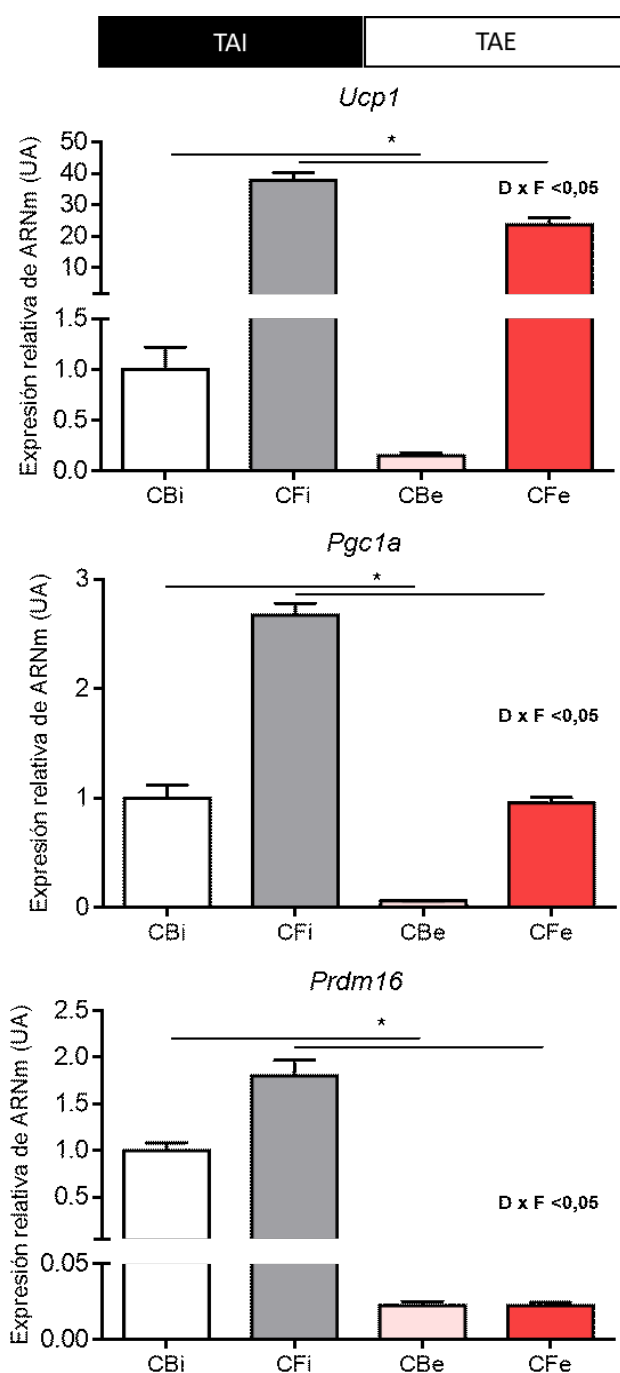


Figura 6.1: La FEV de animales donde se inhibió CDK4/6 *in vivo* se diferencia *in vitro* a adipocitos con menor capacidad termogénica. Niveles relativos de ARNm de genes termogénicos (*Ucp1*, *Pgc1a*, *Prdm16*) en adipocitos diferenciados de FEV de TAE y TAI de animales tratados *in vivo* con vehículo o PD-0332991 a temperatura ambiente (C, P). Los adipocitos se trataron a d8 postdiferenciación con vehículo (CB, PB) o forskolina (CF, PF) para estimular la termogénesis. En cada tejido los niveles de expresión se refirieron al grupo CB, considerando la relación entre el gen específico y β -actina en este grupo como 1. (n=3, media \pm EEM). Para evaluar el efecto de las variables de las variables PD-0332991 (P), Forskolina (F) y su interacción (P x F) en la expresión de cada gen utilizamos un ANOVA de dos vías. Las variables se consideraron con efectos significativos cuando $P < 0,05$. Cuando hallamos interacción entre las mismas ($P \times F < 0,05$), comparamos los grupos (P vs C, F vs C, PF vs P y PF vs F) mediante test-t de Student corregidos por múltiples comparaciones por el método de Holm-Sidak (* $P < 0,05$ para la familia de comparaciones) para determinar el efecto de PD-0332991 y Frío. El resultado del ANOVA de dos vías se muestra en la parte inferior de los gráficos. Cuando la interacción fue significativa no se muestra el resultado de las variables P y F.

Al investigar el efecto del tratamiento *in vivo* con PD-0332991 en los adipocitos diferenciados de la FEV de TAE no observamos cambios en la expresión basal de *Ucp1*, no obstante, hallamos una menor respuesta al estímulo con forskolina. Un resultado similar observamos en *Pgc1a*, donde además de una menor estimulación por forskolina, los adipocitos diferenciados de la FEV de animales tratados *in vivo* con PD-0332991 presentaron menor expresión de *Pgc1a* basal. La expresión de *Prdm16* en TAE no fue afectada por PD-0332991. Al examinar los efectos en los adipocitos diferenciados a partir de la FEV de TAI (Fig. 6.1), de manera coincidente con la expresión en el tejido, los adipocitos P mostraron menor expresión basal, y una inhibición de la expresión inducida por forskolina de todos los marcadores termogénicos determinados (*Ucp1*, *Pgc1a*, *Prdm16*) respecto a los adipocitos C. Estos resultados nos permitieron concluir que la FEV del TA de animales donde se inhibió CDK4/6 *in vivo*, al diferenciarse *in vitro* genera una población de adipocitos con menor capacidad termogénica ante un estímulo β -adrenérgico, y en

TAI, también basalmente. Considerando los efectos inhibitorios sobre el programa termogénico del tejido, estos hallazgos sugieren fuertemente una contribución de la adipogénesis *de novo* a la inhibición del *browning in vivo*.

Finalmente, como estudio complementario del comportamiento diferencial de los depósitos abdominales y subcutáneos en relación al *browning*, comparamos los niveles de expresión basales y estimulados por forskolina de marcadores termogénicos en los adipocitos diferenciados de TAE y TAI de animales controles (Fig. 6.2). El análisis de los resultados mostró que, al igual que habíamos observado en el tejido completo, los cultivos de adipocitos de TAI expresan mayores niveles basales de marcadores termogénicos que los de TAE. Incluso, a pesar de la mayor respuesta al estímulo con forskolina de los adipocitos de TAE (*Ucp1*, *Pgc1a*), sus



niveles absolutos de ARNm continúan siendo inferiores a los hallados en los cultivos de TAI ante la estimulación con forskolina. Por lo tanto, este resultado nos permite concluir que los cultivos de adipocitos diferenciados a partir de la FEV de TAI son más termogénicos tanto basalmente como ante un estímulo adrenérgico que los de TAE.

Figura 6. 2: Los cultivos de adipocitos diferenciados de TAI expresan mayores niveles de genes termogénicos basalmente y ante la estimulación por forskolina que los de TAE. Niveles relativos de ARNm de genes termogénicos (*Ucp1*, *Pgc1a*, *Prdm16*) en adipocitos diferenciados de FEV de TAE y TAI de animales tratados *in vivo* con vehículo a temperatura ambiente. Los adipocitos se trataron a d8-postdiferenciación con vehículo (CB) o forskolina (CF) para estimular la termogénesis. TAI (i), TAE(e). Los niveles de expresión se refirieron al grupo CB de TAI, considerando la relación entre el gen específico y β -actina en este grupo como 1. (n=3, media \pm EEM). Para evaluar el efecto de las variables Depósito (D), Forskolina (F) y su interacción (D x F) en la expresión de cada gen utilizamos un ANOVA de dos vías. Las variables se consideraron con efectos significativos cuando $P < 0,05$. Cuando hallamos interacción entre las mismas ($P \times F < 0,05$), comparamos los grupos (CBe vs CBI y CFfe vs CFI) mediante test-t de Student corregidos por múltiples comparaciones por el método de Holm-Sidak ($*P < 0,05$ para la familia de comparaciones). El resultado del ANOVA de dos vías se muestra en la parte superior derecha de los gráficos. La interacción fue significativa para todos los genes por lo cual no se muestra el resultado de las variables P y F.

Los resultados de este capítulo nos indicaron que la inhibición de CDK4/6 *in vivo* afecta la homeostasis energética del organismo y la termogénesis UCP1-dependiente en los depósitos de TAB. En este sentido, observamos una inhibición de la termogénesis basal (temperatura ambiente) y de la inducida por un estímulo adrenérgico (frío) en TAE y TAI tanto a nivel del ARNm como proteico. Además, encontramos que la inhibición de CDK4/6 *in vivo* produce una reducción en el pool de CPAs beige en la FEV del TAB, la cual al diferenciarse *in vitro* genera una población de adipocitos con menor capacidad termogénica. Globalmente, estos resultados *in vivo* demuestran un rol importante de CDK4/6 en el browning del TAB y sugieren una contribución de la modulación de la biogénesis de adipocitos beige por adipogénesis de novo.

Además, en este capítulo comprobamos el aumento en el gasto energético y la inducción del browning en los depósitos de TAB por un estrés térmico, y evidenciamos la mayor respuesta de los depósitos subcutáneos respecto de los abdominales al browning. Adicionalmente, demostramos una mayor contribución de los primeros a la termogénesis UCP1-dependiente basal del organismo.

DISCUSIÓN

La estimulación de la capacidad termogénica del TA ha cobrado gran interés en los últimos años ya que provee un mecanismo endógeno de disipación de la energía, una característica muy atractiva para contrarrestar el balance energético positivo de los estados de obesidad. Debido a que los depósitos de TAP en humanos adultos son muy escasos y su funcionalidad decrece en la obesidad y con la edad^{67,192,193}, la descripción de los adipocitos *beige* en los depósitos de TAB (*browning*) fue un hecho de gran significancia, ya que estos depósitos son prominentes y se localizan en diversas regiones del organismo. En este sentido, numerosos estudios mostraron que la estimulación del *browning* del TAB contribuye significativamente al balance energético global, y también está asociado a mejoras en parámetros metabólicos generalmente alterados en el establecimiento y durante la obesidad, tales como la tolerancia a la glucosa, la insulinosensibilidad y la dislipemia^{71,72,194,195}. Estos hallazgos incrementaron aún más el interés en la búsqueda de estrategias para promover selectivamente la aparición y funcionamiento de los adipocitos *beige* con bajos efectos secundarios para el organismo, que por lo tanto sean factibles de ser utilizadas como terapia. Debido a la existencia de dos mecanismos propuestos para su generación, la adipogénesis *de novo* y la transdiferenciación, la comprensión de los mecanismos y factores que regulan estos procesos es fundamental en la búsqueda de modularlos selectivamente. En esta tesis mostramos que la actividad de CDK4/6 regula la termogénesis basal y es necesaria para el *browning* inducido por frío en los depósitos de tejido adiposo epididimal e inguinal. Nuestros estudios *in vitro* indicaron que esto tendría una contribución de las CPAs y de los adipocitos del tejido, ya que la actividad de CDK4/6 resultó necesaria tanto para la generación de adipocitos *beige* por adipogénesis *de novo*, como para el mantenimiento de la funcionalidad termogénica basal de adipocitos maduros. Además, cuando se inhiben CDK4/6 *in vivo* observamos una reducción en el pool de precursores *beige* en la FEV del TAB y una menor capacidad de generación de adipocitos *beige in vitro* por adipogénesis.

Efecto de la inhibición de CDK4/6 en la FEV sobre la proliferación

Como es conocido CDK4/6 regulan el ciclo celular a través del control del avance de la fase G1 a la S y, en consecuencia, su activación conduce a la proliferación celular. Existen diferentes inhibidores de la actividad de estas quinasas, entre los que se encuentra PD-0332991, el cual utilizamos en nuestros experimentos. Las IC₅₀ de PD-0332991 para CDK4 y CDK6 determinadas en ensayos de actividad quinasa *in vitro* (fosforilación de RB), son de 10 y 15 nM, respectivamente^{8,9}. Sin embargo, en estudios en diferentes líneas celulares tumorales donde se evaluó el efecto inhibitorio de PD-0332991 sobre la proliferación, se observaron IC₅₀ muy superiores (0,036 – 50 µM)¹¹ a las determinadas en ensayos de actividad quinasa *in vitro*^{8,12}. Considerando este amplio rango de IC₅₀ descritas en la bibliografía, en nuestros estudios *in vitro* elegimos utilizar una concentración del inhibidor de 1 µM, la cual previamente se observó que en una línea celular de carcinoma mamario produce la mayor reducción en la fosforilación de RB respecto a concentraciones menores (incubación de 24h)¹⁰. Debido a que no existían

datos anteriores sobre el efecto citostático de PD-0332991 en la FEV del TA, y a que ésta contiene varios tipos celulares que proliferan activamente, inicialmente estudiamos si la concentración del inhibidor elegida afectaba la proliferación de la FEV en nuestras condiciones experimentales. Nuestros resultados mostraron que la incubación con 1 μ M de PD-0332991 durante 48 h no afecta la proliferación celular de TAE, pero disminuye levemente la cantidad de células en la FEV de TAI. Esto podría sugerir una mayor sensibilidad de la FEV de este depósito al inhibidor respecto a TAE. No obstante, es importante resaltar que la inhibición de la proliferación en TAI fue sólo de aproximadamente 10%. Este hecho, en conjunto con la falta de efecto citostático sobre la FEV de TAE, indica un bajo efecto sobre la proliferación celular en nuestro esquema experimental. Una posible explicación a estos resultados es que la incubación con el inhibidor se inicia cuando las células se encuentran en un porcentaje de confluencia alto y, por lo tanto, próximas o en quiescencia replicativa. Por otro lado, no podemos descartar la posibilidad de que la IC50 de PD-0332991 para las células de la FEV sea mayor a la concentración de inhibidor que utilizamos en nuestros ensayos.

