



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA**

**FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS**

**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

---

**Trabajo de Tesis Doctoral:**

**Rol de los andrógenos sobre la capacidad termogénica y la generación de adipocitos beige del tejido adiposo blanco**

---

**Tesista:** Lic. Alejandro Ezequiel Harnichar

**Director:** Dr. Andrés Giovambattista

**Codirectora:** Dra. María Guillermina Zubiria

**Año:** 2022

*El presente trabajo de tesis doctoral para optar al grado de Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas Área Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de La Plata, ha sido realizado en el Instituto Multidisciplinario de Biología Celular (IMBICE, UNLP-CONICET-CIC) bajo la dirección del Dr. Prof. Andrés Giovambatista y la codirección de la Dra. Guillermina Zubiría.*

La Plata, Buenos Aires, Mayo de 2022.

Parte de los resultados presentados aquí han formado parte de la siguiente publicación:

Harnichar, AE, Zubiría MG, Giordano AP, Miguel I, Rey MA, Spinedi E, Giovambattista A. **“Inhibitory effect of androgens on white adipose tissue thermogenic capacity”**. *Molecular and Cellular Endocrinology*: DOI 10.1016/j.mce.2021.111542;2022.

# Contenido

Agradecimientos .....	VI
Resumen.....	VIII
Resumen gráfico .....	X
Abreviaturas.....	XI
1. Introducción .....	1
1.1. Tejido Adiposo: Aspectos generales.....	2
1.2. La inducción del <i>browning</i> conduce a un estado metabólico favorable .....	4
1.3. Control transcripcional de la generación de los adipocitos beige.....	6
1.4. Durante la inducción de los adipocitos beige ocurren cambios transcripcionales asociados a la termogénesis adaptativa.....	8
1.5. Los adipocitos beige pueden originarse mediante diferentes mecanismos.....	12
1.6. Mecanismos termogénicos independientes de Ucp1 .....	15
1.7. El <i>whitening</i> del TA conlleva a la disminución de la cantidad de adipocitos beige mediante el fenómeno de autofagia .....	17
1.8. La síntesis de andrógenos comienza durante la etapa prenatal.....	19
1.9. Los andrógenos como reguladores del TA .....	21
1.9.1 Efectos sobre adipocitos uniloculares .....	21
1.9.2 Efectos sobre adipocitos multivacuolares .....	24
2. Hipótesis y Objetivos.....	27
2.1. Hipótesis .....	28
2.2. Objetivo general.....	28
2.3. Objetivos específicos .....	28
3. Materiales y Métodos.....	30
3.1. Animales y Tratamientos .....	31
3.2. Obtención de la FEV y cultivo primario de las CPAs .....	32
3.3. Medida de metabolitos plasmáticos .....	33
3.4. Medida de triglicéridos hepáticos .....	35
3.5. Tinción histológica y recuento de adipocitos.....	36
3.6. Microscopia de transmisión electrónica.....	36
3.7. Medida de los niveles relativos de expresión ARNm por RT-qPCR.....	37

3.8. Cuantificación del contenido mitocondrial relativo.....	39
3.9. Medida de la tasa de consumo de oxígeno.....	40
3.10. Determinación del contenido proteico mediante Western blot.....	42
3.11. Análisis estadístico.....	44
4. Resultados.....	45
4.1. Caracterización del modelo de depleción de andrógenos generado durante la edad prepuberal .....	46
4.1.1. La depleción prepuberal de andrógenos ocasiona cambios metabólicos en la edad adulta.....	46
4.1.2. La depleción de andrógenos modifica las masas del TA subcutáneo y visceral ...	48
4.1.3. El análisis histológico de los depósitos del TA revela adipocitos de menor tamaño en el TARP.....	49
4.1.4. Efectos de la depleción de andrógenos sobre la expresión del receptor de andrógenos, leptina y adiponectina.....	50
4.1.5. El grupo ODX presenta un incremento en la expresión de genes termogénicos en los depósitos de TA a temperatura ambiente .....	52
4.1.6. Las células precursoras de adipocitos del grupo ODX generan adipocitos beige con mayor capacidad termogénica.....	53
4.2. Análisis de la respuesta al <i>browning</i> inducido por el frío.....	56
4.2.1. Evaluación de los cambios metabólicos producidos durante la exposición al frío 56	
4.2.2. Efecto de la depleción de andrógenos sobre los niveles de transcritos de genes termogénicos durante la inducción del <i>browning</i> por frío .....	61
4.2.3. El grupo ODX muestra cambios en los niveles de proteínas involucradas en la termogénesis .....	63
4.2.4. El grupo ODX muestra cambios en los niveles de ARNm de proteínas involucradas en la autofagia.....	65
4.3. Estudio in vitro de los efectos de los andrógenos sobre los adipocitos beige 69	
4.3.1. La testosterona modifica el número de mitocondrias en los adipocitos cultivados in vitro.....	69
4.3.2. Los andrógenos inhiben la expresión de genes involucrados en la termogénesis en adipocitos cultivados in vitro .....	72
4.3.3. La inhibición ocasionada por la testosterona sobre los marcadores termogénicos esta mediada por el receptor de andrógenos .....	76
4.3.4. La testosterona modifica parámetros relacionados con la actividad mitocondrial la respiración basal y la respiración máxima .....	79
4.3.5. Los adipocitos cultivados in vitro con testosterona durante la última etapa de diferenciación presentan menor expresión de marcadores termogénicos.....	81
4.3.6. La incubación de las células precursoras de adipocitos con testosterona inhibe la expresión de marcadores de precursores de adipocitos beige.....	83
Anexo .....	85
5. Discusión.....	89

5.1. Consideraciones generales .....	90
5.2. Modificaciones en el metabolismo general a raíz de la depleción prepuberal de los andrógenos .....	91
5.3. Efecto de la depleción de andrógenos en el <i>browning</i> en condiciones basales de temperatura .....	94
5.4. Cambios metabólicos inducidos por la exposición al frío en animales depletados en andrógenos .....	96
5.5. Remodelamiento del TA durante la termogénesis adaptativa inducida por bajas temperaturas .....	97
5.6. Los andrógenos in vitro reprimen el linaje adipocitario beige .....	101
5.7. Limitaciones del estudio .....	106
6. Conclusiones .....	108
7. Bibliografía .....	111

# Agradecimientos

---

En principio, quisiera agradecer a los y las integrantes del laboratorio de Neuroendocrinología del IMBICE. A mi director, el Dr. Andrés Giovambattista y a mi codirectora, la Dra. Guillermina Zubiría que me ayudaron a crecer durante el desarrollo de esta tesis. Sus aportes, conocimientos y charlas me permitieron llegar hasta este momento. A mis compañeras Amandis, Anita y Sabri por las charlas y los mates compartidos, previos a la pandemia. Porque también estuvieron para ayudar con distintas actividades dentro y fuera del laboratorio.

También quisiera agradecer a las personas del jurado que debieron leer esta tesis.

Agradezco a mis compas del laboratorio y amigos: Ale, Andre, Flor y Nacho, los “effectors”, por siempre mantenernos unidos y brindarnos el apoyo durante todos estos años. Fueron un gran sostén en este camino. Los encuentros que hemos vividos les recordaré con mucho cariño y risas. Me siento privilegiado de haber transitado estos años con ellos, ya que el apoyo brindado es invaluable.

Además, agradecer a todo el personal del IMBICE, a mis otros compas del instituto, a les becaries por todo su apoyo, por generar un clima ameno para el trabajo y por las charlas y los encuentros compartidos, desde el laboratorio general hasta las noches en algún bar.

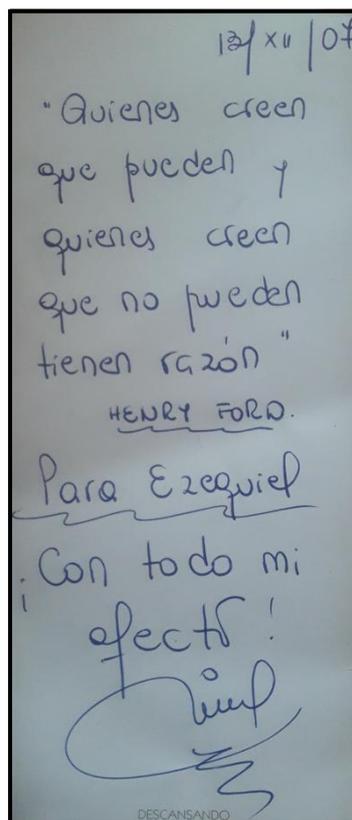
Voy a extrañar mucho al IMBICE, sus pasillos y rincones pero me llevaré un pedacito de su gente conmigo.

También agradecer a mis amigos por fuera del laboratorio que me han escuchado hasta el cansancio sobre diferentes cuestiones referidas al doctorado. Les quiero muchísimo y han hecho siempre todo más sencillo, me han brindado mucho cariño y les agradezco inmensamente. Las palabras se hacen insuficientes para poder expresarles todo lo que siento por ellos. Agradecer especialmente a Ari, gran compañero y persona que me ha ayudado a transitar todo esto a partir de sus cálidas palabras, su mirada positiva y su gran apoyo durante todos estos años.

Agradecer a mi familia: mi madre (Ana), mi padre (Pablo), mi hermano (Seba) y mi hermana (Cintia) por estar siempre, por su apoyo incondicional haga lo que haga, por las palabras de aliento en este último tiempo, por inculcarme el “continuar para

adelante" pase lo que pase. Son verdaderos luchadores en esta vida y mi mayor aprendizaje viene de ellos. Muy agradecido por incentivar me al estudio, a ser curioso, a trabajar y por sobre todo, ser buena persona que sin esto lo demás no tendría sentido.

Agradezco a la educación pública y gratuita en todos sus niveles, que de otro modo me hubiera sido difícil sino imposible poder estar aquí. Agradecer a cada docente con les que pude aprender: desde la escuela primaria número 30, la E.E.M.N. 13, ambas instituciones de Berazategui, hasta la UNLP. Defender la educación pública y gratuita siempre. Asimismo, agradecer al CONICET por el otorgamiento de la beca para desarrollar esta tesis doctoral, allá por el 2016 y a los subsidios que han permitido realizar los experimentos aquí plasmados.



*En agradecimiento a aquellos docentes que resultan inspiradores. Especialmente, a mi profe de biología: Rina.*

# Resumen

---

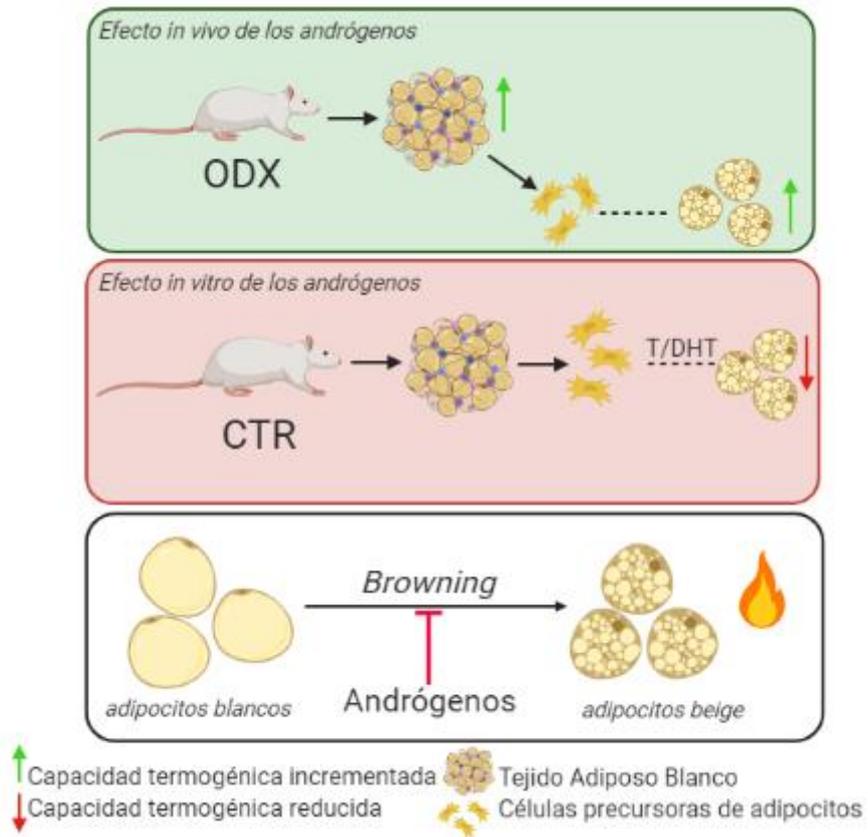
El *browning* consiste en la generación de adipocitos *beige* dentro de depósitos de tejido adiposo blanco (TAB). Dicho proceso es inducido por la exposición a bajas temperaturas y por estimulación con agonistas beta adrenérgicos, entre otros. De manera similar a los adipocitos pardos, los adipocitos beige poseen la capacidad de producir calor debido a que expresan la proteína desacoplante 1 (UCP1), ubicada en la membrana mitocondrial interna, y por lo tanto su activación conduciría al incremento del gasto energético. En los últimos años, el estudio de la regulación y de los diferentes procesos que gobiernan el *browning* ha ganado un amplio interés debido a su potencial impacto benéfico sobre el metabolismo.

En el presente trabajo de tesis doctoral, se evaluaron los efectos de los andrógenos sobre el proceso termogénico en dos tipos de depósitos de TAB: el TA inguinal (TAI) y el TA retroperitoneal (TARP). Para ello, se realizaron experimentos *in vivo* así como también ensayos *in vitro*. En el primer caso, ratas macho de la cepa Sprague-Dawley fueron sometidas a una orquidectomía prepuberal (ODX) con el fin de obtener un modelo de depleción de andrógenos y luego se estudió la capacidad termogénica de los TAB. A temperatura ambiente, los ODX presentaron niveles elevados de *Ucp1*, *Prdm16* y *Pgc1a* en ambos depósitos de TAB en comparación con los animales controles (CTR). Además, las células precursoras de adipocitos (CPAs) aisladas del grupo ODX se diferenciaron *in vitro* en mayor medida hacia el linaje adipocitario beige. A continuación, un subgrupo de animales CTR y ODX fue mantenido durante 7 días a temperatura ambiente o sometido al frío para la inducción de la termogénesis (CTR-A, ODX-A, CTR-F y ODX-F, respectivamente). Si bien no se encontraron cambios significativos en PPAR $\gamma$  ante la inducción por frío, el grupo ODX-F expresó mayores niveles de *Ucp1* y *Pgc1a* y demostró un alto contenido proteico de UCP1 en ambos depósitos y un aumento en los niveles de CYT C en el TARP. Asimismo, se registraron cambios en la expresión de marcadores relacionados con la autofagia, lo cual indicaría modificaciones en la dinámica mitocondrial durante este proceso. Por lo tanto, las ratas con deficiencia de andrógenos desarrollaron depósitos de TAB con una actividad termogénica incrementada, tanto en condiciones basales como estimuladas por frío.

Para los ensayos *in vitro*, se realizaron cultivos de la fracción estroma vascular (FEV) del TAI y TARP provenientes de animales CTR y se incubaron con andrógenos durante las distintas etapas de la adipogénesis. En los cultivos de adipocitos beige tratados con testosterona disminuyeron la expresión de Cox8b y el contenido mitocondrial relativo. Además, tanto la testosterona como la dihidrotestosterona redujeron la expresión en condiciones estimuladas con forskolina de Ucp1, Pgc1a y Prdm16 en adipocitos beige provenientes de ambos depósitos. Además, el efecto de la testosterona fue revertido por la flutamida, un antagonista del receptor de andrógenos. Asimismo, en el TARP la testosterona modificó la funcionalidad mitocondrial de los adipocitos beige. Por último, se encontró que este andrógeno disminuyó la expresión de marcadores termogénicos (Ucp1 y Pgc1a) en adipocitos maduros y marcadores de precursores de adipocitos beige (Prdm16, Pdgfr1a y Ebf2) en la FEV. De esta manera, los tratamientos *in vitro* con andrógenos inhibieron el programa termogénico, efecto que fue mediado por la vía clásica del receptor de andrógenos.

En conclusión, en esta tesis se propone que los andrógenos regulan de manera negativa la funcionalidad y generación de adipocitos beige.

# Resumen gráfico



# Abreviaturas

---

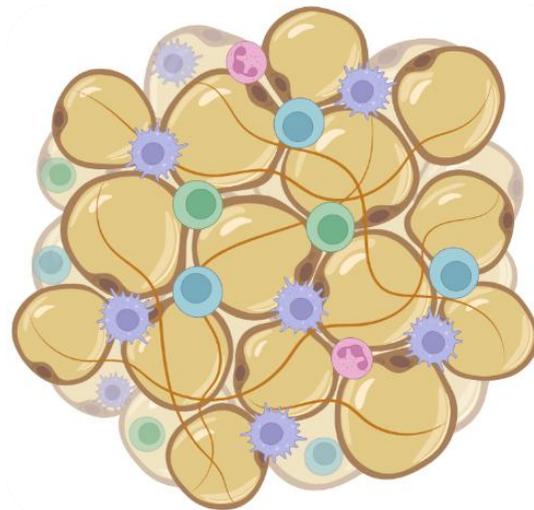
ADN: ácido desoxirribonucleico  
ADRB3: receptor adrenérgico beta 3  
AG: ácidos grasos  
AGL: AG libres  
AMPc: adenosina monofosfato cíclico  
AMPK: proteína quinasa activada por monofosfato de adenina  
ANOVA: análisis de varianza  
ApoE: apoproteína E  
AR: receptor de andrógenos  
ARN: ácido ribonucleico  
ARNm: ARN mensajero  
Atg: proteína relacionada con la autofagia  
BMPs: proteínas morfogenéticas óseas  
CD137: cluster of diferenciación 137  
C/EBPa/b: CCAAT-enhancer binding protein alfa/beta  
CIDEA: activador de muerte celular CIDE-A  
Cox8b: citocromo C oxidasa subunidad 8B  
CL: CL 316.243  
CPAs: células precursoras adipocitarias  
CTR: control/controles  
DEXA: dexametasona  
DHT: dihidrotestosterona  
DIMEM-F12: Dulbecco's Modified Eagle Medium-Ham's F-12  
DIO2: yodotironina deiodinasa tipo II  
EBF2: factor temprano de células B 2  
ERK1/2: quinasa regulada por señal extracelular 1/2  
Fabp4: proteína de unión a AG 4  
FEV: fracción estroma vascular  
FGF21: factor de crecimiento fibroblástico 21  
GER: elementos de respuesta a glucocorticoides  
GLUT: transportador de glucosa

hASC: células estromales/progenitoras derivadas de TA humano  
HBSS: Hanks balanced saline solution  
HFG: dieta rica en grasas  
HSL: Lipasa sensible a hormonas  
IL-6: interleuquina 6  
IBMX: 3-isobutil-1-metilxantina  
INSU: insulina  
IMC: índice de masa corporal  
LC3: proteína asociada a microtúbulos 1A/1B-cadena ligera 3  
LPL: lipoproteína lipasa  
mTOR: diana de rapamicina en células de mamífero  
Myf5: factor miogénico 5  
Myh11: cadena pesada 11 la miosina de células musculares lisas  
MyoD1: proteína 1 de determinación de mioblasto  
Ob: Leptina, gen  
ODX: orquidectomizado/s  
PAI-1: inhibidor del activador de plasminógeno  
PARK: ubiquitina ligasa E3  
PBS: phosphate buffered saline  
PBST: PBS Tween 20  
PCR: cadena en reacción de la polimerasa  
PDGFR: receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas  
PET-CT: tomografía computarizada por emisión de positrones  
PGC1a: coactivador de PPARg 1 alfa  
PINK: proteína asociada a Parkinson  
PKA: proteína quinasa A  
PPARg: peroxisome proliferator-activated receptor gamma  
PPERs: elementos de respuesta a PPARg  
PRDM16: dominio conteniendo PR 16  
RE: retículo endoplasmático  
RT-qPCR: PCR cuantitativa en tiempo real  
SFB: suero fetal bovino  
SNS: sistema nervioso simpático  
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  
TFEB: factor de transcripción EB  
TG: triglicéridos  
TLE3: proteína potenciadora similar a la transducina 3  
TMEM26: proteína de transmembrana 26  
TNFa: factor de necrosis tumoral a  
UCP1: proteína desacoplante 1  
ZFP 423: proteína con dedos de Zn 423

*Nota:* en esta tesis las proteínas serán mencionadas con mayúscula (ej. AR), mientras que los respectivos transcritos se nombrarán con una mayúscula inicial seguida de letras en minúsculas (ej. Ar).

# *1. Introducción*



### *1.1. Tejido Adiposo: Aspectos generales*

El tejido adiposo (TA) se encuentra formado por adipocitos maduros y una fracción estroma vascular (FEV) que consiste en células del sistema inmune, pericitos, fibroblastos, células epiteliales, células precursoras adipocitarias (CPAs, también llamados preadipocitos) y células madres mesenquimáticas<sup>1</sup>. De acuerdo a sus características, el TA puede clasificarse como TA blanco (TAB) y TA pardo (TAP). Como su nombre lo indica, la coloración que presentan estos tejidos en fresco es la distinción fenotípica más evidente.

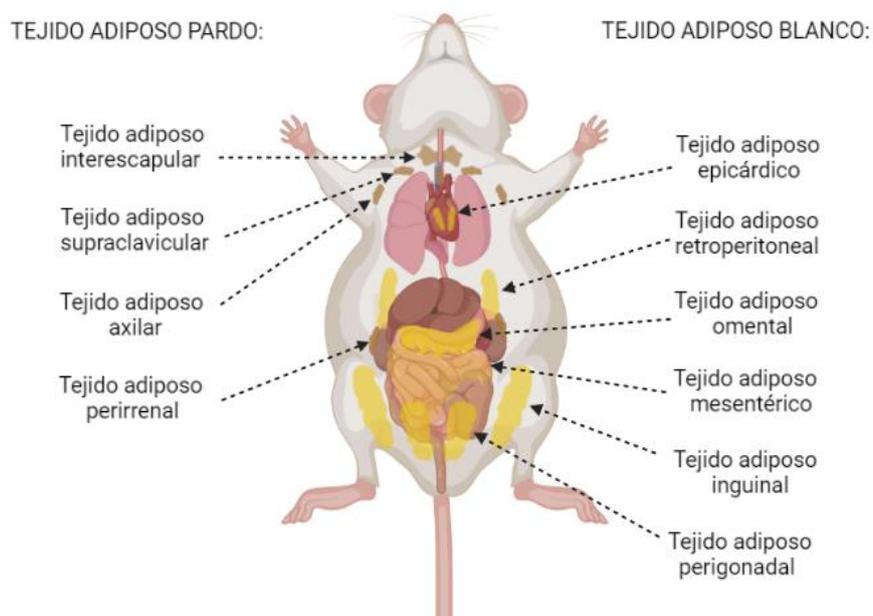
En los mamíferos, el TA blanco (TAB) se puede clasificar de acuerdo a su ubicación anatómica en depósitos subcutáneos como por ejemplo el TA inguinal (TAI) y en depósitos viscerales como por ejemplo el TA retroperitoneal (TARP) y el epididimal (TAE), entre otros (Fig. 1). Dentro del TAB se encuentran los típicos adipocitos uniloculares (adipocitos blancos) y además, bajo ciertas condiciones, es posible encontrar adipocitos multivacuolares<sup>2</sup> (adipocitos beige o brite). En secciones posteriores, se tratará con mayor detalle este fenómeno, objeto de estudio del presente trabajo de tesis doctoral.

En situaciones de balance energético positivo, los adipocitos blancos se encargan de almacenar el exceso de energía en vacuolas lipídicas neutras mediante un proceso denominado lipogénesis el cual se encuentra regulado por la secreción postprandial de la insulina<sup>34</sup>. De manera opuesta las catecolaminas actúan sobre los receptores adrenérgicos beta (ADRB) para promover la lipólisis a través de la activación de la proteína quinasa A (PKA). Esta enzima a su vez activa a la lipasa sensible a hormonas (HSL) y a las esterasas cuyas acciones generan AG libres (AGL), diacilgliceroles y glicerol a partir de los lípidos almacenados. Los AGL serán utilizados por las mitocondrias para el proceso de beta oxidación y también se liberarán al torrente sanguíneo para su utilización como fuente de energía por otros órganos y tejidos de la economía. La hormona glucagón también regula la lipólisis a través de su acción sobre la HSL<sup>5</sup>.

En cuanto a sus funciones endócrinas, los adipocitos blancos son capaces de secretar una serie de proteínas denominadas en conjunto adipoquinas que regulan diferentes aspectos referidos a la homeostasis metabólica. Entre ellas se encuentra la leptina, codificada por el gen *Ob*, cuyos niveles plasmáticos reflejan el estado de

adiposidad del organismo. En el encéfalo, dicha proteína reprime la ingesta de alimentos<sup>6</sup>. Además, la adiponectina, que también es secretada por otras fuentes ajenas al TAB<sup>7</sup>, mejora la sensibilidad a la insulina a través de sus efectos sobre el metabolismo de carbohidratos y triglicéridos (TG)<sup>8</sup>. De manera opuesta, los niveles de las adipoquinas resistina<sup>8</sup> y del inhibidor del activador de plasminógeno 1 (PAI-1) se relacionan con un estado de insulino-resistencia<sup>9,10</sup> y además la síntesis y secreción de TNF $\alpha$  e IL6 se asocian al estado proinflamatorio observado durante la obesidad<sup>11</sup>.

En los roedores el TAP se encuentra en mayor abundancia en el espacio interescapular y axilar pero también está presente en la región supraclavicular y dentro de la fascia renal (Fig. 1). En humanos predomina durante la etapa neonatal en la zona cervical. Sin embargo, a través de la combinación de tomografía computarizada por emisión de positrones (PET-CT) para identificar TA con una alta tasa de captación de <sup>18</sup>F-fluorodesoxiglucosa (<sup>18</sup>F-FDG) se ha comprobado la existencia de TAP en la región cervical, mediastínica y supraclavicular de adultos<sup>12</sup>. En este tipo de depósito se hallan adipocitos multivacuolares (adipocitos pardos). La coloración particular de este tejido en fresco se debe al alto contenido de mitocondrias dentro de dichas células y a la rica vascularización de este tejido<sup>13</sup>. Las mitocondrias de estas células presentan en su membrana interna una proteína denominada UCP1 (del inglés *uncoupling protein 1*) que interviene en la generación de calor (termogénesis) desacoplando el gradiente de protones producidos por la cadena transportadora de electrones de la producción de ATP. Las catecolaminas activan la termogénesis de los adipocitos pardos a través del incremento de la lipólisis y de la activación de UCP1<sup>14</sup>. Por último, cabe mencionar que el TAP también es capaz de secretar diferentes factores que actúan de manera endócrina y parácrina con posibles efectos benéficos sobre el metabolismo sistémico<sup>15</sup>.



**Figura 1. Distribución anatómica del tejido adiposo.** Se esquematiza la disposición del tejido adiposo pardo (a la izquierda) y del tejido adiposo blanco (derecha) de una ratona adulta en posición supina junto con algunos órganos internos para observar sus relaciones.

## 1.2. La inducción del *browning* conduce a un estado metabólico favorable

Como se mencionó anteriormente, bajo ciertas circunstancias pueden encontrarse cúmulos de adipocitos multivacuolares dentro del TAB. A raíz de que estas células son similares a los adipocitos pardos pero están presentes en depósitos de TAB se los denominó adipocitos *beige* o *brite* y el fenómeno por el cual se induce su aparición se conoce como *browning* o *beiging*. De manera similar a los adipocitos pardos, estas células son capaces de generar calor con el consiguiente incremento del gasto energético. Sin embargo, a diferencia de esas células, los adipocitos beige surgen cuando el TAB es estimulado fisiológicamente con el ejercicio y la exposición al frío y farmacológicamente por agonistas de los receptores beta adrenérgicos (ADRB) o por activadores de PPAR $\gamma$  (del inglés *Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-gamma*)<sup>16</sup>. Luego de que el estímulo finaliza, la expresión de marcadores termogénicos y por lo tanto, la actividad de estos adipocitos, decrecen. De esta manera, los adipocitos beige van a utilizar gran parte de los AG para producir calor a partir de la energía contenida en estas moléculas

con el fin de regular la temperatura corporal. Por lo tanto, a través de la inducción de estas células se podría contrarrestar el impacto de los estados fisiopatológicos relacionados con un balance energético positivo como en el caso del sobrepeso y la obesidad.

Los distintos depósitos de TAB presentan diferencias en cuanto a su potencial para generar adipocitos beige. En general, en ratones el TAI es el depósito más sensible a los efectos de los estimuladores de la termogénesis en comparación con los depósitos de viscerales<sup>17-19</sup>.

La obesidad es una condición que se caracteriza por la expansión excesiva del TAB y es un factor de riesgo para ciertas afecciones metabólicas como diabetes mellitus tipo II, síndrome metabólico, enfermedades cardiovasculares, enfermedad de hígado graso no alcohólico e incluso para algunos tipos de cáncer. En adición, la obesidad se caracteriza por ser un estado proinflamatorio, donde se pueden encontrar niveles elevados de TNF $\alpha$ , IL6 y Proteína C Reactiva (CRP)<sup>20</sup>.

Durante la expansión del TAB, el aumento de la masa en los depósitos viscerales ocurre a expensas de la hipertrofia de los adipocitos y se asocia a insulino-resistencia, incremento en la incidencia de aterosclerosis, un perfil lipídico alterado y aumento del riesgo de desarrollar diabetes tipo 2. Por otro lado, el TAB subcutáneo se expande predominantemente por hiperplasia y se asocia con un aumento en la sensibilidad a la insulina y disminución del riesgo de desarrollar diabetes tipo 2<sup>21</sup>. A partir del descubrimiento de los adipocitos beige, la activación del *browning* ha sido empleada para evaluar los posibles beneficios metabólicos en el organismo, ya que podría mitigar la hipertrofia de los adipocitos y la expansión del TAB y por consiguiente, las alteraciones metabólicas.