Rol de CDK4/6 en la generación de adipocitos *beige* por adipogénesis

La adipogénesis constituye uno de los mecanismos de generación de adipocitos *beige* durante el *browning* inducido por estrés térmico o el tratamiento con agonistas β 3-adrenérgicos^{29,30}. Nuestros resultados mostraron que la actividad de CDK4/6 en la FEV del TAB es necesaria para la determinación hacia el linaje *beige*. En este sentido, el tratamiento de la FEV *in vitro* con PD-0332991 redujo la expresión de marcadores selectivos del linaje *beige* (*Cd137*, *Tbx1*), y específicos de CPAs *beige* (*Ebf2*) en ambos depósitos, aun cuando los efectos sobre la proliferación en nuestras condiciones fueron bajos, e incluso en TAE inexistentes. Además, el tratamiento *in vivo* con PD-0332991 indujo una disminución en el pool de CPAs *beige* (PDGFR⁺; EBF2⁺) en la FEV de los depósitos de TAB tanto a temperatura ambiente como en frío. De manera interesante, el análisis de las poblaciones celulares de los animales tratados *in vivo* mostró que la inhibición de CDK4/6 no afecta la renovación de las células multipotentes del TAB (PDGFR α ⁺), sugiriendo una alteración específica de su determinación hacia las células progenitoras del linaje *beige* PDGFR α ⁺EBF2⁺. En el TAB PDGFR α identifica células con potencial adipogénico que pueden generar adipocitos blancos o *beige* según el estímulo^{31,84}. Estas células tienen capacidad proliferativa *in vitro* e *in vivo*, y una gran proporción de ellas co-expresa marcadores de células multipotentes (CD34, Sca1)^{31,196,197}. De acuerdo con la expresión de marcadores de multipotencialidad, un estudio de seguimiento de linaje mostró que la mayoría de los adipocitos en los depósitos de TAB más prominentes (inguinal, epididimal, retroperitoneal y mesentérico) provienen de células que expresaron PDGFR α ¹⁹⁸. Además, se observó que PDGFR α también identifica precursores en otros tejidos adultos tales como el músculo y el cerebro. Al igual que en el TA, en músculo se encontró que las células PDGFR α ⁺ son bipotenciales, pudiendo dar lugar a adipocitos o fibroblastos dependiendo de la naturaleza del

daño del tejido^{199,200}. En cambio, como mencionamos en el capítulo introductorio EBF2 es considerado uno de los determinantes tempranos de los linajes termogénicos^{84,93}. De acuerdo con esto, en TAI EBF2 enriquece la población PDGFR α en células con elevado potencial de diferenciación *beige in vitro*. Si bien previamente se había descrito que en TAE las células PDGFR α ⁺ tienen capacidad de dar adipocitos blancos o *beige*³¹, la marcación PDGFR α ⁺; EBF2⁺ aún no había sido utilizada para identificar precursores *beige* en este depósito. Nuestros resultados revelan la existencia de una población de células PDGFR α ⁺; EBF2⁺ en TAE la cual responde igual que la de TAI ante la inhibición de CDK4/6 y ante el estímulo de *browning* por frío. De manera interesante, en concordancia con la menor susceptibilidad de TAE al *browning* respecto a TAI, observamos que la proporción de células PDGFR α ⁺; EBF2⁺ en la FEV de TAE en animales controles a temperatura ambiente es menor que la presente en la FEV de TAI.

Por otra parte, nuestros resultados mostraron que la inhibición de CDK4/6 en la FEV no sólo afecta la generación de precursores *beige*, sino que también impacta en su capacidad para diferenciarse a adipocitos *beige*. De acuerdo con esto, la FEV de animales control tratada *in vitro* con PD-0332991 previo a la diferenciación generó adipocitos con menor capacidad termogénica basal en ambos depósitos estudiados. Más notorio fue el hecho de que la FEV proveniente de animales tratados con PD-0332991 se diferenció *in vitro* a adipocitos con menor capacidad termogénica ante un estímulo que simula la respuesta intracelular adrenérgica (forskolina). Incluso, los adipocitos de TAI diferenciados de la FEV de estos animales mostraron una menor termogénesis basal.

Si bien el rol de CDK4/6 en la adipogénesis *beige* no había sido estudiado hasta ahora, evidencias previas indican que las proteínas del retinoblastoma RB y p107 modulan la generación de los distintos linajes adipocitarios, promoviendo la diferenciación de los precursores adipocitarios hacia el linaje blanco y reprimiendo la generación de linajes termogénicos²⁰¹⁻²⁰⁴. De acuerdo con esto, células fibroblásticas embrionarias de ratón deficientes en RB y CPAs de ratones *p107*^{-/-} se diferencian a adipocitos con mayor expresión de genes termogénicos^{201,202}, y la supresión de p107 por Prdm16 es necesaria para la determinación hacia el linaje pardo²⁰⁴. Estudios moleculares en la línea de preadipocitos 3T3-L1 mostraron que durante la diferenciación adipocitaria, RB se une al promotor de Pgc1a reprimiendo su actividad. Debido a que Pgc1a es uno de los activadores de la expresión de Ucp1, esto sugiere un mecanismo por el cual RB inhibe la diferenciación hacia linajes termogénicos²⁰². La deficiencia en las proteínas del retinoblastoma puede considerarse una situación análoga a la activación de la vía de CDK4/6, ya que en ambas situaciones disminuye la formación de los complejos represivos entre estas proteínas y los factores E2Fs. Las evidencias previas sugieren que el mecanismo por el que las proteínas del retinoblastoma favorecerían el linaje adipocitario blanco sería la represión de genes termogénicos. Por lo tanto, nuestros resultados que muestran una represión del programa termogénico cuando se inhiben CDK4/6 (RB hipofosforilado, favorecimiento de complejos represivos) son coincidentes con estas evidencias, y sugieren que parte de los efectos de

CDK4/6 en la generación de adipocitos *beige* estarían mediados por los mismos efectores con los que controlan el avance del ciclo celular.

Numerosos estudios indican que CDK4 y CDK6 son reguladores positivos de la adipogénesis. En la línea de preadipocitos 3T3-L1 se observó que la actividad de CDK4 se relaciona directamente con su capacidad adipogénica. De acuerdo con esto, la inhibición de CDK4 durante la etapa de diferenciación inhibe la adipogénesis, mientras que su sobreexpresión la promueve. Asimismo, la re-expresión de CDK4 en fibroblastos embrionarios de ratón *Cdk4^{-/-}* rescata su capacidad adipogénica¹⁶⁵. En relación a CDK6, un estudio reciente reportó que la reducción de su expresión en preadipocitos humanos (por sobreexpresión de miR-107) previo a la diferenciación, reduce la expresión de genes adipocitarios generales y la acumulación lipídica en los adipocitos generados atenuando la adipogénesis¹⁷⁵. En coincidencia con estos hallazgos, nuestros resultados mostraron que la inhibición de CDK4/6 en la FEV reprime el proceso adipogénico general. A d0 la FEV tratada con PD-0332991 mostró una menor expresión de *aP2* en ambos depósitos, y en TAE también se vio reducida la expresión de *Pparg2*. Coincidentemente, a d4 post-diferenciación los adipocitos provenientes de la FEV tratada con PD-0332991 desarrollaron menor expresión nuclear de PPAR γ . En TAE, esto no afectó el porcentaje de células PPAR γ positivas, pero en TAI lo redujo, sugiriendo una menor respuesta de las células de la FEV a la inducción de la diferenciación. En concordancia con un efecto en la adipogénesis general, en estadios tardíos de la diferenciación (d8-postdiferenciación) también encontramos una reducción de la expresión de *aP2* en adipocitos provenientes de FEVs tratadas con PD-0332991, aunque los niveles de *Pparg2* y la acumulación lipídica no fueron afectados. En este último punto, es importante tener en cuenta que la incubación con PD-0332991 se realiza previo a la inducción de la diferenciación, y por lo tanto parte de los efectos inducidos por la inhibición farmacológica de CDK4/6 en las CPAs podrían ser reversibles. Además, debe considerarse que durante la diferenciación las células se encuentran bajo la acción de agentes pro-adipogénicos, de los cuales insulina y T3, permanecen durante todo el período de diferenciación *in vitro*.

Los reportes existentes sugieren además que los efectos de CDK4/6 en la adipogénesis estarían mediados por la regulación de PPAR γ . Ensayos de actividad luciferasa en la línea celular COS mostraron que CDK4 promueve la actividad de PPAR γ como factor de transcripción. Además, en adipocitos 3T3-L1 diferenciados se encontró que CDK4 interacciona directamente con PPAR γ , y se encuentra en el promotor de *aP2*, uno de los genes activados por PPAR γ ¹⁶⁵. Al igual que CDK4, el complejo ciclina D3-CDK6 también se encontró en los elementos de respuesta a PPAR γ en el promotor de *aP2*¹⁶⁴, no obstante, no se conoce si CDK6 modula directamente la actividad de PPAR γ . En esta tesis demostramos que la inhibición de CDK4/6 en la FEV reduce la expresión de PPAR γ en estadios tempranos del proceso de diferenciación. Este resultado es coincidente con las evidencias previas, y señala nuevamente que parte de los efectos de estas quinasas en la adipogénesis estarían mediados por PPAR γ . Debido a que CDK4 modula la

actividad de PPAR γ ¹⁶⁵, y que PPAR γ indirectamente regula su propia expresión a través de la activación transcripcional de C/EBP α , la disminución de la expresión de PPAR γ cuando inhibimos CDK4/6 podría ser consecuencia una reducción en la actividad de este factor.

Como describimos en el capítulo introductorio, PPAR γ es un factor de transcripción esencial para la progresión normal del proceso adipogénico en todos los tipos de adipocitos. De acuerdo con esto, aproximadamente el 80% de los sitios de unión al ADN de PPAR γ son comunes en TAE y en TAP interescapular¹⁰⁰. Dos de los genes activados por PPAR γ comunes a ambos depósitos son *Lipe*, y *FABP4/aP2*. No obstante, también se encontraron sitios que son depósito-específicos (TAE (*Rarres2*), TAP (*Ucp1*, *Ppara*, *Prdm16*)), por lo que PPAR γ también participa en la determinación de las características intrínsecas de cada linaje adipocitario¹⁰⁰. Nuestros resultados mostraron que la inhibición de CDK4/6 en la FEV del TA reprime la expresión de genes propios del linaje *beige*/pardo (*Ucp1*, *Prdm16*) en los adipocitos, y también inhibe la expresión de marcadores comunes a todos los linajes adipocitarios (*aP2*, *Pparg2*, PPAR γ). Esto es indicativo de que los efectos encontrados en nuestros experimentos al inhibir la actividad CDK4/6 en las CPAs también podrían estar mediados por un efecto directo sobre PPAR γ , afectando por un lado la adipogénesis independientemente del linaje, y por otro su acción específica sobre genes propios del linaje *beige* (*Ucp1*, *Prdm16*). No obstante, es necesario profundizar en los estudios al respecto con el propósito de evaluar la magnitud de la contribución de cada uno de estos mecanismos a la inhibición del programa termogénico.

Rol de CDK4/6 en la generación de adipocitos *beige* por transdiferenciación

Otro de los mecanismos de generación de adipocitos *beige* durante el *browning* es la conversión/transdiferenciación de los adipocitos blancos maduros^{29,30,90,205}. Nuestros resultados mostraron que la actividad de CDK4/6 en adipocitos es necesaria para la termogénesis UCP1-dependiente. De acuerdo con esto, el tratamiento de adipocitos *beige* diferenciados *in vitro* con PD-0332991 redujo la expresión basal de *Ucp1* en TAE y TAI. En TAE, también disminuyó la expresión de genes que codifican para cofactores que promueven la expresión de *Ucp1* (*Pgc1a*, *Prdm16*) no sólo basalmente, sino también cuando se estimula con forskolina. Además, al evaluar la expresión proteica de *Ucp1* por inmunofluorescencia observamos una reducción de las células UCP1+, indicando una disminución de la proporción de adipocitos *beige* en la población. Estos hallazgos en adipocitos diferenciados *in vitro*, fueron corroborados posteriormente en cultivos *ex vivo* de adipocitos aislados del tejido, en donde la inhibición de CDK4/6 redujo la expresión génica de *Ucp1*. Adicionalmente, en adipocitos de TAE también inhibió la expresión de *Ucp1* a nivel proteico.

Una de las ventajas de utilizar adipocitos aislados directamente del tejido para el estudio de la transdiferenciación es que permite eliminar la contribución a la expresión génica de las células fibroblásticas que permanecen indiferenciadas en los cultivos de adipocitos primarios en estadios avanzados de la diferenciación. Más importante aún, es el hecho de que la mezcla de adipocitos

del tejido conserva las características intrínsecas del depósito del que proviene, tales como la proporción entre adipocitos blancos y *beige* a temperatura ambiente, y los niveles de expresión de marcadores termogénicos. Por lo tanto, el uso de este modelo nos permitió aislar el proceso de transdiferenciación *in vitro* en condiciones más cercanas a las fisiológicas. Considerando esto, nuestro resultado en adipocitos provenientes del tejido sugiere que la actividad de CDK4/6 en adipocitos también es relevante en la regulación de la termogénesis UCP1-dependiente en condiciones fisiológicas.

Estos resultados son los primeros en evidenciar el rol de CDK4/6 en la conversión entre los distintos tipos adipocitarios, y sugieren que su actividad es importante para la normal generación de adipocitos *beige* por transdiferenciación. En concordancia con nuestros hallazgos, un reporte previo sugirió que la represión de la función de RB es necesaria para la generación normal de adipocitos *beige* por transdiferenciación²⁰⁶. En este estudio los autores observaron por inmunohistoquímica que en TARP de ratas adultas control mantenidas a temperatura ambiente, el 68% de los adipocitos uniloculares presentan localización nuclear de RB. La inducción del *browning* con un agonista β 3-adrenérgico (CL-316243) induce la aparición de adipocitos multiloculares por transdiferenciación y la disminución de adipocitos con localización nuclear de RB al 37%. De manera interesante, sólo los adipocitos uniloculares presentaron marca nuclear para RB, mientras que los adipocitos multiloculares generados ante el estímulo de *browning* no presentaron RB nuclear. Teniendo en cuenta que RB funciona con los factores E2Fs como represor transcripcional, estos resultados sugieren que en adipocitos basalmente podría reprimir la expresión de genes termogénicos, al igual que durante la adipogénesis. De acuerdo con esto, en TAP la fosforilación de RB, se induce rápido ante la exposición al frío²⁰⁶ de manera concomitante con el aumento en la expresión de Ucp1. Globalmente, estas evidencias y nuestros resultados exponen que la regulación del programa termogénico por CDK4/6 en adipocitos estaría mediada en parte por los mismos efectores que actúan en el ciclo celular.

Cuando evaluamos el rol de CDK4/6 en la adipogénesis *beige*, en adipocitos diferenciados a partir de la FEV tratada con PD-0332991 todos los marcadores termogénicos (Ucp1, Pgc1a, Prdm16) se encontraron reducidos. Un efecto similar hallamos al tratar directamente adipocitos diferenciados de TAE con PD-0332991. Considerando que tanto Pgc1a como Prdm16 son activadores transcripcionales de Ucp1, la disminución en su expresión podría ser consecuencia de los efectos de CDK4/6 sobre Pgc1a y Prdm16. Sin embargo, en adipocitos diferenciados de TAI y en los incubados de adipocitos de tejido, encontramos que la inhibición de CDK4/6 sólo reprimió la expresión de Ucp1. Esta disociación entre la expresión de Ucp1 y sus activadores podría sugerir una modulación de la expresión de Ucp1 por CDK4/6 (o los efectores de esta vía) de manera independiente a los efectos sobre Pgc1a y Prdm16.