La alimentación de ratones con dietas ricas en grasas (HFD, del inglés *high fat diet*) es un modelo empleado para investigar la expansión del TAB y sus complicaciones. Se comprobó que la inyección de leptina en ratones disminuye los efectos adversos ocasionados por este tipo de dieta a través de la promoción del *browning*<sup>22</sup>. Además, la inducción del *browning* en ratones deficientes en el gen que codifica para la leptina (*ob/ob*) se correlacionó con una mejora en el estado inflamatorio del TAE<sup>23</sup>. En animales sometidos a este tipo de dietas se encuentran niveles incrementados de Ucp1 en el TAI en la sexta semana de la intervención dietaria, pero posteriormente los valores decaen<sup>24</sup>.

Con respecto a la homeostasis de la glucosa, se evidenció que la inducción del *browning* mejora la sensibilidad a la insulina en ratas<sup>25</sup> y el *clearance* de la glucosa en estados de insulino-resistencia a través de la expresión del transportador Glut1 en ratones<sup>26</sup>. En la misma dirección, la expresión de Ucp1 en el TAB subcutáneo provenientes de humanos se correlaciona negativamente con los niveles de glucosa e insulina plasmáticas<sup>27</sup>.

Asimismo, se ha comprobado que el TAB epicárdico de ratas puede inducirse el *browning* mediante la administración de rosiglitazona<sup>28</sup> e incluso, en humanos se ha encontrado que este depósito es capaz de expresar Ucp1<sup>29,30</sup>. Debido a la íntima relación con el miocardio, el *browning* del TAB epicárdico podría regular las funciones cardíacas. En este sentido, se observó que el medio condicionado recolectado de un cultivo de adipocitos beige aminora los daños cardiacos ocasionados por isquemia/reperfusión<sup>31</sup>.

También, en un modelo murino se observó que la inducción del *browning* reduce el desarrollo de la enfermedad de hígado graso no alcohólico desencadenada por una HFD<sup>32</sup>. Aun más, la depleción de Ucp1 en ratones Apoe<sup>-/-</sup> conlleva a la acumulación de TG en el hígado<sup>33</sup>.

Finalmente, los efectos desfavorables de la obesidad pueden ser revertidos por el ejercicio y sus acciones benéficas sobre el *browning*<sup>34</sup>. Sin embargo, en humanos el *browning* inducido por el ejercicio continua siendo controversial<sup>35</sup>.

En conjunto, estos hallazgos dan cuenta del gran potencial que presenta el reclutamiento de adipocitos beige dentro de los distintos depósitos de TAB para combatir diferentes desordenes metabólicos y/o sus complicaciones.

### 1.3. Control transcripcional de la generación de los adipocitos beige

El proceso por el cual se generan adipocitos maduros post mitóticos a partir de sus precursores indiferenciados se conoce como adipogénesis y para su estudio se lo divide en dos etapas denominadas determinación y diferenciación terminal.

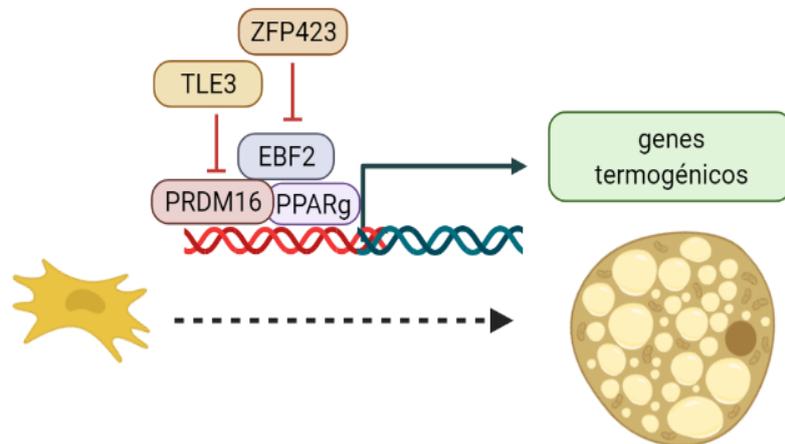
En la determinación las células madres mesenquimáticas se diferencian a CPAs, células unipotententes comprometidas hacia el linaje adipocitario, mientras que en la diferenciación terminal, estos precursores sufren una expansión clonan mitótica para luego diferenciarse a adipocitos maduros<sup>36,37</sup>. Durante esta etapa resulta

fundamental la expresión de la proteína PPARg, que pertenece a la familia de PPARs<sup>38</sup> y a la superfamilia de los receptores hormonales nucleares<sup>39</sup>. Su activación es necesaria para la formación de los tres tipos de adipocitos descriptos. Esta proteína presenta dos isoformas producidas a partir de *splicing* alternativo denominadas PPARg1 y PPARg2. Esta última, presenta 30 aminoácidos más que la isoforma 1 y además su expresión es específica del TA. En el contexto del *browning*, se ha comprobado que la incubación *in vitro* con el agonista de PPARg denominado rosiglitazona promueve la formación de adipocitos beige en cultivos primarios realizados a partir de precursores obtenidos del depósito epididimal<sup>40</sup>. Dicho efecto también fue encontrado cuando se utilizaron células estromales/progenitoras derivadas del TA humano (hASC)<sup>41</sup>.

La adipogénesis del linaje beige esta orquestada por la interacción entre PPARg/EBF2/PRDM16 (Fig. 2). En cultivo de preadipocitos del TAI diferenciados con rosiglitazona se comprobó que la inhibición de la expresión de Prdm16 con un vector *short hairpin* ARN dirigido contra esta proteína reduce de manera significativa los niveles de transcritos de genes termogénicos (Ucp1, Cidea, Pgc1a y Cox8b)<sup>42</sup>. La estabilización de PRDM16 es un requerimiento para que, junto con PPARg y la unión en elementos de respuesta a PPARg (PPERs), se induzca la formación de adipocitos beige. Asimismo, la inducción de la expresión tejido específica de PRDM16 en ratones transgénicos no solo aumentó los marcadores termogénicos sino que también se tradujo en una menor ganancia de peso provocada por una HFD<sup>43</sup>. En oposición, la obesidad decrece los niveles de PRDM16<sup>34</sup>. Por otro lado, mediante estudios de inmunoprecipitación de cromatina, se ha encontrado que la expresión de TLE3 (un factor de transcripción que conduce a la formación de adipocitos blancos<sup>44</sup>) interrumpe la interacción PPARg/PRDM16 favoreciendo la adipogénesis de adipocitos blancos en desmedro de la formación de adipocitos beige<sup>45,46</sup>.

Otro de los factores importantes para la identidad de los adipocitos termogénicos es la proteína EBF2<sup>47</sup> (del inglés *Early B-cell Factor 2*). La misma, recluta a PPARg para llevar a cabo la diferenciación de adipocitos pardos a la vez que reduce la unión a *loci* específicos de adipocitos blancos<sup>48</sup>. Junto con PPARg, EBF2 llevaría a cabo la expresión de PRDM16 que a su vez magnifica la expresión de genes involucrados en la termogénesis. *In vivo*, la sobreexpresión de EBF2 en el TAI de

ratones transgénicos (Fabp4-Ebf2) conduce al aumento del *browning* en este tejido a la vez que reduce la ganancia de peso ocasionada por una HFD<sup>49</sup>. Además, la sobreexpresión de Zfp423 disminuye el *browning* a través de la interrupción de la unión de Ebf2 en el promotor de Prdm16<sup>50</sup> conllevando al *whitening* del TA<sup>51</sup> (ver más adelante).



**Figura 2. Control transcripcional de la adipogénesis de adipocitos beige.** En este esquema se muestran los principales factores de transcripción que promueven la diferenciación adipocitaria beige así como sus inhibidores.

#### 1.4. Durante la inducción de los adipocitos beige ocurren cambios transcripcionales asociados a la termogénesis adaptativa

Ante distintas señales estimuladoras, los adipocitos beige responden a ello generando calor por medio de mecanismos dependientes e independientes de UCP1. Inicialmente, ocurre la transducción de dichas señales provenientes del medio externo (por ejemplo, catecolaminas) a través de los ADRB, ubicados en la superficie de la membrana plasmática de los adipocitos. Los receptores adrenérgicos pertenecen a la familia de receptores acoplados a proteína G y estructuralmente constan de siete dominios transmembrana, con la región N-terminal ubicada en el espacio extracelular y la C-terminal, en el intracelular. El TAB expresa los tres tipos de ADRB: ARDB1, 2 y 3, siendo este último el que se encuentra en mayor proporción en adipocitos maduros<sup>52</sup>. Estos receptores regulan la lipólisis del TA a través de la fosforilación y activación de proteínas dianas<sup>53</sup>. En la

región 5' *upstream* (rio arriba) del sitio de inicio de la transcripción de Ucp1 se encuentran elementos génicos reguladores que median el estímulo ocasionado por la exposición al frío y la noradrenalina<sup>54</sup>. Así, la conversión *in vitro* hacia adipocitos beige con el agregado de rosiglitazona es promovida por el aumento del ADRB3<sup>55</sup>. En un estudio comparativo, se observó que tanto el frío como la administración de un agonista específico del ADRB3<sup>56</sup> (CL 316.243, CL) *in vivo* utilizan el metabolismo lipídico para promover la termogénesis<sup>57</sup>. Sin embargo, en ratas alimentadas con una dieta rica en grasas durante 12 semanas la administración de CL induce un modesto incremento de Ucp1 en el TAE sin cambios en la captura de ácidos grasos<sup>58</sup>.

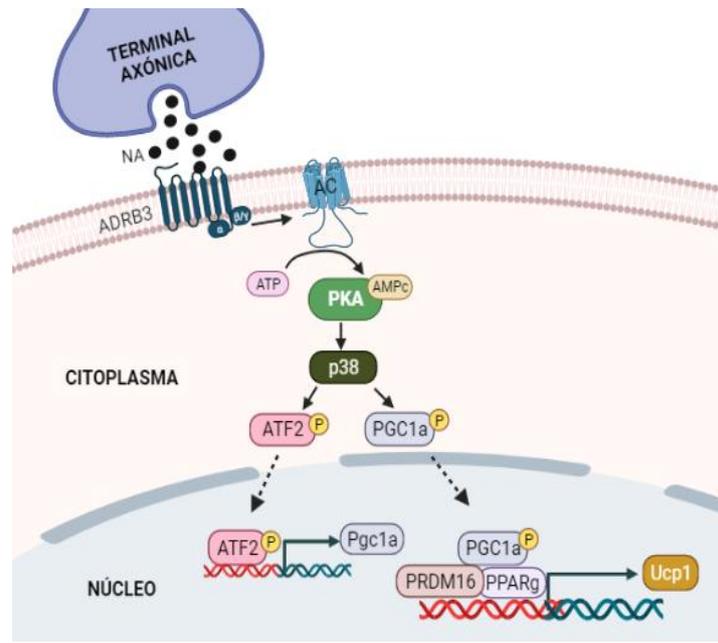
Sin embargo, el rol del ADRB3 durante la inducción del *browning* por el frío sigue siendo un tema de debate ya que se ha encontrado que ratones KO en este receptor responden al estímulo con el aumento típico de los marcadores termogénicos sin observar cambios en ADRB1<sup>59</sup>. En este sentido, ratones de la cepa FVB KO para ADRB3 responden al frío de igual manera que animales controles, posiblemente debido al aumento compensatorio del ADRB1<sup>60-62</sup>. El ADRB1 participaría durante la proliferación de los adipocitos pardos<sup>63</sup>. Asimismo, la sobreexpresión de ARB1 en el TAB de ratones los protege ante las consecuencias de una HFD a través de un aumento en la lipólisis y la generación de adipocitos beige<sup>64</sup>.

Además de la participación durante la formación de los adipocitos beige, el complejo PRDM16/PPAR $\gamma$  juega un rol relevante en la termogénesis adaptativa. La transcripción de Ucp1 está regulada por la proteína de unión al elemento sensible al AMPc (CREB, por su sigla en inglés) que actúa en el promotor proximal junto con la proteína PRDM16. También, se ha descubierto que ante el frío ocurre la activación del Coactivador del receptor gamma 1-alfa activado por el proliferador de peroxisomas (PGC1a)<sup>65,66</sup>. Dicha proteína no es requerida para la diferenciación adipocitaria, pero sí lo es para la biogénesis mitocondrial (coordinando la expresión del genes nucleares y mitocondriales) y la inducción de Ucp1 mediada por AMPc<sup>67</sup>. El incremento de este segundo mensajero conduce a la activación por fosforilación de ATF2 que luego se unirá al promotor de Pgc1a para conducir la expresión de esta proteína<sup>68</sup>.

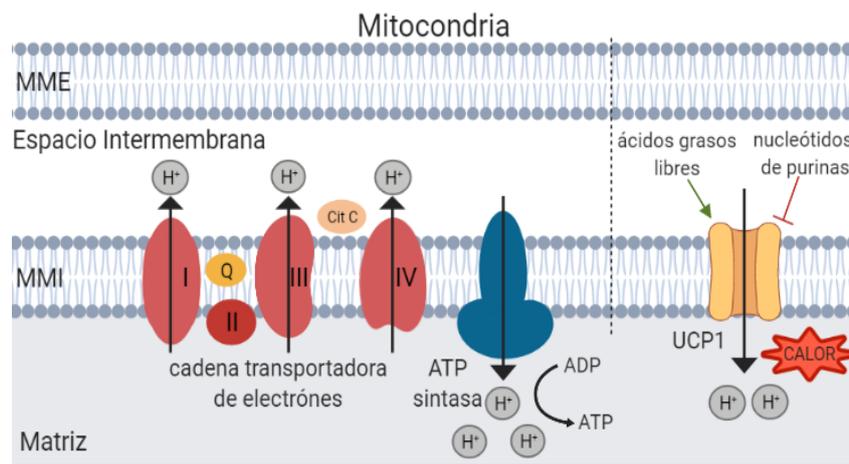
Las hormonas tiroideas también desempeñan un rol relevante en la regulación de la termogénesis<sup>69</sup>. Por medio de la conversión de T4 a T3 dependiente de la enzima DIO2 (yodotironina deiodinasa tipo II), la hormona T3 amplifica la señal beta adrenérgica aumentando los niveles de AMPc y la síntesis de lípidos *de novo*<sup>70</sup>. Adicionalmente, las hormonas tiroideas se unen al sitio distal del gen de Ucp1 mediante la formación de un complejo entre el receptor de hormonas tiroideas, RXR y Pgc1a<sup>71</sup> para activar la expresión de Ucp1.

Como hemos mencionado, UCP1 se localiza en la membrana mitocondria interna y disipa el gradiente de protones generado por la cadena transportadora de electrones (Fig. 4). Se ha propuesto que durante este proceso, los AG neutralizados por protones desde el espacio intermembrana, son capaces de traslocarse hacia el lado de la matriz (*flip-flop*) liberando al protón unido. Esto se encuentra favorecido por la diferencia del potencial de membrana existente. El AG resultante es un anión que interacciona electroestáticamente con UCP1 y la transporta hacia el espacio intermembrana para comenzar un nuevo ciclo<sup>71</sup> dando como resultado el transporte de protones sin la consiguiente formación de ATP. Por otro lado, los nucleótidos de purinas son capaces de inhibir la función de UCP1, siendo mayor la inhibición cuanto más fosfatos posean<sup>72</sup>.

De esta manera, para la activación de los adipocitos beige se requiere de un estímulo externo que será procesado por el receptor de superficie y que, con la intervención de segundos mensajeros intracelulares, conducirá la transcripción de distintos genes dianas (Fig. 3). Dichos genes van a estar relacionados con el incremento en la expresión de UCP1, con la biogénesis mitocondrial, sitio de acción de UCP1, y con el metabolismo de AG, fuente de energía para estas células.



**Figura 3. Activación de la termogénesis a partir de las terminales simpáticas nerviosas.** Se esquematizan los cambios desencadenados por la liberación de noradrenalina (NA) desde las terminales axónicas. A través de la participación del receptor beta adrenérgico 3 (ADRB3) y una serie de cascadas de fosforilación y activación se produce la activación transcripcional de Ucp1.



**Figura 4. Mecanismo de acción y regulación de UCP1.** Se muestra la generación del gradiente de protones (H<sup>+</sup>) por parte de la cadena transportadora de electrones. La energía potencial podrá emplearse para la formación de ATP cuando las mitocondrias se encuentran acopladas o bien disiparse en forma de calor a través del transporte mediado por UCP1. Dicha proteína es activada por ácidos grasos libres e inhibida por nucleótidos de purinas. Cabe destacar que ambos procesos

consumirán oxígeno (no mostrado). MME: membrana mitocondrial externa, MMI: membrana mitocondrial interna.

### 1.5. Los adipocitos beige pueden originarse mediante diferentes mecanismos

Debido a que los adipocitos beige expresan un conjunto de genes que los diferencian de los adipocitos pardos<sup>73</sup>, no sería extraño encontrar que sus orígenes provengan de distintas fuentes celulares. A diferencia de los adipocitos beige, cuyo origen queda está restringido a periodos postnatales debido al requerimiento de un estímulo externo, los adipocitos pardos se desarrollan durante la vida embrionaria, específicamente en E17.5 ya es posible encontrar adipocitos funcionales<sup>74</sup>. Además, las células del TAP se originan a partir de CPAs positivas para el factor miogénico 5 (Myf5<sup>+</sup>) mientras que las del TAB son negativas para este marcador<sup>75</sup> (Fig. 5).

Inicialmente, se describió que la formación de los adipocitos beige puede ocurrir mediante dos mecanismos independientes pero no mutuamente excluyentes: a través de la diferenciación a partir de CPAs (adipogénesis *de novo*) y/o mediante transdiferenciación de adipocitos blancos maduros hacia el linaje beige (Fig. 5).

El empleo de ratones AdipoChaser ha sido útil para indagar sobre el origen de los adipocitos beige. En estos animales, un pulso con doxiciclina induce la expresión de LacZ en todos los adipocitos maduros y por lo tanto serán coloreados con el agregado de x-gal<sup>76</sup>. Cuando estos animales son sometidos al frío durante 3 días se generaron adipocitos multivacuolares negativos para la coloración x-gal en el TAI y por lo tanto sería un indicio de la activación de la adipogénesis hacia el linaje beige<sup>77</sup>. Además, la inducción del *browning* con CL condujo a la marcación de células con el análogo de timidina 5-etinil-2'-desoxiuridina (EdU) en el TAE y dichas células resultaron ser positivas para el receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas alfa (PDGFRa<sup>+</sup>). Si la inducción del *browning* continuaba, las células proliferantes PDGFRa<sup>+</sup> se diferenciaban hacia el linaje beige pero si los animales se alimentaban con una HFD también eran capaces de generar adipocitos blancos<sup>78</sup> y por lo tanto a este tipo de células precursoras se las consideró como bipotenciales. Luego, se comprobó la expresión de este marcador en CPAs del TAB subcutáneo<sup>79</sup> y que precede a la formación de los adipocitos beige<sup>80</sup>. En este sentido, se observó

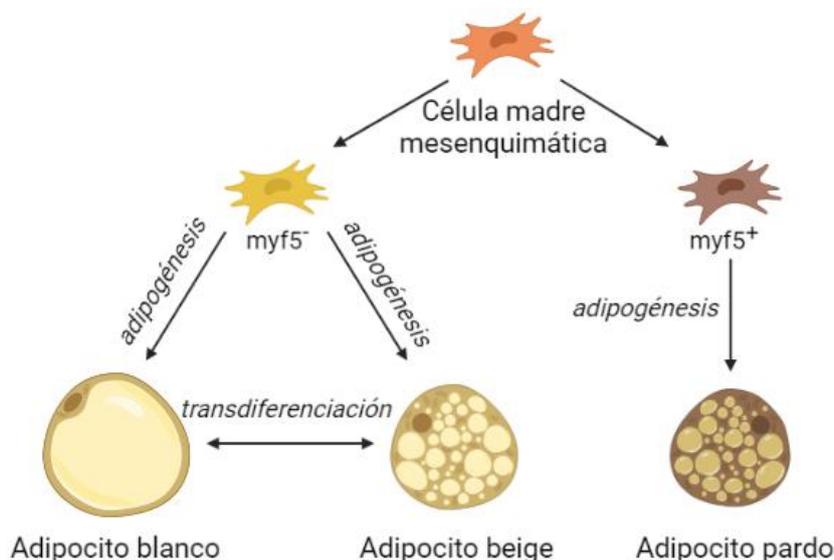
que en termoneutralidad el 5.2% de las células Pdgfra expresaron Ebf2 mientras que con tres días de exposición a bajas temperaturas el valor aumentó al 12.7%<sup>47</sup>. Solo las células de la FEV que expresaron ambos genes fueron capaces de diferenciarse hacia adipocitos beige por lo cual cuando las células precursoras Pdgfra<sup>+</sup> expresan Ebf2 quedan comprometidas hacia el linaje beige<sup>47</sup>.

Por otro lado, se encontró que células perivasculares que expresan PDGFRb son capaces de generar adipocitos beige en periodos prolongados de exposición al frío<sup>81</sup>.

Adicionalmente, un grupo de investigadores identificaron algunos adipocitos beige con un perfil de expresión de genes similar al de las células musculares lisas. Esto condujo a la determinación de CPAs Myh11<sup>+</sup> en el TAI. Dichos precursores, también positivos para Pdgfra, originaron cerca del 10% de los adipocitos beige UCP1<sup>+</sup><sup>82</sup>. En otro estudio se demostró que el bloqueo de la actividad del ADRB3 ocasionó la aparición de un grupo de CPAs que expresaron Myod1, junto con PDGFRa<sup>+</sup>, en la FEV del TAI. Estas células originaron adipocitos beige UCP1<sup>+</sup> con elevada actividad glicolítica y aportaron un 15% al total de adipocitos beige<sup>83</sup>.

Las observaciones antes mencionadas apoyan la teoría del origen *de novo* de los adipocitos beige. Sin embargo, las observaciones de que no se producían cambios en el contenido de ADN (como indicador de actividad mitótica) en el TAB de animales expuestos al frío<sup>84</sup> ni en el número de adipocitos<sup>85</sup> sentaron las bases para indagar qué mecanismo de formación de adipocitos beige era responsable de este fenómeno. Es decir, a pesar de que el número de adipocitos totales no cambiaba sí se incrementaban los adipocitos beige. Asimismo, el tratamiento con CL en ratas, provocó el aumento de adipocitos beige en el TARP pero no indujo cambios en la incorporación de 5-bromo-2'-desoxiuridina (BrdU) lo cual sugirió la conversión directa a partir de adipocitos blancos uniloculares<sup>86</sup> y además, no fueron encontrados signos apoptóticos que indicaran algún tipo de recambio celular<sup>87</sup>. En estos trabajos se demuestra que el proceso que gobernó la conversión adipocitos blancos a beige fue la transdiferenciación. En esta dirección, se describió la presencia de adipocitos pauciloculares como un estadio intermedio entre dicha transición. Estas células se caracterizaron por ser inmunoreactivos a UCP1 y presentar un perfil de acumulación lipídica y un mitocondrioma intermedios entre los

fenotipos uni y multilocular<sup>88</sup>. Dichos adipocitos también han sido descritos en el TAB omental de pacientes con feocromocitoma<sup>89</sup>.



**Figura 5. Formación de los tres tipos de adipocitos.** En el esquema se demuestra que a partir de la célula madre mesenquimática, se generan dos tipos de células precursoras ( $myf5^-$  y  $myf5^+$ ) que darán origen a los adipocitos blancos y beige y a los adipocitos pardos, respectivamente. Asimismo, los adipocitos beige pueden ser generados por el mecanismo de transdiferenciación sin pasar por un estadio celular indiferenciado.

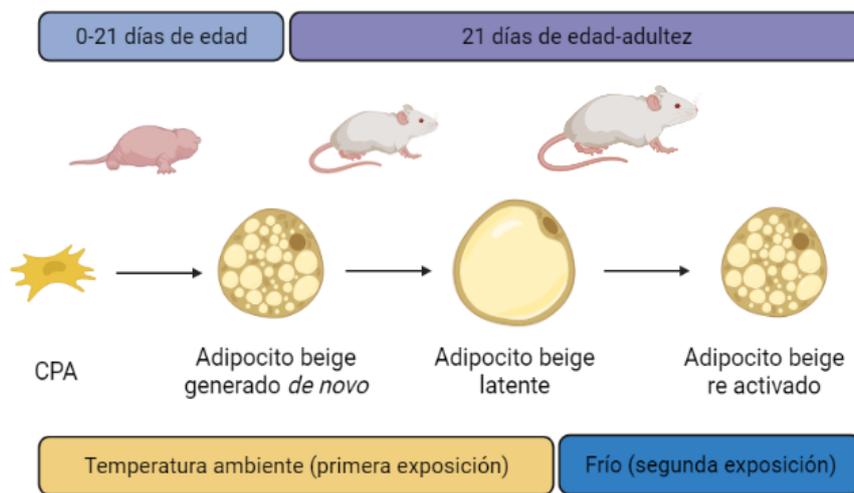
Si bien existen evidencias que sustentan por un tipo de mecanismo de formación de adipocitos beige (bien por diferenciación *de novo* o por transdiferenciación) las discrepancias pueden deberse a múltiples factores: desde el modelo de estudio, el tipo de inductor utilizado para desencadenar el *browning*, el depósito de TAB empleado y hasta el tiempo de duración del estímulo.

Con el fin de integrar los posibles orígenes de los adipocitos beige, se ha propuesto un modelo unificado que contempla las diferentes etapas del desarrollo biológico<sup>90</sup> (Fig. 6). En este modelo se propone que luego del nacimiento la exposición a la temperatura ambiente, que se encuentra por debajo de la termoneutralidad, induce la formación *de novo* de adipocitos beige<sup>91</sup>. Luego, estas células quedan en un estado latente o durmiente pero frente a otra exposición al frío generarían la mayoría de los adipocitos beige activos<sup>91</sup>. Además, se encontró que la reaclimatación indujo que las células multivacuolares (marcadas como UCP<sup>+</sup>, GFP<sup>+</sup>, RFP<sup>+</sup>) adquieran un perfil de adipocitos blancos (GFP<sup>+</sup>) y cuando se aplicó nuevamente el estímulo, parte de estas células volvieron a expresar UCP1<sup>92</sup>. La

primera ola de formación de adipocitos beige pareciera estar determinada genéticamente, ya que un trabajo indicó que a los 20 días de edad la expresión de Ucp1 en el TARP de ratones A/J fue mayor con respecto a la cepa B6. Luego, dicha expresión decayó en ambas cepas. Asimismo, esto repercutió en la segunda inducción por frío, ya que el tejido de los ratones A/J expresaron niveles más elevados de Ucp1 ante este estímulo<sup>93</sup>.

Por otro lado, las células presentes en el TAB subcutáneo embrionario presentan mayor potencial para generar adipocitos beige con respecto a las células de animales adultos y esto se encuentra relacionado con una mayor expresión de genes relacionados con la proliferación, diferenciación y adipogénesis<sup>94</sup>. Además la expresión de Ucp1 en el TAI de ratones es mayor a los 6 días post nacimiento que a los 56<sup>95</sup>. Esto posiblemente se deba a la contribución de las distintas células progenitoras que dan origen a los adipocitos durante la etapa de desarrollo y adultez<sup>96</sup>.

De esta manera, en este modelo solo los adipocitos blancos que tuvieron una expresión de Ucp1 con la primera inducción son las únicas células capaces de regresar hacia el linaje beige<sup>97</sup>.



**Figura 6. Modelo unificado.** En el esquema se demuestra que a partir de una célula precursora adipocitaria (CPA) en el estadio neonatal se diferencia hacia un linaje adipocitario beige debido a la primera exposición a la temperatura ambiente. El mayor incremento de los adipocitos beige se observa cerca de los 21 días postnatal. Luego, estas células devienen en adipocitos beige latentes y una segunda exposición al frío en la adultez provoca su reactivación.

### 1.6. Mecanismos termogénicos independientes de Ucp1

Llamativamente se ha encontrado que la exposición de ratas al frío ocasionaba la aparición de adipocitos beige con un número elevado de mitocondrias pero que no eran capaces de expresar UCP1<sup>98,99</sup>. Años más tarde, un grupo de investigadores observó la presencia de dichos adipocitos en ratones UCP1 KO que eran capaces de responder al estímulo b3 adrenérgico<sup>100</sup>. Además, los ratones deficientes en UCP1 fueron resistentes al desarrollo de obesidad y, por tanto, otros mecanismos independientes de UCP1 podrían estar actuando en este caso<sup>101</sup>. Asimismo, los animales deficientes en UCP1 no respondían a la termogénesis evocada por el frío, pero sí a la mediada por norepinefrina en condiciones de termoneutralidad<sup>102</sup>.

A través del análisis proteómico de animales expuestos al frío, se encontró un incremento en las proteínas relacionadas con el metabolismo de la creatina en el TAI, pero no en el TAP. Esto condujo a la determinación de que la termogénesis activaba el ciclo de la creatina, un ciclo fútil<sup>103</sup>. Durante este proceso, la creatina quinasa mitocondrial (CK) hidroliza ATP para producir ADP y fosforilar la creatina dando fosfocreatina, la cual por acciones enzimáticas se regenera a creatina. Cuando el ADP es limitante, esta reacción incrementa la síntesis de ATP mitocondrial aumentando el consumo de oxígeno y generando calor, sin un incremento neto en la síntesis de ATP. A pesar de las diferencias que existen en la capacidad termogénica dependiente de UCP1 entre los depósitos subcutáneos y viscerales en ratones, parecería que no sería el caso en este mecanismo termogénico<sup>104</sup>. Sin embargo, la suplementación de creatina aumenta marcadores mitocondriales en el TAI comparado con el TA gonadal de ratas hembras, pero lo opuesto sucede en machos.<sup>105</sup> Recientemente, este proceso se describió en adipocitos diferenciados *in vitro* a partir de células estromales derivadas de TA humano<sup>106</sup>.