Como mencionamos previamente, CDK4 promueve la actividad de PPAR γ y la adipogénesis *in vitro*¹⁶⁵. Incluso, en esta tesis demostramos que durante la adipogénesis también afecta la expresión nuclear de este factor. En adipocitos se observó que CDK4 es importante en el

mantenimiento de la sensibilidad a insulina¹⁷¹. Por otra parte, también la actividad de PPAR γ se ha asociado a efectos positivos en la sensibilidad a la insulina en el organismo^{62,63}. En función de estos reportes estudiamos si la inhibición de CDK4/6 en adipocitos modificaba parámetros generales de su funcionalidad. Nuestros resultados mostraron que la inhibición de CDK4/6 en adipocitos diferenciados de TAE disminuye la expresión de *Pparg2* y tiende a disminuir la acumulación lipídica. Considerando que en adipocitos una de las acciones de la insulina es la promoción de la lipogénesis, la reducción en la acumulación lipídica ante el tratamiento con PD-0332991 podría sugerir una menor sensibilidad a esta hormona. Según las evidencias mencionadas previamente, ésta podría estar determinada por dos factores: una menor actividad quinasa de CDK4 sobre IRS-2 que genera una desensibilización de la vía intracelular de respuesta a la insulina¹⁷¹, y/o la menor expresión de *Pparg2* debido a su asociación con la sensibilidad a la insulina y a su función como activador transcripcional de genes esenciales para la funcionalidad adipocitaria. De acuerdo con nuestro resultado, otros autores observaron que la inhibición de CDK4 en adipocitos 3T3-L1 disminuye la captación de glucosa y la expresión de genes implicados en este proceso, así como también de genes implicados en la lipogénesis¹⁶⁵. Un resultado análogo se observó al disminuir la expresión de CDK6 en adipocitos primarios de humanos (por sobreexpresión de miR-107), donde la menor acumulación lipídica estuvo acompañada de una disminución en la captación de glucosa, síntesis de triglicéridos y expresión de genes adipocitarios generales¹⁷⁵. En este contexto, nuestro resultado en adipocitos agrega evidencias en favor de un rol de CDK4/6 en la modulación de funciones generales del adipocito, al menos en TAE.

Otra de las observaciones que surgen de los experimentos de transdiferenciación es que la inhibición de CDK4/6 en adipocitos de TAI tuvo menores consecuencias sobre la expresión de genes termogénicos y la funcionalidad adipocitaria que en TAE. De acuerdo con esto, al evaluar los componentes del programa termogénico en adipocitos tratados con PD-0332991 sólo observamos una disminución en la expresión génica de *Ucp1* en ambos modelos de adipocitos. En concordancia, los parámetros adipocitarios generales determinados (expresión de *Pparg2* y acumulación lipídica) tampoco se vieron afectados. En conjunto, estos resultados podrían sugerir una menor sensibilidad de los adipocitos de TAI que los de TAE a la inhibición de CDK4/6. Como discutiremos más adelante, éste efecto diferencial se volvió a observar en la masa de los depósitos de los animales tratados *in vivo* con PD-0332991. No obstante, al evaluar el efecto de la inhibición de CDK4/6 sobre la termogénesis en el tejido ambos depósitos respondieron en la misma dirección.

Rol de CDK4/6 en la regulación del contenido mitocondrial

Las proteínas reguladoras del ciclo celular también han sido involucradas en la regulación de la función mitocondrial³³⁻³⁵. De esta manera se cree que serían capaces de acoplar la proliferación y el metabolismo celular³⁶. Nuestros resultados mostraron que la inhibición *in vitro* de CDK4/6

en la FEV induce un aumento en su contenido mitocondrial. No obstante, el mismo se restablece a niveles normales durante la etapa de diferenciación. De acuerdo con esto, la cantidad de mitocondrias en los adipocitos de TAI diferenciados a partir de FEVs tratadas con PD-0332991 no difirió de los controles, y en TAE sólo hallamos una tendencia a que sea mayor. En estos experimentos es importante considerar que en cultivos primarios a d8-postdiferenciación al menos dos tipos celulares contribuyen al contenido mitocondrial de la población; adipocitos diferenciados, y células de la FEV que no respondieron a la mezcla de diferenciación. Considerando que en los cultivos de TAE permanece una mayor proporción de células indiferenciadas a d8 (el porcentaje de diferenciación en TAE es menor que en TAI), nuestros resultados podrían sugerir un efecto específico de la inhibición de CDK4/6 en las células indiferenciadas. De acuerdo con esto, la inhibición de CDK4/6 en cultivos de adipocitos diferenciados (d6 a d8) no modificó el contenido mitocondrial en TAI, y en TAE si bien indujo un aumento, el mismo fue de menor magnitud que el observado en la FEV. Basándonos en estos resultados, en las células indiferenciadas en condiciones normales estas quinasas inhibirían la biogénesis mitocondrial. Esto está de acuerdo con un estudio previo que muestra que la sobreexpresión de la ciclina D1 induce una disminución de la actividad mitocondrial en fibroblastos embrionarios de ratón, la cual está mediada por la actividad quinasa de CDK4, pero es independiente de RB³³. De manera interesante, nuestros resultados plantean una regulación diferencial del contenido mitocondrial por CDK4/6 en las células indiferenciadas (CM, CPAs) del TAB respecto a las células diferenciadas (adipocitos). De acuerdo con esto, la actividad de CDK4/6 en las células indiferenciadas de la FEV promovería la proliferación celular e inhibiría la biogénesis mitocondrial de manera simultánea. Esto es coincidente con el hecho de que las células con mayor capacidad proliferativa (células tumorales, células madres embrionarias, células mesenquimales en tejidos adultos, células precursoras) utilizan mayormente la glicólisis aeróbica como fuente de energía y de intermediarios metabólicos en lugar de la fosforilación oxidativa mitocondrial³⁷⁻⁴⁰. Incluso el metabolismo glicolítico en células madre está relacionado con el mantenimiento de su pluripotencialidad. Por otra parte, en nuestros ensayos desconocemos la razón por la que el contenido mitocondrial no se modificó en adipocitos diferenciados de TAI a pesar de una reducción en la expresión de marcadores termogénicos.

Efecto de la aclimatación al frío y la inhibición de CDK4/6 *in vivo* sobre el metabolismo y la homeostasis energética

En los animales homeotermos, tales como las aves y los mamíferos, el mantenimiento de la temperatura corporal es de fundamental importancia para el desarrollo de todas las reacciones bioquímicas que componen el metabolismo. En estos animales, el estrés térmico activa mecanismos para la generación de calor, dentro de los cuales se encuentra el *browning* del TAB. La termogénesis UCP1-dependiente característica de este proceso requiere de un gran aporte de energía química (e⁻ provenientes de la oxidación de sustratos). De acuerdo con esto y en

concordancia con reportes previos, en los animales aclimatados al frío durante 7 días observamos un aumento de gran magnitud en la ingesta de alimento sin cambio en el peso corporal, evidenciando un incremento del gasto energético^{93,194,207}. La hiperfagia hallada sugiere que una de las principales fuentes de energía para la termogénesis UCP1-dependiente proviene de la incorporación de nutrientes. Además, la aclimatación al frío redujo las masas de TAE y TAI sugiriendo la activación de la lipólisis en estos depósitos, la cual es una de las consecuencias de la activación del SNS por frío¹⁴. En conjunto con la disminución en los niveles de triglicéridos plasmáticos¹⁹⁴, esto indicaría que el aumento en la demanda energética también está sustentada por la movilización de las reservas lipídicas desde los depósitos de TA. En coincidencia, es conocido que la β -oxidación de ácidos grasos es una de las principales fuentes de energía para la termogénesis mediada por UCP1¹⁴. Por otra parte, el frío es un reconocido estímulo de estrés²⁰⁸, y por lo tanto produce la activación de los mecanismos centrales y endócrinos necesarios para asegurar el adecuado aporte de glucosa al cerebro. De acuerdo con esto, se ha encontrado que induce un aumento de la liberación de ACTH y corticosterona^{194,209}. Esto podría explicar, al menos parcialmente, el aumento en la glucemia que hallamos en los animales expuestos a frío. Nuestros resultados también mostraron un aumento en el contenido lipídico hepático ante la exposición al frío lo cual es coincidente con lo observado por otros^{194,210}.

Al evaluar el efecto de la administración de PD-0332991 en parámetros metabólicos, no observamos cambios en el peso corporal, la ingesta, ni la glucemia. Este hallazgo es coincidente con un estudio previo llevado a cabo en ratas donde se utilizan dosis bajas del inhibidor (10 y 30 mg/Kg) administradas en ciclos de 3 semanas tratamiento: 1 semana descanso¹⁷⁹. No obstante, el mismo estudio mostró que éstos parámetros si se ven afectados si se administra una dosis mayor (100mg/Kg), por lo que los efectos dependerían de la dosis utilizada. En páncreas, la vía CDK4-RB-E2F1 modula la secreción de insulina en las células β regulando la expresión del gen Kir6.2 que se encuentra implicado en este proceso²¹¹. Además, se ha demostrado que CDK4 también es importante para la normal proliferación de estas células, influyendo así en la conformación y funcionalidad del páncreas endócrino²¹². No obstante, este efecto sólo es relevante en animales jóvenes donde las células β se encuentran en su fase de proliferación, y no en animales adultos donde alcanzan la quiescencia replicativa^{213–216}. Por lo tanto, la deficiencia o la inhibición de CDK4 provoca insulinodeficiencia e hiperglucemia en animales jóvenes, pero no afecta dichos parámetros en individuos adultos^{179,217}. En ratones se observó que a los 3 meses de vida las células β ya muestran niveles de proliferación muy bajos²¹⁴. Estos hallazgos podrían explicar que no hayamos observado cambios en la glucemia en los animales adultos tratados con PD-0332991.

Por otro lado, se conoce que CDK4 también es importante para la sensibilidad periférica a la insulina. Recientemente se demostró que en adipocitos de TAE, CDK4 participa de la cascada de señalización intracelular de la insulina mediante la fosforilación directa de IRS-2 promoviendo sus acciones, tales como la captación de glucosa y la lipogénesis^{165,171}. De acuerdo con esto,

nuestros resultados mostraron una reducción significativa de la masa de TAE y de la acumulación lipídica en hígado en animales tratados con PD-0332991, lo cual podría dar indicio de una menor sensibilidad a insulina en estos tejidos. En coincidencia, en hepatocitos primarios se observó que ante un estímulo de insulina se induce la fosforilación de IRS-2 en el residuo Ser388 que es el específicamente fosforilado por CDK4¹⁷¹. A diferencia de TAE, las masas de TAI y TARP no fueron modificadas por el tratamiento con el inhibidor. En principio, el efecto diferencial en la masa de los depósitos podría estar determinado por un alcance diferente de PD-0332991 según la localización de los mismos. No obstante, la determinación del estado de fosforilación de RB mostró una inhibición efectiva de la vía de CDK4/6 tanto en TAE como en TAI, indicando que el inhibidor alcanza ambos depósitos con actividad farmacológica. Este efecto diferencial está en línea con lo que observamos *in vitro* durante el tratamiento de adipocitos diferenciados con PD-0332991 las últimas 48 h de la diferenciación. En conjunto, estas observaciones indicarían un mayor efecto de la inhibición de CDK4/6 sobre la regulación de la acumulación lipídica en TAE que en TAI, lo cual podría sugerir una participación diferencial de CDK4/6 en la regulación de la sensibilidad a la insulina en estos depósitos.

Respuesta diferencial de los depósitos de TAB al *browning* inducido por frío

Numerosos reportes indican que los depósitos de TA subcutáneos, son más sensibles a la estimulación del *browning* que los abdominales^{66,67,218,219}. En concordancia, nuestros resultados *in vivo* mostraron una mayor inducción del *browning* en TAI que en TAE ante la exposición al frío. Al respecto, observamos que la expresión de marcadores termogénicos y mitocondriales en animales aclimatados a 4°C fue más elevada en TAI que en TAE. En TAI de estos animales, también observamos una gran abundancia de adipocitos multiloculares UCP1+ (*beige*), mientras que en TAE estos fueron escasos. Incluso, en TAI los niveles de expresión de marcadores termogénicos fueron mayores a los de TAE en animales mantenidos a temperatura ambiente. Estos resultados, indican claramente una mayor contribución de TAI a la termogénesis UCP1-dependiente del organismo no sólo ante un estrés térmico agudo (*browning*), sino también en condiciones basales.

La diferente susceptibilidad al *browning*, junto con otros aspectos diferenciales de las respuestas fisiológicas de los depósitos de TAB subcutáneos y abdominales determinan que los primeros se asocien al desarrollo de enfermedades metabólicas mientras que los segundos no, incluso se les ha asignado un rol protector^{11,220}. Se postula que dos fenómenos no excluyentes podrían explicar su distinto comportamiento⁴. Por un lado, el mismo podría deberse a factores extrínsecos de los tejidos, tales como la irrigación y la inervación, que debido a la distinta localización anatómica de los depósitos resulte en que hormonas, citoquinas, y otras moléculas o células resulten distribuidas de manera diferencial. Otra de las posibilidades es que existan factores intrínsecos en cada depósito, tales como la composición celular o la regulación transcripcional de la expresión génica, que establezcan de manera autónoma su distinta funcionalidad.

La proporción de precursores adipocitarios de cada linaje presente en la FEV podría ser uno de los factores determinantes del comportamiento diferencial de los depósitos. Un estudio previo y nuestros resultados mostraron que la FEV de TAI de animales controles a temperatura ambiente contiene una mayor abundancia de CPAs *beige*²²¹, y que se diferencian hacia el linaje *beige* con mayor eficacia que la FEV de TAE. En este sentido, a d8 post-diferenciación en los cultivos de TAI observamos un mayor porcentaje de adipocitos UCP1+ y mayor contenido mitocondrial que en los de TAE. Además, encontramos que los adipocitos diferenciados de TAI expresan mayores niveles de marcadores termogénicos basalmente, y ante la estimulación por forskolina que los de TAE, lo cual muestra que las diferencias halladas en el tejido se mantienen en cultivos primarios *in vitro*. Estos resultados sugieren que la mayor cantidad de CPAs *beige* en la FEV de TAI generaría una mayor proporción de adipocitos *beige* ante un estímulo adipogénico, y podría explicar en parte su mayor capacidad termogénica basal y durante el *browning* respecto a TAE.