En el año 2017 mediante la técnica ARN-seq se observó en el TAI de animales Ucp1<sup>-/-</sup> niveles elevados de Serca2b y Ryr2 y que el manejo del calcio intracelular a través de estas proteínas sería otro mecanismo termogénico<sup>107</sup>. En este caso, la estimulación de RYR2 lleva a la liberación de Ca<sup>2+</sup> desde el retículo endoplasmático (RE). A su vez, esto estimula a SERCA2b para re introducir a este ion al RE a

expensas del consumo de ATP, conduciendo a un consumo fútil de esta molécula y disipando la energía en forma de calor.

Finalmente, vale aclarar que los dos tipos de mecanismos mencionados son estimulados por agonistas beta adrenérgicos.

### *1.7. El whitening del TA conlleva a la disminución de la cantidad de adipocitos beige mediante el fenómeno de autofagia*

En el año 1991 se halló que la re-aclimatación de animales que estuvieron previamente expuesto al frío (y por lo tanto expresaban niveles elevados de Ucp1) causaba un descenso en los niveles de Ucp1 y en las mitocondrias desacopladas en el TAI<sup>108</sup>. Luego, en el 2016 se describió que cuando el estímulo adrenérgico sobre los adipocitos beige era retirado se producía la reactivación en la expresión de genes relacionados con la mitofagia con la consiguiente pérdida del fenotipo beige<sup>109</sup>. La transición de adipocitos termogénicos hacia el linaje adipocitario blanco se denominó *whitening*, un fenómeno opuesto al *browning*<sup>110</sup>. Este proceso se asocia con la disminución en la expresión de genes involucrados en la mitogénesis<sup>68</sup> y con el aumento de la maquinaria autofágica.

En líneas generales, se denomina autofagia al proceso mediante el cual las células degradan componentes propios a través de la formación de una estructura de doble membrana, el autofagosoma, posiblemente a partir del RE<sup>111</sup> (Fig. 7). Este proceso se inicia en condiciones de estrés o de baja concentración de ATP y conduce a la disociación de mTORC1 con ULK1 dejando a esta proteína disponible<sup>112</sup> para fosforilar PIP3K3C3 (fosfatidilinositol 3 quinasa subunidad catalítica 3)<sup>113</sup>. El incremento local de PI3P favorece el reclutamiento de proteínas involucradas en la autofagia. El complejo ATG12-AT5-ATG16L1, activado previamente por la intervención de ATG7<sup>114,115</sup>, promueve la conjugación de la proteína citosólica LC3-I con fosfatidiletanolamina (PE) para producir LC3-II con la consiguiente expansión del fagoforo y la formación final del autofagosoma<sup>116</sup>. En la mitofagia las mitocondrias son eliminadas de manera específica debido a la acumulación de la proteína PINK1 en la membrana mitocondrial externa de mitocondrias dañadas o destinadas a la degradación. Esto recluta a Park2, una ubiquitina E3 ligasa<sup>117</sup>. Asimismo, la proteína ULK1, puede activar directamente a

Park2 a través de su fosforilación<sup>118</sup>. Las mitocondrias “marcadas” con ubiquitina en el poro de transición de permeabilidad mitocondrial, reclutarán al receptor de ubiquitina p62<sup>119</sup> y serán conducidas al autofagosoma. Finalmente, esta estructura se fusiona con el lisosoma para la degradación final del cargo.

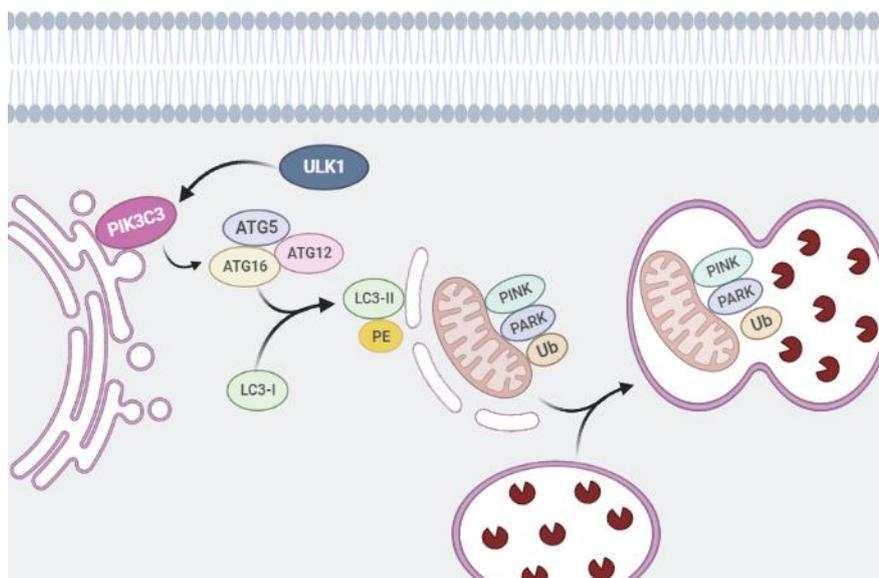
La mitofagia ha sido observado en el TAP durante el exceso calórico, en la termoneutralidad, en ratones deficientes en el receptor de leptina y en ausencia de estimulación beta adrenérgica<sup>120</sup>.

A diferencia de lo que ocurre en los adipocitos pardos, se comprobó que el *whitening* en los adipocitos beige se acompaña de cambios en el remodelamiento de la cromatina relacionados con la identidad de los adipocitos blancos<sup>51</sup>.

Debido a la relevancia de las mitocondrias en el proceso termogénico, diversos estudios han indagado el rol de la mitofagia durante el *browning*. En este sentido, los adipocitos beige se conservaron en mayor medida en ratones KO para Parkin una vez retirado el estímulo<sup>121</sup>. Por otro lado, en ratones sometidos a HFD se incrementaron los niveles de Pink1 y Parkin tanto en el TAI como en el TAE<sup>122</sup>. Asimismo en células diferenciadas *in vitro* tanto hacia el linaje blanco como al beige y estimuladas con AMPc se evidenció un descenso en los niveles de Atg5, 7 y 12<sup>123</sup> y en ratones KO para el gen Atg7 en el TAB se produjo la aparición de adipocitos termogénicos<sup>124,125</sup>.

Por otro lado, la biogénesis lisosomal está acoplada a la autofagia a través de la acción del factor de transcripción EB (TFEB)<sup>126</sup>. La deficiencia de esta proteína en el TAP de ratones mitiga el *whitening* en condiciones de termoneutralidad<sup>127</sup>.

Si bien aún quedan varios aspectos de la autofagia por dilucidar en el contexto del *whitening*, la intervención de este proceso resulta atractiva para evitar la consiguiente pérdida del número de mitocondrias y de la actividad de adipocitos beige y con ello, sus posibles beneficios.



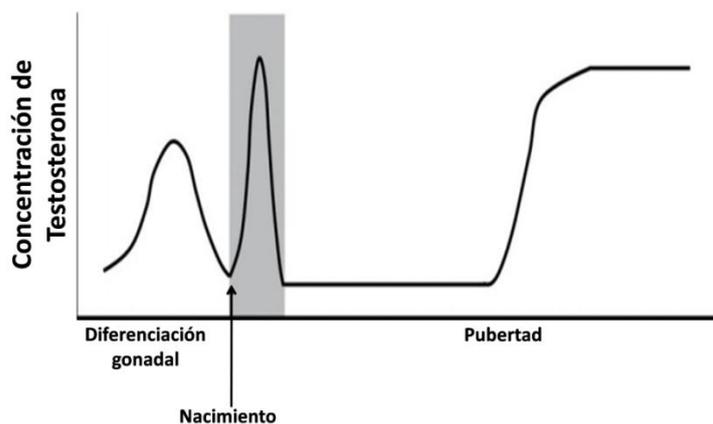
**Figura 7. La mitofagia promueve el whitening del TA.** En este esquema se muestran las proteínas que intervienen en la formación del autofagosoma y su fusión con el lisosoma conllevando a degradación final de las mitocondrias.

### 1.8. La síntesis de andrógenos comienza durante la etapa prenatal

Los andrógenos pertenecen al grupo de hormonas esteroideas y son sintetizadas principalmente por las células de Leydig (células intersticiales), ubicadas entre los túbulos seminíferos en el interior de los testículos. En hombres, la contribución de las glándulas suprarrenales es menor al 1% de la producción total<sup>128</sup>. La producción de estas hormonas comienza durante el crecimiento intrauterino comandado por el cromosoma Y (Fig.8). En el embrión, la secreción de los andrógenos es necesaria para el correcto desarrollo de las gónadas y en la pubertad, para la espermatogénesis, la secreción de las glándulas sexuales accesorias y el desarrollo de las características sexuales secundarias<sup>129</sup>. Asimismo, en el adulto la testosterona es requerida para que continúe la espermatogénesis y las características sexuales secundarias, las vías espermáticas y las glándulas sexuales secundarias<sup>130</sup>. Los mayores incrementos plasmáticos de los andrógenos se observan durante la pubertad y ocasionan los cambios que se producen durante la maduración sexual. Estas hormonas ejercen sus funciones a través de la unión al receptor de andrógenos (AR), que pertenece a la superfamilia de receptores nucleares y es codificado por el cromosoma X. Tanto la unión del ligando al AR

como la translocación de este complejo al núcleo es facilitada por proteínas chaperonas<sup>131</sup>. Allí ocurrirá la consiguiente unión a los elementos de respuesta a andrógenos (ARE) dando como resultado el incremento o la inhibición de la transcripción de los genes diana. En este sentido, se ha demostrado que la proteína HSP70<sup>132</sup> mejora la actividad transcripcional del AR mientras que HSP90 participa en la estabilización del receptor<sup>133</sup>. El Ar se expresa en una amplia variedad de órganos y tejidos: cerebro, hígado, corazón, próstata y TA, entre otros<sup>134</sup>. Dentro del grupo de los andrógenos, la dihidrotestosterona (DHT) presenta mayor afinidad de unión al AR que la testosterona (T) debido a que la primera posee menor constante de disociación<sup>135</sup>.

A diferencia de lo que ocurre en el humano, en ratas el desarrollo de los testículos transcurre progresivamente durante la etapa postnatal y sin la presencia de un periodo testicular quiescente<sup>136</sup>. En estos animales, se definen 4 estadios de maduración postnatal: periodo neonatal desde el nacimiento hasta los 7 días de edad, periodo infantil de 8 a 21 días, periodo juvenil hasta los 35 días y un periodo peripuberal hasta los 55-60 días de edad. Asimismo, hay una rápida proliferación de las células de Leydig entre los días 14 y 28 y luego desde los 28 hasta los 56 días. De este modo, la producción de andrógenos se incrementa lentamente hasta los 28 días y luego rápidamente hasta los 56 días de edad<sup>137</sup>. Los cambios producidos durante el desarrollo conducirán a la maduración del eje hipotálamo-hipofisario-gonadal, del sistema reproductivo y las características sexuales secundarias. Cabe destacar que al momento del nacimiento se observa un incremento en los niveles de testosterona debido al incremento de la actividad de las células de Leydig asociada, posiblemente, a la producción de la hormona gonadotrofina coriónica placentar<sup>138</sup>.



**Figura 8. Cambios producidos en la concentración de testosterona durante el desarrollo hasta la adultez.** Se puede observar que durante la diferenciación gonadal prenatal se produce el primer pico de producción de testosterona que decae antes del nacimiento. Luego, se produce una segunda ola y sus niveles decaen rápidamente manteniéndose estables hasta el momento de la pubertad. En esta etapa, los niveles se mantendrán estables, pero con valores más elevados hasta el decaimiento que deviene en el envejecimiento (no mostrado).

## 1.9. Los andrógenos como reguladores del TA

### 1.9.1 Efectos sobre adipocitos uniloculares

Desde hace muchos años se conoce que la distribución dimórfica del TAB se debe a los efectos de las hormonas esteroideas sexuales sobre los mismos (Fig. 9). Así, en hombres prevalece el TAB visceral (distribución androide) en tanto que las mujeres premenopáusicas presentan una mayor cantidad de TAB subcutáneo en la región glúteo-femoral (distribución ginecoide). Esto se relaciona con el hecho de que los hombres presenten un mayor riesgo para el desarrollo de enfermedades metabólicas<sup>139</sup>.

El AR se expresan tanto en las CPAs como en los adipocitos diferenciados y sus niveles proteicos decrecen durante la adipogénesis, pero en las células maduras aumentan ante el agregado del agonista<sup>140</sup>. Asimismo el TAB visceral presenta mayores niveles de AR que el TAB subcutáneo<sup>141</sup>.

Estudios *in vitro* han demostrado que la presencia de andrógenos inhibe la diferenciación de CPAs a adipocitos blancos tanto en líneas celulares<sup>142,143</sup> como en precursores obtenidos de TAB de humanos<sup>140</sup>. El mismo efecto se ha encontrado con un precursor de la síntesis de andrógenos DHEA, que inhibió tanto la

proliferación como la diferenciación de las células 3T3-L1<sup>144</sup>. En adición, las células estromales de la médula ósea de ratones que carecen el AR (ARKO) se diferencian en mayor medida hacia adipocitos que a células del tejido óseo<sup>145</sup>.

¿De qué manera los andrógenos son capaces de inhibir la adipogénesis? Si bien aún este interrogante no se encuentra totalmente resuelto, distintos trabajos han propuesto una posible explicación. Así, en un experimento realizado con células madres aisladas del TAB subcutáneo de mujeres pre menopáusicas comprobaron que el agregado de andrógenos inhibe la expresión de PPAR $\gamma$  durante la etapa de determinación de la adipogénesis a través de una vía dependiente del AR<sup>146</sup>. Además, en la línea celular 3T3-L1 se comprobó que dentro del núcleo los andrógenos son capaces de inducir la interacción del AR con beta catenina y TCF4 y de esta manera conducir la inhibición de la adipogénesis a través de la expresión de genes dianas de la vía Wnt<sup>142</sup>. Además, se ha encontrado que con el agregado de DHT y en presencia de la proteína asociada a AR dependiente de ligando (ARA70), AR y PPAR $\gamma$ , se reduce la expresión de un gen reportero controlado por elementos de respuesta a PPAR<sup>147</sup>. También se han investigado los efectos de los andrógenos sobre los microARNs (ARNs no codificantes formados por 18-25 nucleótidos que se encargan de silenciar postranscripcionalmente ciertos genes) relacionados con la progresión de la adipogénesis<sup>148</sup>. En esta línea, los andrógenos disminuyeron los niveles de miR-375 (proadipogénico)<sup>149,150</sup> mientras que aumentaron los de miR-130a (antiadipogénico)<sup>151</sup> y de esta manera se inhibió la adipogénesis.

Además de la modulación sobre la adipogénesis, los andrógenos intervienen en el manejo de los AG a través de la modulación de la lipólisis y lipogénesis (Fig. 9).

En las CPAs, la testosterona incrementó la liberación de glicerol en condiciones estimuladas con forskolina e isoproterenol<sup>152</sup>. En esta dirección, en los adipocitos provenientes de ratas castradas se presentó una disminución en la liberación de glicerol en condiciones estimuladas con isoproterenol<sup>153</sup>. Incluso, la castración descendió los niveles de AMPc inducidos por el agonista adrenérgico en el TAE<sup>154</sup>. Dichos efectos fueron revertidos con la aplicación de testosterona. Además, la testosterona fue capaz de normalizar la liberación de glicerol de un pool de adipocitos aislados del TAE y del TA perirrenal en condiciones estimuladas con isoproterenol, norepinefrina y forskolina. Esta observación fue asociada a un

descenso en los niveles del ADRB1. Por otro lado, la inyección de DHT a animales previamente castrados incrementó en el TARP los niveles de transcriptos involucrados tanto en la síntesis de AG como en la lipólisis<sup>155</sup>.

De manera opuesta, en precursores diferenciados *in vitro* obtenidos del TAB subcutáneo de humanos la testosterona redujo la lipólisis ocasionada por catecolaminas, a través de una reducción en la expresión de ADRB2 y HSL<sup>156</sup>. Además, se observó que en mujeres post menopáusicas la testosterona decrece el contenido de HSL en el TA<sup>157</sup>. Este mismo efecto fue observado cuando adipocitos aislados de mujeres se incubaron con DHT<sup>158</sup>.

La discrepancia en cuanto a los resultados indicaría que el efecto de los andrógenos depende del modelo estudiado.

Con respecto a la lipogénesis, el tratamiento con testosterona en ratas disminuyó la captación de AG posiblemente debido a la inhibición de la lipoproteína lipasa (LPL)<sup>159</sup> y con ello, habría menor disponibilidad de sustrato para la formación de las vacuolas lipídicas.

Clínicamente, la obesidad visceral en hombres se correlaciona con un descenso en los niveles de testosterona circulante y con alteraciones en enzimas involucradas en el almacenamiento de AG<sup>160</sup>. En este sentido, el tratamiento con testosterona redujo la actividad de la LPL y la captura de TG en depósitos intra-abdominales<sup>161,162</sup>. Adicionalmente, pacientes con hipogonadismo sometidos a una terapia hormonal con testosterona presentaron una disminución de los niveles de la proteína LPL<sup>162</sup>.

Por último, los andrógenos también modulan la secreción de adipoquinas. Tanto la leptina<sup>163,164</sup> como la adiponectina<sup>165</sup> se encuentran en mayor concentración en mujeres que en hombres de la misma edad. En adición, la incubación con andrógenos reduce los niveles de expresión de Ob tanto en cultivo primario<sup>166</sup> como en la línea 3T3-L1<sup>167</sup>. Por otro lado, la castración no induce cambios en los niveles de ARNm de AdipoQ pero sí incrementa los valores en suero<sup>168</sup>. Asimismo, el tratamiento con testosterona en pacientes con diabetes tipo II, redujo la concentración de leptina y adiponectina mientras que no se modificaron los valores de resistina, IL-6, TNF- $\alpha$  y CRP<sup>169</sup>. Sin embargo, en ratones la castración provocó un aumento en los valores de resistina y adiponectina<sup>170</sup>

### 1.9.2 Efectos sobre adipocitos multivacuolares

Las hormonas sexuales también tienen modulan la biología del TAP (Fig. 9). Los adipocitos pardos aislados de ratas expresan los receptores de hormonas esteroideas sexuales y , por lo tanto, dichas hormonas serían capaces de regular la fisiología de este tejido<sup>171</sup>. Existen reportes controversiales acerca del efecto de los andrógenos sobre la capacidad termogénica del TAP, posiblemente debido a los diferentes modelos utilizados. El agregado de testosterona desde el sexto al séptimo día del cultivo generó adipocitos pardos con vacuolas lipídicas escasas y pequeñas comparadas con el cultivo control. Además, en este mismo experimento la testosterona disminuyó los niveles de expresión del ARNm de Ucp1 de manera dosis dependiente en condiciones estimuladas por NE. Este efecto fue revertido con el agregado concomitantemente de flutamida por lo que sería un mecanismo dependiente del receptor de andrógenos<sup>172</sup>.

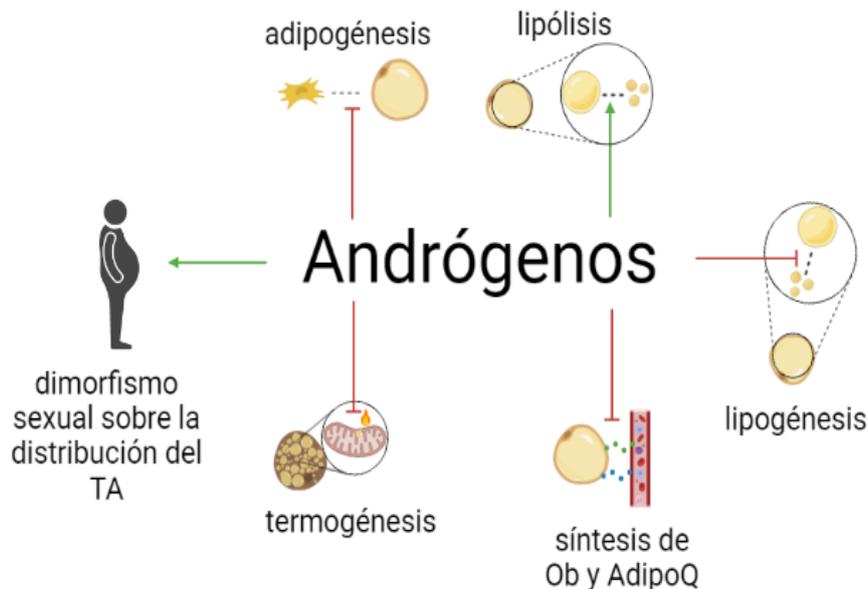
Posteriormente, investigadores del mismo grupo corroboraron que la testosterona incrementa los niveles de ARNm del receptor adrenérgico alfa 2a (Adra2a, un receptor acoplado a proteína G<sub>i</sub> que desciende los niveles de AMPc) en tanto que no se observaron cambios en la expresión de Adrb3<sup>173</sup>.

De este modo, los autores concluyeron que los efectos observados de las hormonas sexuales sobre la expresión de Ucp1 se deben, en parte, a las modificaciones en los niveles de ARNm de los receptores adrenérgicos.

Asimismo, los efectos inhibitorios de los andrógenos sobre la capacidad termogénica del TAP han sido comprobados tanto en un modelo murino para síndrome de ovario poliquístico (SOP) como también en pacientes humanos que padecen dicha patología<sup>174,175</sup>. Cabe destacar que esta es una afección endocrinológica que se acompaña de obesidad, resistencia a la insulina e hiperandrogenismo.

Sin embargo, en un trabajo realizado con ratones ARKO se ha registrado que los animales macho desarrollan un estado de obesidad en la semana 40, caracterizado por un incremento en la masa del TAB subcutáneo y visceral. En este modelo de obesidad de inicio tardío describen una disminución en el consumo de oxígeno acompañado por un descenso en los niveles del transcripto de Ucp1 tanto en el TAB como en el TAP<sup>176,177</sup>.

El estudio del rol de las hormonas sexuales sobre el TAP en humanos se encuentra más limitado y los resultados obtenidos son controversiales entre los distintos trabajos. Mediante la técnica PET-CT se logró observar que las mujeres presentaron mayor masa y actividad del TAP con respecto a hombres<sup>178,179</sup>. Sin embargo, en otros trabajos no se encontraron diferencias<sup>180,181</sup>.



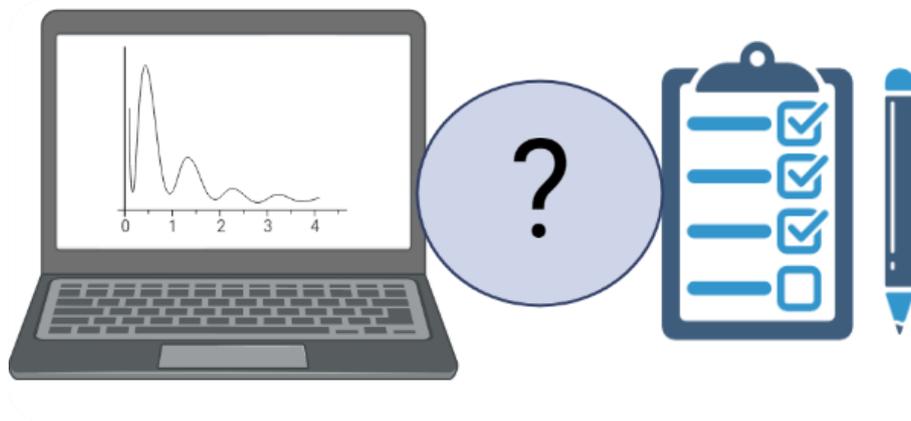
**Figura 9. Los andrógenos regulan diferentes procesos de los adipocitos.** Se esquematizan los efectos de los andrógenos sobre los adipocitos blancos y los adipocitos pardos.

Actualmente, poco se conoce acerca del efecto de los andrógenos sobre el otro tipo de adipocitos multivacuolares: los adipocitos beige. En este sentido, en primates carentes de andrógenos se observó la aparición de adipocitos multivacuolares en depósitos de TAB pero no se encontraron cambios en la expresión de genes termogénicos<sup>182</sup>. Además, en un modelo murino la castración indujo un descenso en el peso y en el tamaño de los adipocitos del TAE<sup>170</sup>. Finalmente, la castración de ratones de 6 semanas de edad no indujo cambios en la expresión de Ucp1 pero incrementó el área UCP1<sup>+</sup> en el TAI<sup>183</sup>. En estos trabajos no se indagaron sobre la respuesta en condiciones estimuladas ni los efectos de los andrógenos sobre adipocitos beige de manera directa.

Debido a la modulación de las hormonas sexuales masculinas sobre la biología de los adipocitos blancos y pardos y la relevancia metabólica de la inducción de la

termogénesis en el TAB, la presente tesis doctoral se centró en estudiar los efectos de los andrógenos sobre el *browning* del TAI y del TARP.

## *2. Hipótesis y Objetivos*



## 2.1. Hipótesis

El TAB posee el potencial de evitar o disminuir las consecuencias negativas de la expansión excesiva del TAB mediante dos procesos: mantener la hiperplasia adipocitaria y/o incrementar el número de adipocitos beige, con el consiguiente incremento del gasto energético.

Como se mencionó anteriormente, los andrógenos poseen diversas acciones sobre el TAB, incluyendo sus efectos inhibitorios sobre la diferenciación adipocitaria terminal del linaje blanco. Sin embargo, aún se encuentra poco explorado el rol sobre la generación de adipocitos beige y sobre el potencial del TA de realizar *browning*.

De acuerdo a lo expuesto, la hipótesis planteada en el presente proyecto es:

*“Los andrógenos cumplen un rol relevante en el desarrollo de los distintos depósitos de TAB inhibiendo el potencial adipogénico de las CPAs, y por lo tanto regulan negativamente la capacidad de generar adipocitos beige mediante el proceso de browning”*

## 2.2. Objetivo general

Con el fin de poner a prueba nuestra hipótesis nos planteamos el siguiente objetivo general:

*Evaluar el efecto de los andrógenos sobre los adipocitos beige tanto in vivo como in vitro.*

## 2.3 Objetivos específicos

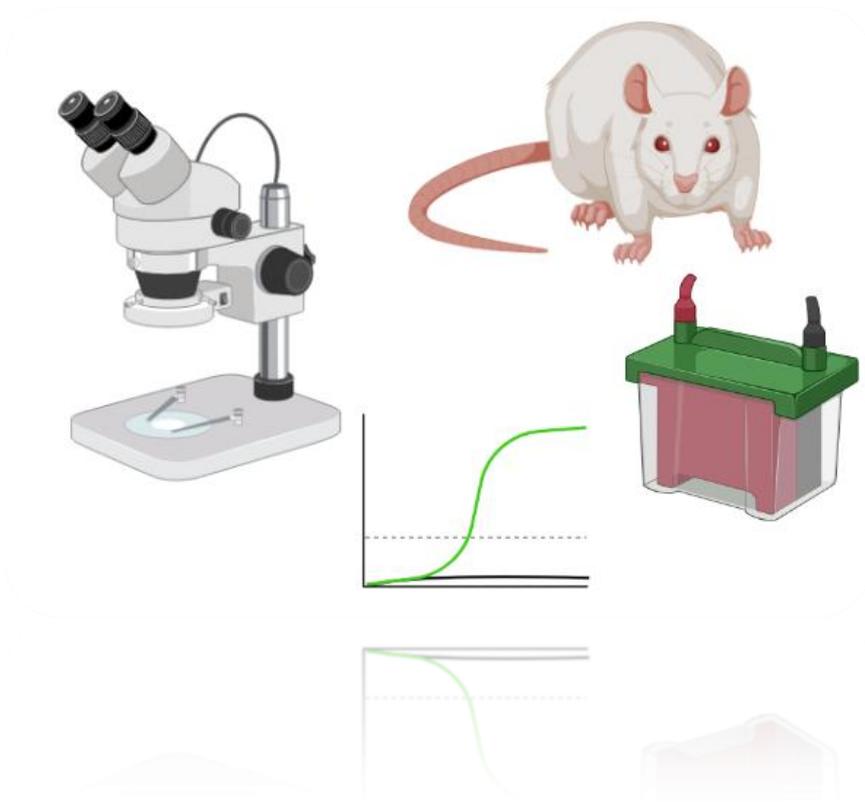
Dentro de este contexto, los objetivos específicos del presente proyecto son:

- 1- Analizar las características del estado endócrino-metabólico general, del TARP y del TAI en la edad adulta de animales que fueron sometidos a una orquidectomía bilateral a los 27 días de vida.
- 2- Determinar el efecto de la orquidectomía bilateral sobre la termogénesis basal del TAB y la capacidad de las CPAs obtenidas de estos animales de

generar adipocitos beige *in vitro*. Evaluar los posibles efectos diferenciales de los andrógenos de acuerdo al depósito de TA estudiado.