Otra observación interesante respecto a las características del *browning* en cada depósito, es que TAI además de un mayor perfil termogénico basal, tiene una mayor respuesta que TAE a la inducción del *browning* por frío. De acuerdo con esto, en TAI observamos una mayor inducción de la expresión de *Ucp1*, *Pgc1a* y *Cox8b* respecto a TAE. El único marcador que se estimuló en la misma proporción en ambos tejidos fue *Prdm16* (~1,5 veces). *Prdm16* es un factor de transcripción temprano necesario para establecimiento del programa termogénico de los adipocitos *beige* y pardos⁷⁸. A través del reclutamiento de complejos mediadores de la transcripción, factores de transcripción (PPAR γ) y coactivadores, promueve la expresión de *Ucp1* y otros genes termogénicos^{104,105}. Debido a que su expresión se encuentra enriquecida en los depósitos subcutáneos respecto a otros de TAB⁷³, se lo ha propuesto como uno de los factores determinantes de la respuesta diferencial de los depósitos abdominales y subcutáneos al *browning*. No obstante, nuestros resultados muestran la misma estimulación de *Prdm16* en ambos depósitos, a pesar de que existe una estimulación diferencial de uno de sus genes diana (*Ucp1*), lo cual sugiere que podrían existir otros factores mediando la respuesta al *browning*. De acuerdo con esto, un estudio mostró que la expresión de *Prdm16* durante la diferenciación de la FEV de una cepa propensa al *browning* (129S6/SvEv) es menor que la de una cepa menos propensa (C57BL/6J), aun cuando los adipocitos generados a partir de la FEV de la cepa más propensa desarrollan mayor expresión de *Ucp1* al final del período de diferenciación *in vitro*²²¹. En conjunto, estos resultados indican que la abundancia de precursores *beige* en la FEV, y posiblemente una regulación transcripcional diferencial, serían dos de los factores responsables de la distinta funcionalidad termogénica de TAE y TAI. Además, sustentan la existencia de mecanismos intrínsecos de cada depósito como determinantes de su distinto comportamiento.

Rol de CDK4/6 en la regulación de la termogénesis basal y el *browning* de los depósitos de TAB

Uno de los hallazgos más importantes de esta tesis que confirma nuestra hipótesis principal es que la actividad de CDK4/6 *in vivo* es necesaria para mantenimiento de los niveles de termogénesis basal y para el *browning* inducido por frío de los depósitos de TAB. De manera general, la inhibición de CDK4/6 por administración de PD-0332991 indujo una disminución en la expresión génica de marcadores característicos del programa termogénico a temperatura ambiente y en frío, y también de UCP1 a nivel proteico. A su vez, el análisis de los tejidos por inmunohistoquímica mostró que la reducción en la expresión de UCP1 en los animales tratados con PD-0332991 en frío estuvo acompañada por una disminución en la cantidad de adipocitos multiloculares.

De acuerdo con un rol importante de CDK4/6 en la modulación del programa termogénico en los depósitos de TAB, un estudio reciente demostró que la deficiencia en p16 (*Cdkn2a*) promueve el *browning* del TA²⁰⁷. p16 es uno de los inhibidores endógenos específicos de CDK4/6 por lo que su ausencia dejaría a estas quinasas con mayor activación. En estas condiciones, los autores muestran una estimulación del *browning* del TA, lo cual sería coincidente con nuestras observaciones que muestran una inhibición de la termogénesis cuando se reduce la actividad de CDK4/6 y nos permite sugerir una asociación positiva entre la actividad de estas quinasas y los niveles de termogénesis del TAB.

Además de los moduladores *usptream* de la actividad de CDK4/6, también se ha evaluado el rol en la determinación de los distintos linajes adipocitarios de algunas de las proteínas dianas de estas quinasas en la vía clásica. Dos de las proteínas del retinoblastoma, p107 y RB fueron descritas como determinantes del linaje blanco sobre el *beige*. De acuerdo con esto, los animales *p107^{-/-}* muestran una estimulación del *browning* en TAI determinada por una mayor abundancia de adipocitos multiloculares, mayor contenido mitocondrial y aumento de la expresión de Ucp1 y Pgc1a²⁰². Además, las CPAs de animales deficientes en p107 se diferencian *in vitro* a adipocitos con mayor expresión de genes termogénicos. Respecto a RB, se observó que la represión de su funcionalidad es necesaria para la generación de adipocitos termogénicos tanto por adipogénesis *de novo* como por transdiferenciación, sugiriendo que basalmente ésta proteína en su forma hipofosforilada se encuentra inhibiendo la expresión de genes determinantes del programa termogénico^{201,222}. En línea con esto, nuestros estudios mostraron que al inhibir CDK4/6 *in vivo* disminuyó la fosforilación de RB en TAB (indicando aumento de los complejos represivos RB-E2Fs) y estos tejidos presentaron una menor capacidad termogénica. Al igual que propusimos en nuestros estudios *in vitro* para la generación de adipocitos *beige* por adipogénesis y transdiferenciación, en conjunto con evidencias previas nuestros resultados en TA de animales tratados *in vivo* sugieren fuertemente que la regulación del programa termogénico por CDK4/6 podría estar mediada por los mismos efectores que actúan en el control del ciclo celular. La prueba más directa en favor de esta hipótesis proviene de un estudio que

mostró que el eje CDK4-RB-E2F1 regula el metabolismo oxidativo en tejidos adultos²²³. En este sentido se observó que los animales *E2f1*^{-/-} tienen un metabolismo oxidativo exacerbado en varios tejidos, tales como el músculo y el TAP. Estos tejidos exhibieron un aumento en la expresión de genes que codifican proteínas de la cadena transportadora de electrones mitocondrial (*Atp5g1*, *Cox5a*, *Nduf1c*, *Sdha*), el ciclo de Krebs (*Idh3a*), la oxidación de ácidos grasos (*Acadl*, *Pdk4*, *Cpt-1*) y la respiración desacoplada (*Ucp1*, *Ucp2*, *Pgc1a*). Por análisis computacionales los autores determinaron que varios de estos genes, de nuestro interés *Ucp1*, *Pgc1a* y *Ucp2*, tenían en sus promotores sitios de unión de los factores E2Fs. Estudios moleculares revelaron que en condiciones de disponibilidad energética (alimentación, homeotermia) en TAP y en músculo, E2F1 asociado a RB actúan reprimiendo la transcripción de genes necesarios para el metabolismo oxidativo por unión a sus promotores. Al igual que en el ciclo celular y como había sido sugerido previamente²⁰¹, observaron que esta represión está regulada por el estado de fosforilación de RB: en su estado hipofosforilado RB forma parte de los complejos represivos con E2F1, mientras que su fosforilación induce la disociación de los mismos y la activación de la transcripción. En concordancia, en los animales *CDK4*^{R24C/R24C} donde CDK4 no puede ser inhibida por p16 y, consecuentemente RB está constitutivamente fosforilada, en los promotores de los genes oxidativos no se encuentra RB, y la expresión de dichos genes se encuentra elevada independientemente del estado energético del organismo (ayuno/alimentación). Es importante aclarar que de manera general tanto el ayuno como el estrés térmico inducen la activación del metabolismo oxidativo, mientras que la realimentación/homeotermia lo disminuyen. El resultado anterior no solo muestra que la regulación del metabolismo oxidativo por E2F1 es dependiente de RB, sino que también indica que está dirigida por CDK4. De acuerdo con esto, el fenotipo de los animales *E2f1*^{-/-} no difiere de los *CDK4*^{R24C/R24C} y, de manera análoga a nuestros resultados, el tratamiento de ratones salvajes con PD-0332991 inhibe el incremento en la respiración mitocondrial promovido por el tratamiento con un agonista β -adrenérgico (isoproterenol).

El estudio anterior demuestra que la vía CDK4-RB-E2F1 promueve el metabolismo oxidativo en TAP. De nuestro interés es el hecho de que uno de los procesos promovidos en TAP es la termogénesis UCP1-dependiente²²⁴. En concordancia, el TAP de animales deficientes en E2F1 tiene mayor contenido mitocondrial y consumo de oxígeno, menor tamaño de vacuolas lipídicas, y mayor expresión de genes implicados en el proceso termogénico (*Ucp1* y *Pgc1a*). Esta observación es completamente coincidente con nuestros resultados en los depósitos de TAB que muestran una inhibición de la termogénesis sobre los niveles basales cuando inhibimos CDK4/6 a temperatura ambiente, y un requerimiento de la funcionalidad de CDK4/6 para la inducción del *browning* por frío. De manera análoga a la necesidad de CDK4/6 para la respuesta del TAB al frío que demostramos en esta tesis, en el estudio descripto previamente la actividad de CDK4/6 resultó necesaria para la acción de un agonista β -adrenérgico²²⁵. Estos hallazgos revelan una función de CDK4/6 en la respuesta intracelular a la estimulación adrenérgica. En línea con esto,

en adipocitos primarios provenientes de FEV tratadas con PD-0332991 y tratados en los últimos días de la etapa de diferenciación con PD-0332991, la incubación con forskolina (en ausencia de PD-0332991) rescató la inhibición basal logrando niveles normales de expresión de marcadores termogénicos en el estado estimulado. Sin embargo, desconocemos las razones por las que la expresión de Ucp1 cuando se aplica forskolina resultó superior a la de los adipocitos control. Esto plantea un posible “efecto rebote” al realizar primero el tratamiento con PD-0332991, y luego la estimulación de la termogénesis, lo cual debería ser estudiado en mayor detalle.

Considerando los hallazgos en relación a la vía CDK4-RB-E2F1 en TAP²²⁵ y nuestros resultados, podríamos hipotetizar que un mecanismo análogo al observado en TAP funciona en los depósitos de TAB en la regulación del programa termogénico por esta vía. En condiciones de homeotermia, baja actividad de CDK4/6 favorecería la formación de los complejos proteicos entre los factores E2F y RB hipofosforilada (y/o otras proteínas de la familia), los cuales actuarían reprimiendo la transcripción de genes del programa termogénico. El aumento en la demanda energética desencadenada por un estrés térmico activaría a CDK4/6 por medio de las vías adrenérgicas, induciendo la fosforilación de RB y la consecuente disociación de los complejos E2F/RB. Esto dejaría libre la transcripción de los genes termogénicos activándose la generación de calor mediada por UCP1. No obstante, no podemos descartar que algunos de los efectos encontrados se deban a acciones de CDK4/6 como quinasas independientes de los efectores del ciclo celular, y que su activación esté mediada por otras vías adicionales a la adrenérgica.

Interpretación del rol de CDK4/6 en la regulación de la termogénesis del TAB

En condiciones de homeostasis energética a temperatura ambiente (22°C), la adipogénesis tiene como finalidad renovar los adipocitos del TA, por lo que la velocidad de recambio del TA en estas condiciones es un reflejo de la tasa de adipogénesis. En humanos se estimó que un 10% de los adipocitos se recambia anualmente, lo cual representa un recambio semanal del 0,2%²²⁶. Por otro lado, en roedores se determinó que en animales control alimentados con dieta estándar durante dos meses, la generación de nuevos adipocitos es extremadamente baja tanto en TAE como en TAI. Incluso en ratones alimentados con una dieta con alto contenido en grasa, la adipogénesis en TAE recién se activa a las 8 semanas, mientras que en TAI aún a las 12 semanas no se observan signos de adipogénesis, dándose la expansión en este depósito principalmente por hipertrofia²⁹.

En lo que respecta a la conversión/transdiferenciación entre los adipocitos maduros, en los depósitos de TAB en condiciones de homeostasis energética a temperatura ambiente (22°C) la transdiferenciación de blanco>*beige* es baja, así como también la actividad termogénica del tejido. De acuerdo con esto, la reaclimatación a 22°C de animales expuestos previamente a 4°C, induce la conversión opuesta (*beige*>blanco)^{29,205}, con la consecuente disminución en la expresión de Ucp1 y la adquisición de morfología unilocular.

Estas evidencias indican que en roedores a temperatura ambiente en condiciones de homeostasis energética la tasa de adipogénesis (independientemente del linaje adipocitario) en los depósitos de TAB es extremadamente baja, así como también la transdiferenciación. Basándonos en estas observaciones, podríamos considerar que durante los 10 días que administramos PD-0332991 a temperatura ambiente en nuestros experimentos *in vivo* ambos procesos son despreciables y, consecuentemente, la composición de la población de adipocitos se mantiene estable. Según un estudio reciente³⁰ que muestra que la aparición de adipocitos *beige* ante la primera exposición a un estrés térmico ocurre principalmente por adipogénesis *de novo*, la población de adipocitos sería una mezcla de adipocitos blancos, y presumiblemente *beige* inactivos. Los adipocitos *beige* habrían sido generados por adipogénesis *de novo* durante la formación normal del TA en el período post-natal debido al estrés que supone la crianza a una temperatura menor a la de termoneutralidad (22°C).

Considerando que la población de adipocitos se mantiene constante durante el tratamiento a temperatura ambiente, sugerimos que la inhibición de la termogénesis basal del TAB cuando administramos PD-0332991 podría estar determinada principalmente por un efecto sobre la población de adipocitos *beige*. De acuerdo con el mecanismo molecular propuesto previamente, la inhibición en la expresión de marcadores termogénicos en adipocitos sería consecuencia de una inhibición del tono basal de la vía de CDK4/6, lo cual resultaría en el reclutamiento de una mayor cantidad de complejos represivos entre los factores E2Fs y las proteínas del retinoblastoma a los promotores de estos genes favoreciendo la conversión de los adipocitos *beige* a blancos.

Por otro lado, estudios recientes en ratones nacidos y criados a temperatura ambiente (22°C), y sometidos a un estrés térmico en la vida adulta (4°C) coinciden en que tanto la adipogénesis *de novo* como la transdiferenciación contribuyen significativamente a la formación de los adipocitos *beige* en estas condiciones^{29,30,205}. En estos animales se determinó que el 50% los adipocitos *beige* son generados por adipogénesis *de novo*, y el otro 50% por transdiferenciación a partir de los blancos y/o reactivación de los *beige* inactivos³⁰. Basándonos en estos hallazgos, en nuestros animales experimentales donde estimulamos el *browning* durante 7 días, el TAB estaría compuesto por adipocitos *beige* activos entremezclados con adipocitos blancos que no respondieron al estímulo adrenérgico. Los adipocitos *beige* habrían sido generados por adipogénesis a partir de las CPAs, y por transdiferenciación a partir de los adipocitos blancos/reactivación de los *beige*.

En este contexto, nuestros hallazgos *in vitro* que mostraron que la inhibición de CDK4/6 afecta negativamente la generación de adipocitos *beige* por adipogénesis *de novo* y por transdiferenciación, sugerirían que la inhibición del *browning* del TAB en los animales tratados con PD-0332991 en frío estaría determinada por el efecto del inhibidor sobre ambos procesos. Teniendo en cuenta el mecanismo molecular que regiría el control del programa termogénico por

estas quinasas propuesto previamente, en frío la inhibición de CDK4/6 impediría la activación de esta vía por señales β -adrenérgicas, y la consecuente inducción de la expresión de los genes termogénicos. En los adipocitos, este mecanismo reprimiría el proceso de transdiferenciación hacia el linaje *beige*/re-activación de los adipocitos *beige*. En CPAs, debido a que la expresión de genes termogénicos no es significativa, el eje CDK4/6 podría regular la expresión de marcadores tempranos de linaje (*Cd137*, *Tbx1*, *Ebf2*), que tal como observamos en esta tesis se ven inhibidos en la FEV por PD-0332991. En este contexto, la inhibición de CDK4/6 reprimiría su expresión induciendo una disminución en la abundancia de CPAs *beige*, que redundaría en una menor generación de adipocitos *beige* por adipogénesis *de novo* contribuyendo a la inhibición del *browning*.