- 3- Evaluar el rol de los andrógenos durante el *browning* del TAB inducido por la exposición crónica al frío y analizar la posible contribución de la autofagia/mitofagia durante este proceso.
- 4- Estudiar los efectos *in vitro* de los andrógenos sobre la capacidad de las CPAs obtenidas a partir del TAB de animales controles de 60 días de generar adipocitos beige. Evaluar el rol de los receptores de andrógenos en dicho proceso

# *3. Materiales y Métodos*



### 3.1. Animales y Tratamientos

Para el presente trabajo, se utilizaron ratas albinas de la cepa Sprague-Dawley (S-D) generadas dentro del bioterio del IMBICE, con un ciclo de 12 h de luz y 12 h de oscuridad a una temperatura estable de 21°C. Las mismas fueron mantenidas junto con sus progenitoras desde el nacimiento hasta el momento del destete (21 días de edad). Posteriormente, las crías se separaron en machos y hembras y recibieron bebida y alimento estándar ad libitum. A los 27 días de edad, se prosiguió con la utilización de las ratas macho las cuales fueron pesadas (para el cálculo de las dosis de la anestesia y de analgésico) y enjauladas individualmente. Un grupo de animales elegido al azar no recibió ningún tipo de tratamiento (grupo control, CTR) mientras que otro grupo fue sometido a castraciones bilaterales (grupo orquidectomizado, ODX). Luego se registraron el consumo de alimento y el peso corporal desde los 30 a los 60 días de edad. Las ratas fueron sacrificadas por la mañana en condiciones no ayunadas (entre las 8:00 y 9:00 AM) mediante guillotina y se recolectó la sangre troncal en tubos con EDTA los cuales fueron centrifugados a 3000 rpm durante 15 minutos a 4°C. El plasma así obtenido, fue almacenado a -20°C para la posterior determinación de los metabolitos plasmáticos de interés. Por otro lado, el TAI y el TARP fueron disecados en condiciones de asepsia para la obtención de la FEV y pesados. Asimismo, una porción de los tejidos fue recolectado e inmediatamente guardado a -80 °C para el análisis histológico y de los niveles transcritos de interés.

Para evaluar la susceptibilidad al *browning* del TAB inducido por el frío, se utilizaron los mismos grupos experimentales descritos anteriormente. A los 60 días de edad, un subgrupo de animales fue mantenido individualmente a temperatura ambiente (CTR-A y ODX-A) mientras que otro subgrupo de animales se expuso individualmente a 4°C ± 1°C (CTR-F y ODX-F) durante 7 días. Tanto el consumo de alimento como el peso corporal se registraron diariamente y los animales que estuvieron en frío se revisaron atentamente para corroborar la posible existencia de signos de sufrimiento animal. En el último día, se procedió con el sacrificio de los animales del mismo modo que se detalla más arriba. En este experimento, se obtuvo la sangre troncal, porciones de hígado (para la determinación del contenido de TG), y porciones de TAI y TARP para análisis histológico, RT-qPCR y Western

blot. También se aisló el TAP interescapular para corroborar el efecto ya conocido del frío sobre este tipo de tejido.

### *3.2. Obtención de la FEV y cultivo primario de las CPAs*

Para el estudio del potencial adipogénico de los animales deficientes en andrógenos, se obtuvieron las CPAs de la FEV del TARP y del TAI de los grupos CTR y ODX. Para ello, se disecaron los depósitos de TAB en condiciones de asepsia y se colectaron en tubos de plástico estériles con 10 ml de buffer Hanks estéril con antibióticos. A continuación, se centrifugaron a 1000 rpm y se realizaron dos lavados. Luego, bajo una cabina de flujo laminar los depósitos se disgregaron con tijeras previamente esterilizadas. En este procedimiento, se eliminaron los restos de tejido muscular que hayan podido quedar adosados al TA así como también los ganglios linfáticos y grandes vasos sanguíneos asociados. A continuación, se incubó con la enzima colagenasa tipo 1 (1mg/ml cada 1g de TA) para separar las células del tejido en un baño termostático a 37 °C durante 40-60 minutos en agitación. Cada 10 minutos se controló visualmente el proceso de digestión para evitar la posible lisis celular. La incubación con la enzima se detuvo cuando no se observaron restos groseros de tejido con el agregado de medio de cultivo fresco y posterior centrifugación a 1000-1200 rpm durante 15 minutos. En esta etapa, es posible separar los adipocitos maduros que quedan flotando en la parte superior del tubo de la FEV, la cual forma un precipitado en el fondo del mismo. Luego se procedió a la filtración de esta fracción, se realizaron lavados con medio fresco y se continuó con el recuento celular en una cámara de Neubauer. Finalmente se sembraron entre 50 a 60.000 células por pozo en una placa de 12 pozos y se mantuvieron en una estufa a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>. Las células se mantuvieron hasta el momento de confluencia (5-6 días) con medio basal fresco (DMEM suplementado con 10 % v/v de suero fetal bovino (SFB) y antibióticos (100 UI/ml de penicilina y gentamicina). El recambio del medio se realizó cada 48 h. El cultivo celular se visualizó cada día para controlar la proliferación y para evitar la eventual contaminación con microorganismos (levaduras y bacterias, principalmente). Una vez que el cultivo llegó al estado de confluencia (contabilizado aquí como día 0), se empleó un medio de diferenciación pro-beige (DMEM basal con 5 µg/ml insulina, 0,25 µM dexametasona (DXM), 0,5 mM 3-isobutyl-

Lmethylxanthine (IBMX), 1  $\mu$ M rosiglitazona y 0,1 nM triiodotironina (T3)) durante 2 días y luego se reemplazó con medio de mantenimiento (DMEM basal con 5  $\mu$ g/ml insulina y 0,1 nM de T3). Al día 8, se recolectaron las células con Trizol para la posterior determinación de los niveles de expresión de ARNm.

Por otro lado, para el estudio *in vitro* del efecto de los andrógenos sobre la capacidad termogénica, se siguieron los mismos pasos anteriormente descritos con la salvedad que la FEV fue aislada únicamente de animales CTR. Para la determinación del efecto de los andrógenos durante todo el periodo de diferenciación (desde el día 0 hasta el día 8) las células se incubaron con medio control (CTR), con testosterona (0,1  $\mu$ M, T) o con dihidrotestosterona (0,01  $\mu$ M DHT). Al final del experimento (día 8), algunas células fueron incubadas durante 4 h con o sin forskolina (CTR-B, T-B, DHT-B, CTR-FSK, T-FSK y DHT-FSK, respectivamente) y las células se recolectaron con Trizol. Adicionalmente, se estudió el rol del RA a través de la incubación con un antagonista del receptor de andrógenos, flutamida (1  $\mu$ M, F). Otro grupo de células fue incubado con flutamida y testosterona agregados de manera concomitante en el medio de cultivo (FT). Finalmente, al día 8 se incubaron durante 4 h con o sin forskolina 10  $\mu$ M (F-B, FT-B, F-FSK y FT-FSK, respectivamente) y a continuación se recolectaron las células con Trizol para la medida de los niveles de expresión relativos de ARNm de interés. Para estudiar el rol de la testosterona sobre los adipocitos maduros se realizó la diferenciación de las CPAs como se describe más arriba y desde el día 6 al día 8 se incubó con el andrógeno (0,1  $\mu$ M) y se realizó el ensayo con FSK (CTR48f-B, T48f-B, CTR48f-FSK y T48f-B, respectivamente). Por último, para analizar el rol de los andrógenos sobre las propias CPAs, las mismas fueron incubadas con o sin testosterona 0,1  $\mu$ M durante 48 h (CTR d0 y T d0, respectivamente) y recolectadas con Trizol, es decir, no se sometieron a la inducción de la diferenciación. En todos los casos, las muestras recolectadas con Trizol se mantuvieron a  $-80^{\circ}\text{C}$  para la posterior extracción del ARNm total.

### 3.3. Medida de metabolitos plasmáticos

Una vez que se obtuvieron los plasmas de los diferentes grupos experimentales se continuó con la determinación de la concentración de glucosa, triglicéridos,

insulina, testosterona, leptina y fosfatasa alcalina (ALP). A continuación, se describen brevemente los procedimientos utilizados para la medición de cada uno de los metabolitos ensayados.

- a) Glucosa: se empleó el kit comercial de Wiener Lab (Rosario, Argentina) que consiste en la medida espectrofotométrica a 505 nm de longitud de onda del producto generado (quinona coloreada) a partir de la glucosa y las reacciones enzimáticas consecutivas de la glucosa oxidasa y la peroxidasa. La concentración de la quinona obtenida es directamente proporcional a la concentración de glucosa encontrada en la muestra.
- b) Triglicéridos: también se utilizó el kit comercial de Wiener Lab (Rosario, Argentina). Mediante espectrofotometría a 505 nm se determina una quinonimina roja. Dicho producto se genera por las reacciones secuenciales de las enzimas lipoproteína lipasa, glicerol kinasa, glicerol fosfato oxidasa y la peroxidasa. La concentración de la quinonimina obtenida es directamente proporcional a la concentración de triglicéridos encontrada en la muestra.
- c) Insulina: se utilizó un radioinmunoanálisis para su determinación desarrollada en el IMBICE. La hormona marcada se generó en el laboratorio por yodación de insulina comercial (Sigma Chemical, Co.). Asimismo, el anticuerpo anti-insulina fue adquirido en la misma empresa. Luego de la incubación con el anti-suero correspondiente y el trazador, se separa la fracción no unida con el agregado de 2.5 % de carbón y 0.25% de sulfato de dextrán disueltos en buffer y posterior centrifugación. Se descarta el sobrenadante y se mide la radiactividad gamma con el contador de centelleos. La concentración de esta hormona en la muestra se determina a través de la interpolación en la curva estándar obtenida.
- d) Testosterona total: también se cuantificó mediante un RIA específico. En primer lugar, se separó la fase orgánica en las muestras de suero con el agregado de éter y posterior evaporación del mismo. Una vez solubilizado el extracto seco con el buffer de trabajo (gelatina 0,1 % (p/v), en PBS 0,05 M, pH= 7,4) se incubó con antisuero de conejo anti-testosterona desarrollado en el IMBICE y con el trazador obtenido comercialmente y marcado con tritio (<sup>3</sup>H-Testosterone, Amersham, GE Healthcare Life Sciences, Inc). Al día siguiente, se separa la fracción no unida con una mezcla de 1% carbón –

0,1% sulfato de dextrán en buffer de trabajo y a continuación se centrifuga a 4.000 rpm (a 4°C). Luego de la lectura de los cpm, se interpola la concentración de la hormona con el uso de una curva estándar.

- e) Leptina: la medida de esta hormona se realizó mediante un radioinmunoanálisis desarrollado en el IMBICE<sup>184</sup> y validado para rata y ratón frente a un kit comercial (Linco Research, Inc., St. Charles, MO., EEUU; Cat. No. RL-83K). La leptina utilizada corresponde a un péptido murino sintético (PrePro Tech, Inc.). A partir del mismo se obtuvo la leptina marcada (<sup>125</sup>INa) y el suero anti-leptina en conejos inmunizados Tanto en la solución estándar, con cantidades de leptina conocida, como en la muestra se incubó con el anti-suero anti-leptina y el trazador (aproximadamente 30.000 cpm). Luego de separar la hormona libre de aquella unida al anticuerpo mediante precipitación con suero anti- conejo y posterior centrifugación, se procedió a la determinación de la radiactividad gamma emitida en el contador de centelleos. La concentración de esta hormona en la muestra se determina a través de la interpolación en la curva estándar obtenida.
- f) ALP: se utilizó el kit comercial Wiener Lab. (Rosario, Argentina). Se midió a 405 nm el anión p-nitrofenilato (amarillo) obtenido a partir de la actividad de dicha enzima sobre el reactivo p-nitrofenilfosfato. La concentración de este anión es directamente proporcional a la concentración de ALP encontrada en la muestra.

### *3.4. Medida de triglicéridos hepáticos*

En el momento de la disección de los distintos depósitos de TA, se procedió con la obtención de una pequeña porción del hígado para la medición de triglicéridos (siempre de la misma zona: del lóbulo lateral izquierdo). Las muestras fueron guardadas a -80°C hasta su utilización. Para la determinación, primero se pesaron cerca de 50 mg del órgano (la masa exacta utilizada fue registrada) y se homogenizaron con 500 ml de una solución de Tritón X-100 5% en PBS 1X. Acto seguido, se calentó entre 80-100°C durante 2 min para la solubilización de los triglicéridos. Se centrifugó durante 10 minutos a 1000 g y finalmente se midieron los triglicéridos en el sobrenadante de modo similar a lo descripto más arriba.

### 3.5. Tinción histológica y recuento de adipocitos

En el momento del sacrificio, una porción del TA fue tomada y colocada en un tubo que contenía para formaldehído al 4% para el posterior procesamiento histológico. Los tejidos se lavaron con agua corriente durante toda la noche y se deshidrataron a través de la incubación con soluciones de alcohol etílico de concentraciones crecientes (primero al 70% durante 24-48 h, luego dos veces durante 2 h al 96% y finalmente luego dos veces durante 2 h al 100%). Finalmente, los depósitos se aclararon con xilol (Merck, Argentina) durante 6 h hasta observar un tejido translucido. Luego los tejidos se colocaron en frascos con parafina durante 6 h (para TARP) o durante toda la noche (para TAI) a 58°C. Pasado este tiempo, los tejidos se retiraron de la estufa, se los incluyó en parafina a temperatura ambiente para que este solidifique y se procedió al armado del taco. Mediante el uso de un micrótopo, se obtuvieron cortes de 5 µm de espesor que se colocaron sobre portaobjetos. A continuación, fueron desparafinados con xilol, re-hidratados con soluciones de alcohol etílico de concentraciones decrecientes (80%, 70% y 50% durante 1 minuto) y teñidos con hematoxilina (colorante básico que se une a estructuras con carga negativa al pH de trabajo, como por ejemplo, ADN) y eosina (colorante ácido que se une a estructuras con carga positiva, como por ejemplo mitocondrias). Cabe aclarar que los lípidos de los TA se pierden durante la preparación de la muestra y por lo tanto son observados como espacios sin tinción. Finalmente, se procedió a una nueva deshidratación con xilol y posterior montaje con Bálsamo de Canadá y colocación de cubreobjetos.

Las muestras así obtenidas fueron visualizadas en un microscopio óptico Nikon con cámara Sony RGB CDD. Posteriormente, las imágenes a 40X se analizaron con Adiposoft<sup>185</sup>, un *plugin* del software Fiji (Image J). Para cada tejido, se utilizaron alrededor de 7 secciones obtenidas de 3 zonas diferentes del mismo.

### 3.6. Microscopia de transmisión electrónica

La suspensión celular de cultivos CTR-B y T-B en PBS se centrifugó a 800 g durante 5 min y se fijó en glutaraldehído al 2 % en tampón fosfato 0,2 M (pH 7,2–7,4) durante 2 h a 4 °C. La fijación secundaria se realizó con tetróxido de osmio al

1% durante 1 h a 4 °C y, posteriormente, las muestras se deshidrataron en una serie creciente de alcoholes y se incluyeron en resina epoxi. Se contrastaron secciones ultrafinas (90 nm) con acetato de uranilo y citrato de plomo y se examinaron de 10 a 15 campos en cada condición en un microscopio electrónico de transmisión JEM 1200 EX II (JEOL Ltd., Tokio, Japón) y se fotografiaron con un Erlangshen ES1000W, Modelo 785 (Gatan Inc., Pleasanton, California, USA) en el Servicio Central de Microscopía Electrónica de la Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata.