Limitaciones del estudio

La inhibición farmacológica es un método útil y simple de implementar para estudiar el rol de las proteínas diana en la funcionalidad celular, tal como fue en nuestro caso el uso de PD-0332991 para estudiar la participación de CDK4/6 en la generación de adipocitos *beige*. PD-0332991 es un inhibidor potente y selectivo para CDK4 y CDK6. De acuerdo con esto, en ensayos de fosforilación *in vitro* se observó actividad muy baja o nula contra una gran variedad de otras proteínas quinasas, incluidas otras CDKs¹⁷⁸. Una de las limitaciones más importantes que encontramos al utilizar la aproximación farmacológica fue que, debido probablemente a la gran homología entre CDK4 y CDK6, las IC50s de PD-0332991 por CDK4 y CDK6 son muy cercanas (11nM y 15nM respectivamente)^{146,149}, lo cual dificulta investigar la contribución relativa de cada una de estas quinasas a los efectos observados. En nuestros ensayos *in vitro* la concentración de PD-0332991 utilizada (1 μ M) es ampliamente superior a ambas IC50, por lo tanto, debemos atribuir los cambios hallados tanto a CDK4 como a CDK6. *In vivo*, comprobamos la inhibición de la vía de CDK4/6 por la reducción en la fosforilación de RB. No obstante, desconocemos la concentración efectiva de PD-0332991 que llega al TAB. Ante estas limitaciones, no podemos descartar una participación diferencial de CDK4 y CDK6 en la generación de adipocitos *beige* y la funcionalidad adipocitaria.

Al respecto, un estudio reciente sugiere que CDK6 es importante para la generación de adipocitos blancos por adipogénesis y para el mantenimiento de sus características fenotípicas en el estado maduro. De acuerdo con esto, animales que expresan una forma inactiva de CDK6 (*CDK6^{K43M}*) o deficientes en CDK6 (*Cdk6^{-/-}*), presentan inducción del *browning* en TAI con el correspondiente aumento de la expresión de marcadores termogénicos y del contenido mitocondrial. Inversamente, el restablecimiento de la expresión de CDK6 en adipocitos de animales *knock-out in vivo* y en la FEV de animales *knock-out in vitro* provoca la reversión hacia el linaje blanco²²⁴. Este hallazgo pone en debate la participación de CDK6 en los efectos sobre el linaje *beige* observados en esta tesis. De manera interesante, los autores muestran que la expresión de CDK4 no se modifica por la falta de CDK6 como manera de demostrar que no hay

una potenciación de su acción. No obstante, la falta de CDK6 podría favorecer la formación de más complejos activos de Ciclina D-CDK4 respecto a las condiciones normales y consecuentemente promover su actividad sin necesidad de un cambio en expresión. De acuerdo con esto, en TAI la expresión de CDK6 es mayor que la de CDK4 y la falta de CDK6 induce el *browning* en este depósito. Contrariamente, en TAE donde predomina la expresión de CDK4²²⁴, la falta de CDK6 no produce remodelación termogénica del tejido. Teniendo en cuenta los efectos mencionados del eje CDK4-RB-E2F1 en la promoción del metabolismo oxidativo en TAP, y del *browning* en los depósitos de TAB, sería interesante evaluar en los modelos deficientes/mutantes en CDK6 si la inducción del *browning* está mediada por la falta de actividad de CDK6 *per se* o podría existir una contribución de la promoción indirecta de la actividad de CDK4.

Otra de las limitaciones de este estudio es que debido a que CDK4 y CDK6 se expresan en la mayoría de los tipos celulares y tejidos, no podemos discernir entre los efectos directos e indirectos de la inhibición de CDK4/6 sobre el TAB. Un ejemplo de un efecto indirecto podría ser que la administración de PD-0332991 afecte negativamente la descarga del sistema nervioso simpático sobre el TAB. Esto podría resultar en la misma inhibición sobre la termogénesis basal y el *browning* que observamos *in vivo*. Si bien no podemos descartar ésta u otras contribuciones debidas a efectos de PD-0332991 en otros tejidos distintos al adiposo, nuestros resultados *in vitro* sobre la FEV y los adipocitos demuestran que existen mecanismos celulares intrínsecos del TAB mediando la inhibición del programa termogénico cuando se inhiben CDK4/6 *in vivo*.

Perspectivas

Si bien el *browning* es considerado un mecanismo adaptativo para el mantenimiento de la temperatura corporal, actualmente se conoce que también se estimula en otras situaciones de alta demanda metabólica tales como el ejercicio físico²²⁷⁻²²⁹, la caquexia asociada al cáncer, y en pacientes con quemaduras severas^{210,230}. En condiciones de alta demanda energética el aumento de la descarga simpática promueve la lipólisis en el TA con el consecuente aumento de los ácidos grasos libres intracelulares. Esto podría implicar un estrés metabólico para la célula, que en respuesta activaría la termogénesis UCP1-dependiente para aliviar la sobrecarga de energía disponible⁶⁶, por lo que el *browning* también podría ser secundario a un cambio en el contexto metabólico intracelular. No obstante, la asociación del *browning* con patologías de alta demanda metabólica es un hecho reciente, y los mecanismos moleculares que median su activación en estas condiciones aún no han sido examinados²³⁰.

A diferencia de los efectos benéficos del *browning* sobre el peso corporal y el metabolismo en estados de obesidad, la estimulación del *browning* observada durante el cáncer está asociada con efectos adversos²³⁰. La caquexia es un estado de fatiga y debilitamiento general que se caracteriza por un balance energético y proteico negativo debido a la reducción de la ingesta y a un metabolismo acelerado. Las estrategias destinadas a promover la ingesta tienen un potencial

terapéutico limitado ya que no corrigen la desregulación del metabolismo, por lo que el tratamiento de esta patología tiene un pronóstico muy pobre²³¹. En modelos de roedores de caquexia asociada al cáncer se observó que la inducción del *browning* es un evento temprano y sistémico en la patofisiología de la caquexia. Consecuentemente, se postula que sería uno de los mecanismos que contribuirían al hipermetabolismo y al gasto energético, mediando así el desarrollo y mantenimiento de los estados de caquexia^{230,232}. De acuerdo con esto se observó que la atenuación del *browning* con un antagonista de los receptores β 3-adrenérgicos reduce la severidad de la caquexia²³².

El uso de PD-0332991 como inhibidor de la proliferación celular en cáncer se encuentra en estado avanzado, principalmente en cáncer de mama, donde se lo utiliza desde el 2015. Incluso, actualmente su uso está siendo probado en el tratamiento como adyuvante en otros tipos de cánceres en combinación con inhibidores de diversas vías de señalización (RAF/MEK/ERK/PI3K)²³³. En esta tesis mostramos que la administración oral de PD-0332991 durante 10 días en roedores adultos inhibe la termogénesis basal y el *browning* estimulado por frío en los depósitos de TA epididimal e inguinal. Esta inhibición del programa termogénico del TA cuando se inhiben CDK4/6 sugiere que además de detener la progresión de los tumores por inhibición de la proliferación celular, la administración de PD-0332991 podría contribuir a disminuir la incidencia y severidad de los estados de caquexia asociados al cáncer, incrementando sus efectos benéficos en el tratamiento de esta patología. Por esto, creemos que sería interesante estudiar si la administración de PD-0332991 es capaz de inhibir la inducción temprana del *browning* en el establecimiento de la caquexia asociada al cáncer, y si esto contribuye a la mejora de la severidad de este estado hipermetabólico. Por otro lado, si bien la necesidad del *browning* para el desarrollo de caquexia se encuentra establecida²³², los mecanismos moleculares implicados en este proceso aún no han sido estudiados²³⁴, por lo que también creemos interesante profundizar en el estudio de los mismos.

CONCLUSIONES

Los resultados de esta tesis en conjunto con hallazgos de otros autores nos permitieron arribar a las siguientes conclusiones:

Capítulo I

- CDK4/6 actúan en la etapa de determinación de la adipogénesis promoviendo la generación de CPAs *beige*.
- CDK4/6 regularían el desarrollo del programa termogénico durante la diferenciación terminal del linaje *beige* mediante el control directo de la expresión de genes termogénicos, e indirecto, a través de la modulación de la expresión/actividad de PPAR γ .

Capítulo II

- CDK4/6 son necesarias para el mantenimiento del programa termogénico de los adipocitos.
- CDK4/6 modularían la conversión directa entre los distintos tipos de adipocitos.
- En TAE estas quinasas regulan funciones generales del adipocito.

Capítulo III

- En condiciones fisiológicas a temperatura ambiente, el tono basal de la vía CDK4/6 en TAB contribuye al mantenimiento de la termogénesis basal del tejido.
- Ante un estrés térmico, la actividad de CDK4/6 en el TAB es necesaria para la inducción normal del *browning*.
- CDK4/6 contribuyen al mantenimiento del pool de CPAs *beige* en los depósitos de TAB.
- CDK4/6 actuarían mediante los mismos efectores utilizados en el control del ciclo celular, pero los factores E2Fs serían represores transcripcionales.

Considerando nuestros resultados *in vitro*, los efectos en el tejido tendrían una contribución del rol de estas quinasas en la generación de adipocitos *beige* por adipogénesis y por transdiferenciación. De manera general proponemos que, en condiciones fisiológicas a temperatura ambiente, el tono basal de la vía CDK4/6 en adipocitos *beige* inactivos mantendría la termogénesis basal del tejido (Fig. 1). La llegada de un estímulo adrenérgico desencadenada por un estrés térmico induciría la activación de esta vía favoreciendo la generación/activación de adipocitos *beige* en el TAB (Fig. 2). En la adipogénesis, CDK4/6 serían importantes para la generación de los precursores *beige* y para su diferenciación. En la transdiferenciación, la activación de la vía de CDK4/6 por el estímulo adrenérgico provocaría la des-represión del programa termogénico en los adipocitos blancos/*beige* inactivos promoviendo su transdiferenciación/activación.

1. Temperatura ambiente

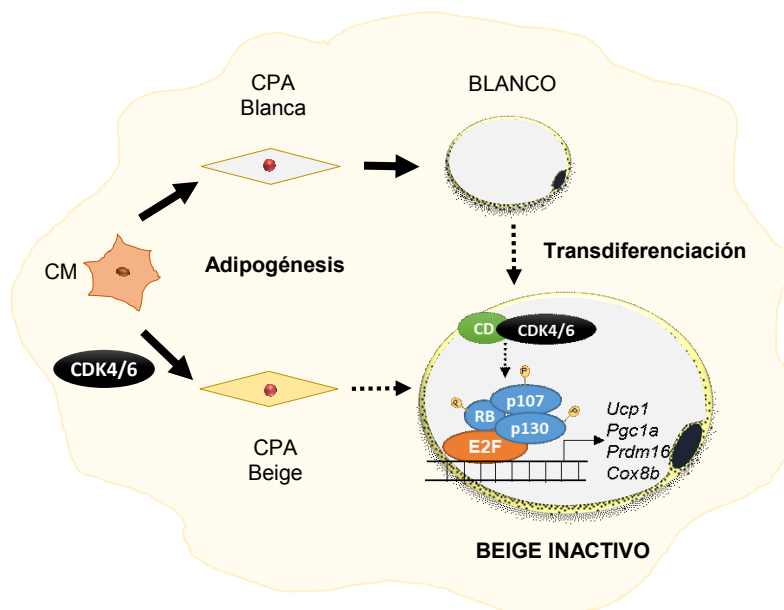


Figura 1: A temperatura ambiente el tono basal de la vía CDK4/6 contribuye al mantenimiento de la termogénesis basal del TAB. En estas condiciones en el TAB se encuentra favorecida la adipogénesis hacia adipocitos blancos, y los adipocitos beige existentes se encuentran inactivos. En adipocitos beige, la actividad basal de CDK4/6 permite una expresión baja de genes termogénicos (*Ucp1*, *Pgc1a*, *Prdm16*, *Cox8b*), y en la FEV contribuye al mantenimiento del pool de CPAs beige del tejido.

2. Frío (*browning*)

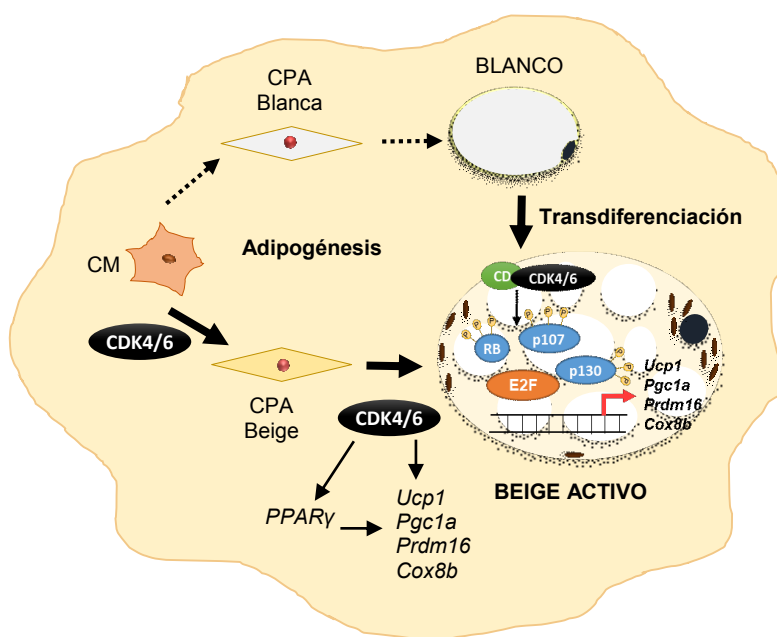


Figura 2: En frío la actividad de CDK4/6 en el TAB es necesaria para la inducción del *browning*. La llegada de un estímulo adrenérgico activaría la vía de CDK4/6. Por un lado, CDK4/6 participarían de la generación de adipocitos beige por adipogénesis donde contribuirían a la formación de las CPAs beige y a su diferenciación. Esto último sería mediante el control directo e indirecto (a través de PPAR γ) de la expresión de genes termogénicos. En adipocitos blancos/beige inactivos, la activación de CDK4/6 promovería la disociación de los complejos represivos E2Fs-proteínas del retinoblastoma. Esto aumentaría la transcripción de genes termogénicos (*Ucp1*, *Pgc1a*, *Prdm16*, *Cox8b*) contribuyendo así a la transdiferenciación blanco>beige/reactivación de los adipocitos beige del TAB.

En esta tesis proveemos evidencia que indica que CDK4 y/o CDK6 son necesarias para la generación de adipocitos *beige* por adipogénesis *de novo* y por transdiferenciación. Además, demostramos que son relevantes *in vivo*, donde la actividad de CDK4/6 resulta indispensable tanto para el mantenimiento de la termogénesis basal, como para la inducción del *browning* por frío en los depósitos de TA epididimal e inguinal. Estudios futuros destinados a discernir la contribución relativa de estas quinasas a los efectos observados, y los mecanismos moleculares implicados serían de gran utilidad para su modulación selectiva. Estos hallazgos constituyen otro ejemplo de la importancia de los reguladores del ciclo celular en el metabolismo.

BIBLIOGRAFÍA

1. WHO | Obesity. *WHO* (2014).
2. Apovian, C. M. Obesity: definition, comorbidities, causes, and burden. *Am. J. Manag. Care* **22**, s176-85 (2016).
3. Rubinstein, A., Kaler, M. & Espinosa, D. *4° Encuesta Nacional de Factores de Riesgo. Dirección Nacional de Promoción de la Salud y Control de Enfermedades Crónicas No Transmisibles. Informe definitivo.* (2018).
4. Rosen, E. D. & Spiegelman, B. M. What We Talk About When We Talk About Fat. *Cell* **156**, 20–44 (2014).
5. Longo, M. *et al.* Adipose tissue dysfunction as determinant of obesity-associated metabolic complications. *Int. J. Mol. Sci.* **20**, (2019).
6. Ye, J. Mechanisms of insulin resistance in obesity. *Frontiers of Medicine in China* **7**, 14–24 (2013).
7. Galic, S., Oakhill, J. S. & Steinberg, G. R. Adipose tissue as an endocrine organ. *Mol. Cell. Endocrinol.* **316**, 129–139 (2010).
8. Wozniak, S. E., Gee, L. L., Wachtel, M. S. & Frezza, E. E. Adipose tissue: the new endocrine organ? A review article. *Dig. Dis. Sci.* **54**, 1847–1856 (2009).
9. Halberg, N., Wernstedt-Asterholm, I. & Scherer, P. E. The adipocyte as an endocrine cell. *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.* **37**, 753–768, x–xi (2008).
10. Guglielmi, V. & Sbraccia, P. Obesity phenotypes: Depot-differences in adipose tissue and their clinical implications. *Eating and Weight Disorders* **23**, 3–14 (2018).
11. Lee, M. J., Wu, Y. & Fried, S. K. Adipose tissue heterogeneity: Implication of depot differences in adipose tissue for obesity complications. *Molecular Aspects of Medicine* **34**, 1–11 (2013).
12. Tchkonina, T. *et al.* Mechanisms and metabolic implications of regional differences among fat depots. *Cell Metabolism* **17**, 644–656 (2013).
13. Wajchenberg, B. L., Giannella-Neto, D., Da Silva, M. E. R. & Santos, R. F. Depot-specific hormonal characteristics of subcutaneous and visceral adipose tissue and their relation to the metabolic syndrome. *Hormone and Metabolic Research* **34**, 616–621 (2002).
14. Cannon, B. & Nedergaard, J. Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol. Rev.* **84**, 277–359 (2004).
15. Nicholls, D. G. The physiological regulation of uncoupling proteins. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics* **1757**, 459–466 (2006).
16. Sluse, F. E. *et al.* Mitochondrial UCPs: New insights into regulation and impact. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics* **1757**, 480–485 (2006).
17. Lehr, L. *et al.* The control of UCP1 is dissociated from that of PGC-1 α or of mitochondriogenesis as revealed by a study using β -less mouse brown adipocytes in culture. *FEBS Lett.* **580**, 4661–4666 (2006).
18. Fedorenko, A., Lishko, P. V. & Kirichok, Y. Mechanism of fatty-acid-dependent UCP1 uncoupling in brown fat mitochondria. *Cell* **151**, 400–413 (2012).
19. Bartelt, A. *et al.* Brown adipose tissue activity controls triglyceride clearance. *Nat. Med.* **17**, 200–206 (2011).
20. Villarroya, J., Cereijo, R. & Villarroya, F. An endocrine role for brown adipose tissue? *Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab.* **305**, (2013).
21. Villarroya, J. *et al.* New insights into the secretory functions of brown adipose tissue. *The Journal of endocrinology* **243**, R19–R27 (2019).
22. Yoneshiro, T. *et al.* Age-related decrease in cold-activated brown adipose tissue and accumulation of body fat in healthy humans. *Obesity* **19**, 1755–1760 (2011).
23. Nedergaard, J., Bengtsson, T. & Cannon, B. Unexpected evidence for active brown adipose tissue in adult humans. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism* **293**, E444-52 (2007).

24. Yoshimura, K. *et al.* Characterization of freshly isolated and cultured cells derived from the fatty and fluid portions of liposuction aspirates. *J. Cell. Physiol.* **208**, 64–76 (2006).
25. Varma, M. J. O. *et al.* Phenotypical and functional characterization of freshly isolated adipose tissue-derived stem cells. *Stem Cells Dev.* **16**, 91–104 (2007).
26. Macotela, Y. *et al.* Intrinsic differences in adipocyte precursor cells from different white fat depots. *Diabetes* **61**, 1691–9 (2012).
27. Rosen, E. D. & MacDougald, O. A. Adipocyte differentiation from the inside out. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **7**, 885–896 (2006).
28. Tang, Q. Q. & Lane, M. D. Adipogenesis: From Stem Cell to Adipocyte. *Annu. Rev. Biochem.* **81**, 715–736 (2012).
29. Wang, Q. A., Tao, C., Gupta, R. K. & Scherer, P. E. Tracking adipogenesis during white adipose tissue development, expansion and regeneration. *Nat. Med.* **19**, 1338–1344 (2013).
30. Shao, M. *et al.* Cellular Origins of Beige Fat Cells Revisited. *Diabetes* **68**, 1874–1885 (2019).
31. Lee, Y.-H., Petkova, A. P., Mottillo, E. P. & Granneman, J. G. In vivo identification of bipotential adipocyte progenitors recruited by β 3-adrenoceptor activation and high-fat feeding. *Cell Metab.* **15**, 480–91 (2012).
32. Tang, Q. Q. & Lane, M. D. Activation and centromeric localization of CCAAT/enhancer-binding proteins during the mitotic clonal expansion of adipocyte differentiation. *Genes Dev.* **13**, 2231–2241 (1999).
33. Tang, Q. Q., Otto, T. C. & Daniel Lane, M. Mitotic clonal expansion: A synchronous process required for adipogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 44–49 (2003).
34. Otto, T. C. & Lane, M. D. Adipose development: From stem cell to adipocyte. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* **40**, 229–242 (2005).
35. Qiu, Z. *et al.* DNA Synthesis and Mitotic Clonal Expansion Is Not a Required Step for 3T3-L1 Preadipocyte Differentiation into Adipocytes. *J. Biol. Chem.* **276**, 11988–11995 (2001).
36. Tang, Q. Q. & Lane, M. D. Adipogenesis: from stem cell to adipocyte. *Annu. Rev. Biochem.* **81**, 715–736 (2012).
37. Tang, Q. Q. & Lane, M. D. Adipogenesis: From Stem Cell to Adipocyte. *Annu. Rev. Biochem.* **81**, 715–736 (2012).
38. Lane, M. D., Tang, Q. Q. & Jiang, M. S. Role of the CCAAT enhancer binding proteins (C/EBPs) in adipocyte differentiation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **266**, 677–683 (1999).
39. Christy, R. J., Kaestner, K. H., Geiman, D. E. & Lane, M. D. CCAAT/enhancer binding protein gene promoter: binding of nuclear factors during differentiation of 3T3-L1 preadipocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **88**, 2593–2597 (1991).
40. Clarke, S. L., Robinson, C. E. & Gimble, J. M. CAAT/enhancer binding proteins directly modulate transcription from the peroxisome proliferator-activated receptor gamma 2 promoter. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **240**, 99–103 (1997).
41. MacDougald, O. A. & Lane, M. D. Transcriptional Regulation of Gene Expression During Adipocyte Differentiation. *Annu. Rev. Biochem.* **64**, 345–373 (1995).
42. Hwang, C.-S., Loftus, T. M., Mandrup, S. & Daniel Lane, M. ADIPOCYTE DIFFERENTIATION AND LEPTIN EXPRESSION. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **13**, (1997).
43. Rosen, E. D. & Spiegelman, B. M. Molecular Regulation of Adipogenesis. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **16**, 145–171 (2000).
44. Rosen, E. D. *et al.* C/EBP α induces adipogenesis through PPAR γ : A unified pathway. *Genes Dev.* **16**, 22–26 (2002).

45. Wu, Z. *et al.* Cross-regulation of C/EBP α and PPAR γ controls the transcriptional pathway of adipogenesis and insulin sensitivity. *Mol. Cell* **3**, 151–158 (1999).
46. Zuo, Y., Qiang, L. & Farmer, S. R. Activation of CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP) α expression by C/EBP β during adipogenesis requires a peroxisome proliferator-activated receptor- γ -associated repression of HDAC1 at the C/ebp α gene promoter. *J. Biol. Chem.* **281**, 7960–7967 (2006).
47. Tontonoz, P., Hu, E. & Spiegelman, B. M. Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR γ 2, a lipid-activated transcription factor. *Cell* **79**, 1147–1156 (1994).
48. Egan, J. J. *et al.* Mechanism of hormone-stimulated lipolysis in adipocytes: Translocation of hormone-sensitive lipase to the lipid storage droplet. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **89**, 8537–8541 (1992).
49. Tamori, Y., Masugi, J., Nishino, N. & Kasuga, M. Role of peroxisome proliferator-activated receptor- γ in maintenance of the characteristics of mature 3T3-L1 adipocytes. *Diabetes* **51**, 2045–2055 (2002).
50. Imai, T. *et al.* Peroxisome proliferator-activated receptor γ is required in mature white and brown adipocytes for their survival in the mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 4543–4547 (2004).
51. Fajas, L., Fruchart, J.-C. & Auwerx, J. PPAR γ 3 mRNA: a distinct PPAR γ mRNA subtype transcribed from an independent promoter. *FEBS Lett.* **438**, 55–60 (1998).
52. Tontonoz, P. & Spiegelman, B. M. Fat and beyond: the diverse biology of PPAR γ . *Annu. Rev. Biochem.* **77**, 289–312 (2008).
53. Tontonoz, P., Hu, E., Graves, R. A., Budavari, A. I. & Spiegelman, B. M. mPPAR γ 2: Tissue-specific regulator of an adipocyte enhancer. *Genes Dev.* **8**, 1224–1234 (1994).
54. Nielsen, R. *et al.* Genome-wide profiling of PPAR γ :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 (2008).
55. Kliewer, S. A., Umesono, K., Mangelsdorf, D. J. & Evans, R. M. Retinoid X receptor interacts with nuclear receptors in retinoic acid, thyroid hormone and vitamin D3 signalling. *Nature* **355**, 446–449 (1992).
56. Kliewer, S. A. *et al.* Fatty acids and eicosanoids regulate gene expression through direct interactions with peroxisome proliferator-activated receptors α and γ . *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, 4318–4323 (1997).
57. Harris, P. K. & Kletzien, R. F. Localization of a pioglitazone response element in the adipocyte fatty acid-binding protein gene. *Mol. Pharmacol.* **45**, (1994).
58. Lehmann, J. M. *et al.* An antidiabetic thiazolidinedione is a high affinity ligand for peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ). *J. Biol. Chem.* **270**, 12953–12956 (1995).
59. Willson, T. M., Lambert, M. H. & Kliewer, S. A. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ and Metabolic Disease. *Annu. Rev. Biochem.* **70**, 341–367 (2001).
60. Willson, T. M. *et al.* The structure - Activity relationship between peroxisome proliferator-activated receptor γ agonism and the antihyperglycemic activity of thiazolidinediones. *J. Med. Chem.* **39**, 665–668 (1996).
61. Henke, B. R. *et al.* N-(2-benzoylphenyl)-L-tyrosine PPAR γ agonists. 1. Discovery of a novel series of potent antihyperglycemic and antihyperlipidemic agents. *J. Med. Chem.* **41**, 5020–5036 (1998).
62. Agostini, M. *et al.* Non-DNA binding, dominant-negative, human PPAR γ mutations cause lipodystrophic insulin resistance. *Cell Metab.* **4**, 303–311 (2006).
63. Barroso, I. *et al.* Dominant negative mutations in human PPAR γ associated with severe insulin resistance, diabetes mellitus and hypertension. *Nature* **402**, 880–883 (1999).
64. Cariou, B., Charbonnel, B. & Staels, B. Thiazolidinediones and PPAR γ agonists: Time for a reassessment. *Trends in Endocrinology and Metabolism* **23**, 205–215 (2012).
65. Vitali, A. *et al.* The adipose organ of obesity-prone C57BL/6J mice is composed of mixed white and brown

- adipocytes. *J. Lipid Res.* **53**, 619–29 (2012).
66. Sanchez-Gurmaches, J., Hung, C.-M. & Guertin, D. A. Emerging Complexities in Adipocyte Origins and Identity. *Trends Cell Biol.* **26**, 313–26 (2016).
67. Zhang, F. *et al.* An Adipose Tissue Atlas: An Image-Guided Identification of Human-like BAT and Beige Depots in Rodents. *Cell Metab.* **27**, 252–262.e3 (2018).
68. Guerra, C., Koza, R. A., Yamashita, H., Walsh, K. & Kozak, L. P. Emergence of brown adipocytes in white fat in mice is under genetic control effects on body weight and adiposity. *J. Clin. Invest.* **102**, 412–420 (1998).
69. Xue, B. *et al.* Genetic variability affects the development of brown adipocytes in white fat but not in interscapular brown fat. *J. Lipid Res.* **48**, 41–51 (2007).
70. Almind, K. & Kahn, C. R. Genetic determinants of energy expenditure and insulin resistance in diet-induced obesity in mice. *Diabetes* **53**, 3274–3285 (2004).
71. Shao M1, Ishibashi J2, Kusminski CM1, Wang QA1, Hepler C1, Vishvanath L1, MacPherson KA1, Spurgin SB1, Sun K1, Holland WL1, Seale P2, G. R. Zfp423 Maintains White Adipocyte Identity through Suppression of the Beige Cell Thermogenic Gene Program.
72. Altshuler-Keylin, S. *et al.* Beige Adipocyte Maintenance Is Regulated by Autophagy-Induced Mitochondrial Clearance. *Cell Metab.* **24**, 402–419 (2016).
73. Seale, P. *et al.* Prdm16 determines the thermogenic program of subcutaneous white adipose tissue in mice. *J. Clin. Invest.* **121**, 96–105 (2011).
74. Collins, S., Daniel, K. W., Petro, A. E. & Surwit, R. S. Strain-specific response to β 3-adrenergic receptor agonist treatment of diet-induced obesity in mice. *Endocrinology* **138**, 405–413 (1997).
75. Wu, J. *et al.* Beige Adipocytes Are a Distinct Type of Thermogenic Fat Cell in Mouse and Human. *Cell* **150**, 366–376 (2012).
76. Petrovic, N. *et al.* Chronic peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) activation of epididymally derived white adipocyte cultures reveals a population of thermogenically competent, UCP1-containing adipocytes molecularly distinct from classic brown adipocyte. *J. Biol. Chem.* **285**, 7153–64 (2010).
77. Forner, F. *et al.* Proteome Differences between Brown and White Fat Mitochondria Reveal Specialized Metabolic Functions. *Cell Metab.* **10**, 324–335 (2009).
78. Seale, P. *et al.* PRDM16 controls a brown fat/skeletal muscle switch. *Nature* **454**, 961–7 (2008).
79. Timmons, J. A. *et al.* Myogenic gene expression signature establishes that brown and white adipocytes originate from distinct cell lineages. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 4401–4406 (2007).
80. Wang, W. & Seale, P. Control of brown and beige fat development. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **17**, 691–702 (2016).
81. Long, J. Z. *et al.* A smooth muscle-like origin for beige adipocytes. *Cell Metab.* **19**, 810–820 (2014).
82. Roh, H. C. *et al.* Warming Induces Significant Reprogramming of Beige, but Not Brown, Adipocyte Cellular Identity. *Cell Metab.* **27**, 1121–1137.e5 (2018).
83. Wu, J. *et al.* Beige adipocytes are a distinct type of thermogenic fat cell in mouse and human. *Cell* **150**, 366–376 (2012).
84. Wang, W. *et al.* Ebf2 is a selective marker of brown and beige adipogenic precursor cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **111**, 14466–14471 (2014).
85. Shabalina, I. G. *et al.* UCP1 in Brite/Beige adipose tissue mitochondria is functionally thermogenic. *Cell Rep.* **5**, 1196–1203 (2013).
86. Schulz, T. J. *et al.* Identification of inducible brown adipocyte progenitors residing in skeletal muscle and white fat. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **108**, 143–148 (2011).

87. Vegiopoulos, A. *et al.* Cyclooxygenase-2 controls energy homeostasis in mice by de novo recruitment of brown adipocytes. *Science* **328**, 1158–61 (2010).
88. Himms-Hagen, J. *et al.* Multilocular fat cells in WAT of CL-316243-treated rats derive directly from white adipocytes. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **279**, C670-81 (2000).
89. Barbatelli, G. *et al.* The emergence of cold-induced brown adipocytes in mouse white fat depots is determined predominantly by white to brown adipocyte transdifferentiation. *AJP Endocrinol. Metab.* **298**, E1244–E1253 (2010).
90. Lee, Y. H., Petkova, A. P., Konkar, A. A. & Granneman, J. G. Cellular origins of cold-induced brown adipocytes in adult mice. *FASEB J.* **29**, 286–299 (2015).
91. Rosenwald, M., Perdikari, A., Rüllicke, T. & Wolfrum, C. Bi-directional interconversion of brite and white adipocytes. *Nat. Cell Biol.* **15**, (2013).
92. Altshuler-Keylin, S. *et al.* Beige Adipocyte Maintenance Is Regulated by Autophagy-Induced Mitochondrial Clearance. *Cell Metab.* **24**, 402–419 (2016).
93. Stine, R. R. *et al.* EBF2 promotes the recruitment of beige adipocytes in white adipose tissue. *Mol. Metab.* **5**, 57–65 (2016).
94. Kazak, L. *et al.* A Creatine-Driven Substrate Cycle Enhances Energy Expenditure and Thermogenesis in Beige Fat. *Cell* **163**, 643–655 (2015).
95. Bertholet, A. M. *et al.* Mitochondrial Patch Clamp of Beige Adipocytes Reveals UCP1-Positive and UCP1-Negative Cells Both Exhibiting Futile Creatine Cycling. *Cell Metab.* **25**, 811-822.e4 (2017).
96. Chouchani, E. T., Kazak, L. & Spiegelman, B. M. New Advances in Adaptive Thermogenesis: UCP1 and Beyond. *Cell Metab.* **29**, 27–37 (2019).
97. Rosen, E. D. *et al.* PPAR γ is required for the differentiation of adipose tissue in vivo and in vitro. *Mol. Cell* **4**, 611–617 (1999).
98. Barak, Y. *et al.* PPAR γ is required for placental, cardiac, and adipose tissue development. *Mol. Cell* **4**, 585–595 (1999).
99. Siersbaek, M. S. *et al.* Genome-Wide Profiling of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ in Primary Epididymal, Inguinal, and Brown Adipocytes Reveals Depot-Selective Binding Correlated with Gene Expression. *Mol. Cell. Biol.* **32**, 3452–3463 (2012).
100. Rajakumari, S. *et al.* EBF2 Determines and Maintains Brown Adipocyte Identity. *Cell Metab.* **17**, 562–574 (2013).
101. Seale, P. *et al.* Transcriptional Control of Brown Fat Determination by PRDM16. *Cell Metab.* **6**, 38–54 (2007).
102. Cohen, P. *et al.* Ablation of PRDM16 and beige adipose causes metabolic dysfunction and a subcutaneous to visceral fat switch. *Cell* **156**, 304–316 (2014).
103. Seale, P. *et al.* Prdm16 determines the thermogenic program of subcutaneous white adipose tissue in mice. *J. Clin. Invest.* **121**, 96–105 (2011).
104. Harms, M. J. *et al.* PRDM16 binds MED1 and controls chromatin architecture to determine a brown fat transcriptional program. *Genes Dev.* **29**, 298–307 (2015).
105. Iida, S., Chen, W., Nakadai, T., Ohkuma, Y. & Roeder, R. G. PRDM16 enhances nuclear receptor-dependent transcription of the brown fat-specific *Ucp1* gene through interactions with mediator subunit MED1. *Genes Dev.* **29**, 308–321 (2015).
106. Kajimura, S. *et al.* Regulation of the brown and white fat gene programs through a PRDM16/CtBP transcriptional complex. *Genes Dev.* **22**, 1397–1409 (2008).
107. Ohno, H., Shinoda, K., Ohyama, K., Sharp, L. Z. & Kajimura, S. EHMT1 controls brown adipose cell fate and

- thermogenesis through the PRDM16 complex. *Nature* **504**, 163–167 (2013).
108. Lin, J. *et al.* Defects in adaptive energy metabolism with CNS-linked hyperactivity in PGC-1 α null mice. *Cell* **119**, 121–135 (2004).
109. Uldry, M. *et al.* Complementary action of the PGC-1 coactivators in mitochondrial biogenesis and brown fat differentiation. *Cell Metab.* **3**, 333–341 (2006).
110. Kleiner, S. *et al.* Development of insulin resistance in mice lacking PGC-1 α in adipose tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**, 9635–9640 (2012).
111. Puigserver, P. *et al.* Activation of PPAR γ coactivator-1 through transcription factor docking. *Science (80-.)*. **286**, 1368–1371 (1999).
112. Puigserver, P. *et al.* A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis. *Cell* **92**, 829–839 (1998).
113. Wu, Z. *et al.* Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1. *Cell* **98**, 115–124 (1999).
114. Tiraby, C. & Langin, D. [PGC-1 α , a transcriptional coactivator involved in metabolism]. *Med. Sci. (Paris)*. **21**, 49–54 (2005).
115. Norbury, C. & Nurse, P. Animal Cell Cycles and Their Control. *Annu. Rev. Biochem.* **61**, 441–468 (1992).
116. Schafer, K. A. The Cell Cycle: A Review. *Veterinary Pathology* **35**, 461–478 (1998).
117. Vermeulen, K., Van Bockstaele, D. R. & Berneman, Z. N. The cell cycle: A review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Proliferation* **36**, 131–149 (2003).
118. Asghar, U., Witkiewicz, A. K., Turner, N. C. & Knudsen, E. S. The history and future of targeting cyclin-dependent kinases in cancer therapy. *Nature Reviews Drug Discovery* **14**, 130–146 (2015).
119. Elledge, S. J. Cell cycle checkpoints: Preventing an identity crisis. *Science* **274**, 1664–1672 (1996).
120. Rickert, P., Corden, J. L. & Lees, E. Cyclin C/CDK8 and cyclin H/CDK7/p36 are biochemically distinct CTD kinases. *Oncogene* **18**, 1093–102 (1999).
121. Pines, J. Cyclins and cyclin-dependent kinases: Theme and variations. *Advances in Cancer Research* **66**, 181–212 (1995).
122. Garcia-murillas, I. *et al.* Early Adaptation and Acquired Resistance to CDK4/6 Inhibition in Estrogen Receptor-Positive Breast Cancer. *Cancer Res.* **76**, 2301–2313 (2017).
123. Pines, J. Cyclins: wheels within wheels. *Cell growth & differentiation : the molecular biology journal of the American Association for Cancer Research* **2**, 305–310 (1991).
124. Darzynkiewicz, Z., Gong, J., Juan, G., Ardelt, B. & Traganos, F. *Cytometry of Cyclin Proteins*. doi:10.1002/(SICI)1097-0320(19960901)25:1<1::AID-CYTO1>3.0.CO;2-N
125. Schafer, K. A. The Cell Cycle: A Review. *Vet. Pathol.* **35**, 461–478 (1998).
126. Witkiewicz, A. K., Knudsen, K. E., Dicker, A. P. & Knudsen, E. S. The meaning of p16ink4a expression in tumors: Functional significance, clinical associations and future developments. *Cell Cycle* **10**, 2497–2503 (2011).
127. Serrano, M., Hannon, G. J. & Beach, D. A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. *Nature* **366**, 704–707 (1993).
128. Cerqueira, A. *et al.* Genetic Characterization of the Role of the Cip/Kip Family of Proteins as Cyclin-Dependent Kinase Inhibitors and Assembly Factors. *Mol. Cell. Biol.* **34**, 1452–1459 (2014).
129. Labaer, J. *et al.* New functional activities for the p21 family of CDK inhibitors. *Genes Dev.* **11**, 847–862 (1997).
130. Sherr, C. J. D-type cyclins. *Trends in Biochemical Sciences* **20**, 187–190 (1995).

131. Diehl, J. A. Cycling to cancer with cyclin D1. *Cancer Biology and Therapy* **1**, 226–231 (2002).
132. Lim, S. & Kaldis, P. Cdk, cyclins and CKIs: Roles beyond cell cycle regulation. *Development (Cambridge)* **140**, 3079–3093 (2013).
133. Terada, Y., Tatsuka, M., Jinno, S. & Okayama, H. Requirement for tyrosine phosphorylation of Cdk4 in G1 arrest induced by ultraviolet irradiation. *Nature* **376**, 358–362 (1995).
134. Bertero, T. *et al.* CDC25A targeting by miR-483-3p decreases CCND-CDK4/6 assembly and contributes to cell cycle arrest. *Cell Death Differ.* **20**, 800–811 (2013).
135. Cheng, M., Sexl, V., Sherr, C. J. & Roussel, M. F. Assembly of cyclin D-dependent kinase and titration of p27Kip1 regulated by mitogen-activated protein kinase kinase (MEK1). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 1091–1096 (1998).
136. Kato, J., Matsushime, H., Hiebert, S. W., Ewen, M. E. & Sherr, C. J. Direct binding of cyclin D to the retinoblastoma gene product (pRb) and pRb phosphorylation by the cyclin D-dependent kinase CDK4. *Genes Dev.* **7**, 331–342 (1993).
137. Matsushime, H. *et al.* D-type cyclin-dependent kinase activity in mammalian cells. *Mol. Cell. Biol.* **14**, 2066–2076 (1994).
138. Burkhart, D. L. & Sage, J. Cellular mechanisms of tumour suppression by the retinoblastoma gene. *Nature Reviews Cancer* **8**, 671–682 (2008).
139. Knudsen, E. S. & Knudsen, K. E. Tailoring to RB: Tumour suppressor status and therapeutic response. *Nature Reviews Cancer* **8**, 714–724 (2008).
140. Sherr, C. J. Cancer cell cycles. *Science* **274**, 1672–1674 (1996).
141. Bartkova, J. *et al.* Oncogene-induced senescence is part of the tumorigenesis barrier imposed by DNA damage checkpoints. *Nature* **444**, 633–637 (2006).
142. LaPak, K. M. & Burd, C. E. The molecular balancing act of p16ink4a in cancer and aging. *Molecular Cancer Research* **12**, 167–183 (2014).
143. Motokura, T. *et al.* A novel cyclin encoded by a bcl1-linked candidate oncogene. *Nature* **350**, 512–515 (1991).
144. Zhang, Y. J. *et al.* Amplification and overexpression of cyclin D1 in human hepatocellular carcinoma. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **196**, 1010–6 (1993).
145. Khatib, Z. A. *et al.* Coamplification of the CDK4 Gene with MDM2 and GLI in Human Sarcomas. *Cancer Res.* **53**, 5535–5541 (1993).
146. Toogood, P. L. *et al.* Discovery of a potent and selective inhibitor of cyclin-dependent kinase 4/6. *J. Med. Chem.* **48**, 2388–2406 (2005).
147. Zhang, Y. X. *et al.* Antiproliferative effects of CDK4/6 inhibition in CDK4-amplified human liposarcoma in vitro and in vivo. *Mol. Cancer Ther.* **13**, 2184–2193 (2014).
148. Gelbert, L. M. *et al.* Preclinical characterization of the CDK4/6 inhibitor LY2835219: In-vivo cell cycle-dependent/independent anti-tumor activities alone/in combination with gemcitabine. *Invest. New Drugs* **32**, 825–837 (2014).
149. Fry, D. W. *et al.* Specific inhibition of cyclin-dependent kinase 4/6 by PD 0332991 and associated antitumor activity in human tumor xenografts. *Molecular Cancer Therapeutics* **3**, 1427–1437 (2004).
150. Finn, R. *et al.* Abstract S1-6: Results of a randomized phase 2 study of PD 0332991, a cyclin-dependent kinase (CDK) 4/6 inhibitor, in combination with letrozole vs letrozole alone for first-line treatment of ER+/HER2– advanced breast cancer (BC). in *Cancer Research* **72**, S1-6-S1-6 (American Association for Cancer Research (AACR), 2012).

151. Finn, R. S. *et al.* Abstract CT101: Final results of a randomized Phase II study of PD 0332991, a cyclin-dependent kinase (CDK)-4/6 inhibitor, in combination with letrozole vs letrozole alone for first-line treatment of ER+/HER2- advanced breast cancer (PALOMA-1; TRIO-18). in *Cancer Research* **74**, CT101–CT101 (American Association for Cancer Research (AACR), 2014).
152. Finn, R. S. *et al.* The cyclin-dependent kinase 4/6 inhibitor palbociclib in combination with letrozole versus letrozole alone as first-line treatment of oestrogen receptor-positive, HER2-negative, advanced breast cancer (PALOMA-1/TRIO-18): A randomised phase 2 study. *Lancet Oncol.* **16**, 25–35 (2015).
153. Blanchet, E., Annicotte, J.-S. & Fajas, L. Cell cycle regulators in the control of metabolism. *Cell Cycle* **8**, 4029–31 (2009).
154. Garrido-Sánchez, L. *et al.* CCNG2 and CDK4 is associated with insulin resistance in adipose tissue. *Surg. Obes. Relat. Dis.* **10**, 691–6
155. Lopez-Mejia, I. C., Castillo-Armengol, J., Lagarrigue, S. & Fajas, L. Role of cell cycle regulators in adipose tissue and whole body energy homeostasis. *Cell. Mol. Life Sci.* **75**, 975–987 (2018).
156. Warburg, O. *The metabolism of tumours investigations from the Kaiser Wilhelm institute for biology, Berlin-Dahlem*,. (Constable & Co. Ltd., 1930).
157. Warburg, O. On the origin of cancer cells. *Science (80-)*. **123**, 309–314 (1956).
158. WEINHOUSE, S. On respiratory impairment in cancer cells. *Science* **124**, 267–9 (1956).
159. Jones, R. G. & Thompson, C. B. Tumor suppressors and cell metabolism: A recipe for cancer growth. *Genes and Development* **23**, 537–548 (2009).
160. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* **144**, 646–674 (2011).
161. POTTER, V. R. The biochemical approach to the cancer problem. *Fed. Proc.* **17**, 691–697 (1958).
162. Heiden, M. G. V., Cantley, L. C. & Thompson, C. B. Understanding the warburg effect: The metabolic requirements of cell proliferation. *Science* **324**, 1029–1033 (2009).
163. Fajas, L. Re-thinking cell cycle regulators: the cross-talk with metabolism. *Front. Oncol.* **3**, 4 (2013).
164. Sarruf, D. A. *et al.* Cyclin D3 promotes adipogenesis through activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *Mol. Cell. Biol.* **25**, 9985–95 (2005).
165. Abella, A. *et al.* Cdk4 promotes adipogenesis through PPARgamma activation. *Cell Metab.* **2**, 239–249 (2005).
166. Fajas, L. *et al.* E2Fs regulate adipocyte differentiation. *Dev. Cell* **3**, 39–49 (2002).
167. Fu, M. *et al.* Cyclin D1 inhibits peroxisome proliferator-activated receptor γ -mediated adipogenesis through histone deacetylase recruitment. *J. Biol. Chem.* **280**, 16934–16941 (2005).
168. Fajas, L. *et al.* Impaired pancreatic growth, β cell mass, and β cell function in E2F1-7-/- mice. *J. Clin. Invest.* **113**, 1288–1295 (2004).
169. Sarruf, D. A. *et al.* Cyclin D3 Promotes Adipogenesis through Activation of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor . *Mol. Cell. Biol.* **25**, 9985–9995 (2005).
170. Dali-Youcef, N. *et al.* Adipose tissue-specific inactivation of the retinoblastoma protein protects against diabetes because of increased energy expenditure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 10703–8 (2007).
171. Lagarrigue, S. *et al.* CDK4 is an essential insulin effector in adipocytes. *J. Clin. Invest.* **126**, 335–48 (2016).
172. Fajas, L. & Lopez-Mejia, I. C. CDK4, a new metabolic sensor that antagonizes AMPK. *Mol. Cell. Oncol.* **5**, e1409862 (2018).
173. Lopez-Mejia, I. C. *et al.* CDK4 Phosphorylates AMPK α 2 to Inhibit Its Activity and Repress Fatty Acid Oxidation. *Mol. Cell* **68**, 336-349.e6 (2017).
174. Lee, Y. *et al.* Cyclin D1-Cdk4 controls glucose metabolism independently of cell cycle progression. *Nature*

- 510**, 547–51 (2014).
175. Ahonen, M. A. *et al.* miR-107 inhibits CDK6 expression, differentiation, and lipid storage in human adipocytes. *Mol. Cell. Endocrinol.* **479**, 110–116 (2019).
176. Sun, F. *et al.* Downregulation of CCND1 and CDK6 by miR-34a induces cell cycle arrest. *FEBS Lett.* **582**, 1564–1568 (2008).
177. Nih, Od, Oer & Olaw. *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. Eighth Edition Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals Institute for Laboratory Animal Research Division on Earth and Life Studies.* (2011).
178. Fry, D. W. *et al.* Specific inhibition of cyclin-dependent kinase 4/6 by PD 0332991 and associated antitumor activity in human tumor xenografts. *Molecular Cancer Therapeutics* **3**, 1427–1437 (2004).
179. Sacaan, A. I. *et al.* CDK4/6 Inhibition on Glucose and Pancreatic Beta Cell Homeostasis in Young and Aged Rats. *Mol. Cancer Res.* molcanres.0172.2017 (2017). doi:10.1158/1541-7786.MCR-17-0172
180. Chen, J., Dodson, M. V. & Jiang, Z. Cellular and molecular comparison of redifferentiation of intramuscular and visceral-adipocyte derived progeny cells. *Int. J. Biol. Sci.* **6**, 80–88 (2010).
181. Abcam. *Protocols Book.* (Abcam).
182. D'Agostino, R. B. *Goodness-of-Fit-Techniques.* (Marcel Dekker Inc., 1986).
183. Wei, J., Carroll, R. J., Harden, K. K. & Wu, G. Comparisons of treatment means when factors do not interact in two-factorial studies. *Amino Acids* **42**, 2031–2035 (2012).
184. Berry, D. A. The difficult and ubiquitous problems of multiplicities. *Pharm. Stat.* **6**, 155–160 (2007).
185. Motulsky, H. *Intuitive Biostatistics: a Nonmathematical Guide to Statistical Thinking, 2nd Revised Editio.* (2010).
186. Holm, S. A Simple Sequentially Rejective Multiple Test Procedure. *Scand. J. Stat.* **6**, 65–70 (1979).
187. Stanton A., G. *Primer of Biostatistic. Sixth Edition.* (MC Graw Hill, 2005).
188. Aickin, M. & Gensler, H. Adjusting for multiple testing when reporting research results: The Bonferroni vs Holm methods. *Am. J. Public Health* **86**, 726–728 (1996).
189. Zubiría, M. G., Vidal-Bravo, J., Spinedi, E. & Giovambattista, A. Relationship between impaired adipogenesis of retroperitoneal adipose tissue and hypertrophic obesity: role of endogenous glucocorticoid excess. *J. Cell. Mol. Med.* **18**, 1549–1561 (2014).
190. Wang, C. *et al.* Cyclin D1 repression of nuclear respiratory factor 1 integrates nuclear DNA synthesis and mitochondrial function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 11567–11572 (2006).
191. Baltzer, C., Tiefenböck, S. K., Marti, M. & Frei, C. Nutrition controls mitochondrial biogenesis in the Drosophila adipose tissue through Delg and cyclin D/Cdk4. *PLoS One* **4**, (2009).
192. Pfannenber, C. *et al.* Impact of age on the relationships of brown adipose tissue with sex and adiposity in humans. *Diabetes* **59**, 1789–1793 (2010).
193. Cypess, A. M. *et al.* Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans. *N. Engl. J. Med.* **360**, 1509–1517 (2009).
194. van den Beukel, J. C. *et al.* Cold Exposure Partially Corrects Disturbances in Lipid Metabolism in a Male Mouse Model of Glucocorticoid Excess. *Endocrinology* **156**, 4115–4128 (2015).
195. Kajimura, S., Spiegelman, B. M. & Seale, P. Brown and beige fat: Physiological roles beyond heat generation. *Cell Metabolism* **22**, 546–559 (2015).
196. Guo, J. *et al.* Stromal vascular fraction: A regenerative reality? Part 2: Mechanisms of regenerative action. *Journal of Plastic, Reconstructive and Aesthetic Surgery* **69**, 180–188 (2016).
197. Bora, P. & Majumdar, A. S. Adipose tissue-derived stromal vascular fraction in regenerative medicine: A brief

- review on biology and translation. *Stem Cell Research and Therapy* **8**, (2017).
198. Berry, R. & Rodeheffer, M. S. Characterization of the adipocyte cellular lineage in vivo. *Nat. Cell Biol.* **15**, 302–308 (2013).
199. Joe, A. W. B. *et al.* Muscle injury activates resident fibro/adipogenic progenitors that facilitate myogenesis. *Nat. Cell Biol.* **12**, 153–163 (2010).
200. Uezumi, A., Fukada, S. I., Yamamoto, N., Takeda, S. & Tsuchida, K. Mesenchymal progenitors distinct from satellite cells contribute to ectopic fat cell formation in skeletal muscle. *Nat. Cell Biol.* **12**, 143–152 (2010).
201. Hansen, J. B. *et al.* Retinoblastoma protein functions as a molecular switch determining white versus brown adipocyte differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 4112–4117 (2004).
202. Scimè, A. *et al.* Rb and p107 regulate preadipocyte differentiation into white versus brown fat through repression of PGC-1alpha. *Cell Metab.* **2**, 283–95 (2005).
203. Hansen, J. B., te Riele, H. & Kristiansen, K. Novel function of the retinoblastoma protein in fat: regulation of white versus brown adipocyte differentiation. *Cell Cycle* **3**, 774–778 (2004).
204. De Sousa, M., Porras, D. P., Perry, C. G. R., Seale, P. & Scimè, A. p107 is a crucial regulator for determining the adipocyte lineage fate choices of stem cells. *Stem Cells* **32**, 1323–36 (2014).
205. Rosenwald, M., Perdikari, A., Rüllicke, T. & Wolfrum, C. Bi-directional interconversion of brite and white adipocytes. *Nat. Cell Biol.* **15**, 659–667 (2013).
206. Hansen, J. B. *et al.* Retinoblastoma protein functions as a molecular switch determining white versus brown adipocyte differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 4112–4117 (2004).
207. Rabhi, N. *et al.* Cdkn2a deficiency promotes adipose tissue browning. *Mol. Metab.* **8**, 65–76 (2018).
208. Bowers, S. L., Bilbo, S. D., Dhabhar, F. S. & Nelson, R. J. Stressor-specific alterations in corticosterone and immune responses in mice. *Brain. Behav. Immun.* **22**, 105–113 (2008).
209. van den Beukel, J. C. *et al.* Direct activating effects of adrenocorticotrophic hormone (ACTH) on brown adipose tissue are attenuated by corticosterone. *FASEB J.* **28**, 4857–4867 (2014).
210. Abdullahi, A. *et al.* Browning of white adipose tissue after a burn injury promotes hepatic steatosis and dysfunction. *Cell Death Dis.* **10**, (2019).
211. Fajas, L., Blanchet, E. & Annicotte, J.-S. CDK4, pRB and E2F1: connected to insulin. *Cell Div.* **5**, 6 (2010).
212. Rane, S. G. *et al.* Loss of Cdk4 expression causes insulin-deficient diabetes and Cdk4 activation results in β -islet cell hyperplasia. *Nat. Genet.* **22**, 44–52 (1999).
213. Tschen, S. I., Dhawan, S., Gurlo, T. & Bhushan, A. Age-dependent decline in β -cell proliferation restricts the capacity of β -cell regeneration in mice. *Diabetes* **58**, 1312–1320 (2009).
214. Teta, M., Long, S. Y., Wartschow, L. M., Rankin, M. M. & Kushner, J. A. Very slow turnover of β -cells in aged adult mice. *Diabetes* **54**, 2557–2567 (2005).
215. Dor, Y., Brown, J., Martinez, O. I. & Melton, D. A. Adult pancreatic β -cells are formed by self-duplication rather than stem-cell differentiation. *Nature* **429**, 41–46 (2004).
216. Gregg, B. E. *et al.* Formation of a Human β -Cell Population within Pancreatic Islets Is Set Early in Life. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **97**, 3197–3206 (2012).
217. Verma, S. *et al.* Palbociclib in Combination With Fulvestrant in Women With Hormone Receptor-Positive/HER2-Negative Advanced Metastatic Breast Cancer: Detailed Safety Analysis From a Multicenter, Randomized, Placebo-Controlled, Phase III Study (PALOMA-3). *Oncologist* **21**, 1165–1175 (2016).
218. Zuriaga, M. A., Fuster, J. J., Gokce, N. & Walsh, K. Humans and Mice Display Opposing Patterns of “Browning” Gene Expression in Visceral and Subcutaneous White Adipose Tissue Depots. *Front. Cardiovasc. Med.* **4**, 27 (2017).

219. Almind, K., Manieri, M., Sivitz, W. I., Cinti, S. & Kahn, C. R. Ectopic brown adipose tissue in muscle provides a mechanism for differences in risk of metabolic syndrome in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 2366–2371 (2007).
220. Kwok, K. H. M., Lam, K. S. L. & Xu, A. Heterogeneity of white adipose tissue: Molecular basis and clinical implications. *Experimental and Molecular Medicine* **48**, (2016).
221. Li, Y., Bolze, F., Fromme, T. & Klingenspor, M. Intrinsic differences in BRITE adipogenesis of primary adipocytes from two different mouse strains. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* **1841**, 1345–1352 (2014).
222. Hansen, J. B., te Riele, H. & Kristiansen, K. Novel function of the retinoblastoma protein in fat: regulation of white versus brown adipocyte differentiation. *Cell Cycle* **3**, 774–8 (2004).
223. Blanchet, E. *et al.* E2F transcription factor-1 regulates oxidative metabolism. *Nat. Cell Biol.* **13**, 1146–1152 (2011).
224. Hou, X. *et al.* CDK6 inhibits white to beige fat transition by suppressing RUNX1. *Nat. Commun.* **9**, (2018).
225. Blanchet, E. *et al.* E2F transcription factor-1 regulates oxidative metabolism. *Nat. Cell Biol.* **13**, 1146–52 (2011).
226. Spalding, K. L. *et al.* Dynamics of fat cell turnover in humans. *Nature* **453**, 783–787 (2008).
227. Boström, P. *et al.* A PGC1a dependent myokine that derives browning of white fat and thermogenesis. *Nature* **481**, 463–468 (2012).
228. Stanford, K. I., Middelbeek, R. J. W. & Goodyear, L. J. Exercise Effects on White Adipose Tissue: Beiging and Metabolic Adaptations. (2015). doi:10.2337/db15-0227
229. Aldiss, P. *et al.* Exercise-induced 'browning' of adipose tissues. *Metabolism: Clinical and Experimental* **81**, 63–70 (2018).
230. Abdullahi, A. & Jeschke, M. G. White Adipose Tissue Browning: A Double-edged Sword. *Trends in Endocrinology and Metabolism* **27**, 542–552 (2016).
231. Fearon, K. C. H., Glass, D. J. & Guttridge, D. C. Cancer cachexia: Mediators, signaling, and metabolic pathways. *Cell Metabolism* **16**, 153–166 (2012).
232. Petruzzelli, M. *et al.* A switch from white to brown fat increases energy expenditure in cancer-associated cachexia. *Cell Metab.* **20**, 433–447 (2014).
233. Sherr, C. J., Beach, D. & Shapiro, G. I. Targeting CDK4 and CDK6: From discovery to therapy. *Cancer Discovery* **6**, 353–367 (2016).
234. Daas, S. I., Rizeq, B. R. & Nasrallah, G. K. Adipose tissue dysfunction in cancer cachexia. *Journal of Cellular Physiology* **234**, 13–22 (2018).