### 3.7. Medida de los niveles relativos de expresión ARNm por RT-qPCR

Para la determinación de los niveles relativos de expresión se empleó la técnica de retro transcripción PCR cuantitativa (RT-qPCR). En primer lugar, se realizó la extracción de ARNm total desde los diferentes depósitos de TAB utilizados y de los cultivos primarios mediante el uso del reactivo Trizol. Posteriormente, se cuantificó el ARN obtenido con el NanoDrop a una longitud de onda de 260 nm. La pureza fue determinada considerando la relación A260/A280 (que debe estar cercana a 1,8 para ADN y 2 para ARN). La contaminación con péptidos, carbohidratos, fenoles o compuestos aromáticos se determinó con la relación A260/230 (que debe ser mayor a 2). A continuación, se siguió con la obtención de ADN complementario (ADNc). La reacción fue realizada utilizando 0,5 µg de ARN, la enzima transcriptasa reversa RevertAid (200 U/µl, Thermo Scientific) junto con *random primers* (0,01 µg/µL) y dNTPs (1mM). Las muestras obtenidas fueron almacenadas a -20°C hasta su utilización. En cada una de las reacciones de PCR en tiempo real se empleó 1 µl del producto obtenido junto con 4 µl del reactivo listo para usar HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Mix Plus (ROX) (Solis BioDyne que contiene buffer, ADN polimerasa, dNTPs, colorante Eva Green y 12,5 mM de MgCl<sub>2</sub>), 0,25 µM de los pares de primers específicos que amplifican el gen de interés (diseñados con el programa PrimerBlast y cuya secuencia se detallan en la tabla) y agua libre de nucleasas para obtener 20 µl de volumen final por mezcla de reacción.

---

<b>Gen</b>	<b>Secuencia (5'-3')</b>	<b>GBAN</b>	<b>Tamaño del producto (pb)</b>
AdipoQ	Fw: AATCCTGCCCAGTCATGAAG Rv: TCTCCAGGAGTGCCATCTCT	NM_114744	159
Adrb3	Fw: AGTGGGACTCCTCGTAATGC Rv: TTACACAGAGCACGTCCACT	NM_013108	110
Ar	Fw: TTGCCATGGGTTGGCGGTCC Rv: GGTGCCTCATCCTCACGCACT	NM_012502	129
Atg7	Fw: TTACTGCTCCACCAAGAGAC Rv: ACTCCTGAGCTGTGGTTGCT	NM_001012097.1	87
Atg12	Fw: TGAATCAGTCCTTTGCCCT Rv: GTTCATTTGTGGCTCATCCCC	NM_001038495.1	126
Beta Act	Fw: ACAACCTTCTTGCAGCTCCTC Rv: CTGACCCATACCCACCATCAC	NM_031144	200
Cox8b	Fw: CCGAGAATCATGCCAAGGCT Rv: TCCTGCTGGAACCATGAAGC	NM_012786.3	174
Dio2	Fw: CTGGCGCTCTATGACTCGG Rv: ACGTGCACCACACTGGAAT	NM_031720	194
Ebf2	Fw: TCTTATCCTACATCCCACACCC Rv: TGAGTCTGGTTTCTGTGGTGG	NM_001108383.1	113
Ob	Fw: GAGACCTCCTCCATCTGCTG Rv: CTCAGCATTGAGGGCTAAGG	NM_13076	192
Pdgfra	Fw: AGGCTTGGGGCTCACTTTTT Rv: AAGAGCTGGCAGACGATGAG	NM_012802.1	153
Pgc1a	Fw: AAAAGCTTGACTGGCGTCAT Rv: ACACCACTTCAATCCACCCAG	NM_031347	199

---

Pink1	Fw: GTATGAAGCCACCATGCCCA Rv: ACGACATCTGGGCCTTTTCC	NM_001106694.1	84
Pparg2	Fw: AGGGGCCTGGACCTCTGCTG Rv: TCCGAAGTTGGTGGGCCAGA	NM_047696	185
Prdm16	Fw: CGTGCTCAGGGTCTGACTTT Rv: TCTCCTTTCCGGATCGTCCCT	XM_017593884	194
Ucp1	Fw: CCGAAACTGTACAGCGGTCT Rv: GTCATCAAGCCAGCCGAGAT	NM_012682	155
Ulk1	Fw: TGGAGACCTGGCTGACTACC Rv: TCACGGTGAATGATGCCCTT	NM_001108341.1	123

**Tabla 1. Primers específicos de rata utilizados esta tesis en orden alfabético utilizados en el presente trabajo.** Fw: forward; Rv: reverse; GBAN: GenBank Accession Number.

Cada una de las mismas fueron realizadas por duplicado y el programa utilizado en el equipo RotorGene consistió en los siguientes pasos de clicado:

Etapa del Ciclado	Temperatura	Tiempo	Cantidad de Ciclos
Activación Inicial	95°C	15 minutos	1
Desnaturalización	95°C	15 segundos	40
Alineamiento	60°C	20 segundos	40
Elongación	72°C	20 segundos	40

Además, se realizó una curva de *melting* para determinar la especificidad y pureza del amplificado. El software utilizado fue Rotor-Gene Q Series Software versión 2.3.1 (Build 49). Finalmente, el análisis de la expresión relativa se llevó a cabo considerando en todos los casos al gen de la beta actina como referencia y utilizando el método  $\Delta\Delta Ct$ .

### 3.8. Cuantificación del contenido mitocondrial relativo

Las células de cultivos CTR-B y T-B se trataron con tampón de lisis (EDTA 40 mM, NaCl 50 mM, Tris 100 mM, SDS al 0,2 %) en PBS (2:1). Después de 3 días de agitación a temperatura ambiente, las proteínas se precipitaron con NaCl 5,4 M, se centrifugaron a 8000 rpm durante 20 min y el ADN soluble se precipitó con alcohol isopropílico frío. Finalmente, el ADN se disolvió en tampón TE y se cuantificó por espectrofotómetro a 260 nm. Para las reacciones de PCR, se utilizaron 5 ng para las determinaciones de RNAt-Leu (gen mitocondrial, Fw: GGTGGCAGAGCCAGGTAAT y Rv: AGGATTTGAACCTCTGGGAAC) y microglobulina  $\beta$ 2 (gen nuclear, Fw: CCCTATAGTGTGCGGTCGTT y Rv: GACGAGCATGCACTCCACTA).

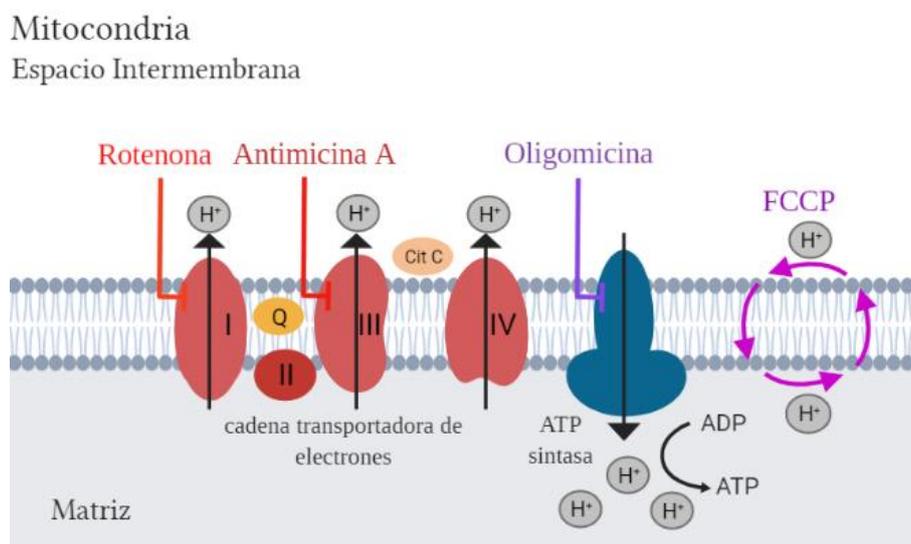
Los cambios relativos en el contenido mitocondrial del ADN se calcularon mediante el método  $\Delta\Delta C_t$

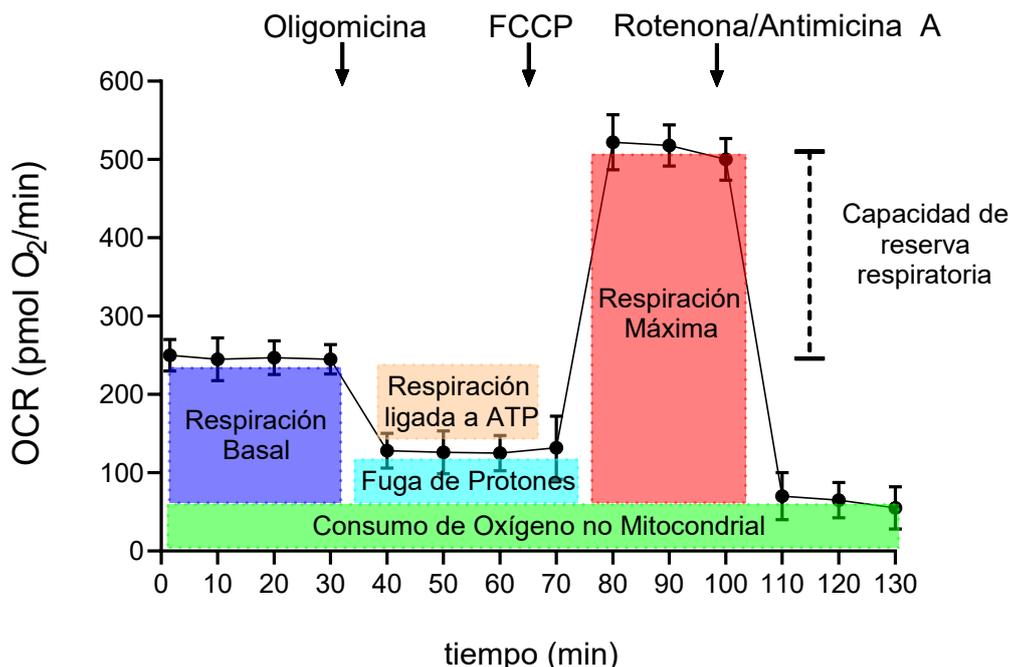
### *3.9. Medida de la tasa de consumo de oxígeno*

Como medida de la función mitocondrial se evaluó la tasa de consumo de oxígeno (OCR) en tiempo real en células vivas con el equipo Agilent Seahorse XF Cell Mito Stress. En la parte superior de la figura 10 se ilustra la cadena transportadora de electrones junto con la indicación de los blancos de las drogas utilizadas. En la parte inferior de la misma figura puede verse el registro típico obtenido en este tipo de ensayo junto con los parámetros que se desprenden a partir del mismo y del agregado secuencial de los diferentes inhibidores. En primer lugar, las primeras medidas se toman sin el agregado de ningún reactivo para obtener la respiración basal, referido como el consumo de oxígeno para satisfacer la demanda de ATP resultante de la fuga de protones y muestra la demanda energética de la célula en condiciones basales. Luego se procede con el agregado de Oligomicina, que inhibirá la ATP sintasa (complejo V) y por lo tanto disminuirá el OCR. El parámetro obtenido representa la porción de la respiración basal utilizada para la producción de ATP que contribuye al mantenimiento de la demanda energética celular. La fuga de protones corresponde a la respiración basal desacoplada a la síntesis de ATP. Puede indicar daño celular o como un mecanismo para regular la producción de ATP. Luego se procede con el agregado de FCCP, un desacoplante de la cadena transportadora de electrones. Aquí se obtiene la respiración máxima ya que estimula a que la cadena transportadora de electrones

opere en la mayor capacidad posible. Finalmente, el agregado en conjunto de rotenona/antimicina A. En este caso, se produce el descenso en el OCR debido a la inhibición de los complejos I y III, respectivamente. En este caso, se obtiene la respiración no mitocondrial que es el OCR debido a la actividad enzimática que continúan con el consumo de oxígeno.

Para este ensayo, se sembraron células de la FEV del TARP a razón de 5000 células/pocillo en una microplaca XFp. Luego, las células fueron diferenciadas y tratadas o no con testosterona 0,1  $\mu\text{M}$  hasta el día 6, como se describió anteriormente. En el día experimental, las células se lavaron y estabilizaron, y las OCR se realizaron utilizando el analizador Seahorse XFp, siguiendo las instrucciones del fabricante. En primer lugar, se midió la respiración basal y luego se incubaron las células con oligomicina (2  $\mu\text{M}$ ), FCCP (1,5  $\mu\text{M}$ ) y rotenona/antimicina A (2  $\mu\text{M}$  / 2 $\mu\text{M}$ ). Todos los experimentos se realizaron a 37 °C. Para los parámetros de respiración<sup>186</sup>, se obtuvo el OCR no mitocondrial después de agregar rotenona/antimicina A y se restó del OCR inicial (respiración basal) y OCR después de agregar FCCP (respiración máxima). La capacidad respiratoria de reserva se calculó como la respiración máxima menos la respiración basal.





**Figura 10. Perfil de OCR típico junto con los parámetros obtenidos a partir del mismo.** Arriba se esquematiza la cadena transportadora de electrones junto con las dianas de cada uno de los inhibidores utilizados. Abajo se muestra una corrida típica de determinación del consumo de oxígeno en cultivo celular. Se indica el agregado de la drogas junto con los parámetros obtenidos en cada caso.

### 3.10. Determinación del contenido proteico mediante Western blot

Para el análisis de las proteínas de interés, se aislaron del TAI y del TARP de los diferentes grupos experimentales, se los trató con buffer de lisis (solución de RIPA que contiene 150mM de NaCl, 1% de Tritón X-100, 0.5% de desoxicolato de sodio, 0.1% de SDS y 50 mM de Tris, pH 8,0) suplementado con inhibidores de proteasas (Aprotinina 2 µg/ml, PMSF 1mM y Ortovanadato de Na 1mM) y se disgregaron con tijera y sonicador manteniéndolos en hielo. Luego, se centrifugó a 15.000 rpm a 4°C durante 15 minutos y se separó el sobrenadante del precipitado teniendo la procuración de no arrastrar la capa de lípidos que queda en la región superior del tubo. Las alícuotas con los extractos de proteínas fueron guardadas a -80°C para la posterior cuantificación e inmunodetección.

Para la determinación de la concentración de proteínas, se utilizó el método de Lowry empleando diluciones seriadas de seroalbúmina bovina (BSA) como estándar. La cuantificación de la absorbancia se llevó a cabo con un

espectrofotómetro a una longitud de onda de 550 nm. Cada una de las muestras fue cuantificada por cuadruplicado.

Para la corrida electroforética, se sembraron 20-80 µg del extracto de proteínas y el marcador de peso molecular (Precision Plus Protein Standards, catálogo #161-0374 BIO-RAD) solubilizadas en buffer de carga Laemmli <sup>187</sup> 6x (glicerol 60%, 12 % SDS, 30 % de 2 beta mercaptoetanol, 0,375 Tris-HCL y 0,012 % de azul de bromofenol ajustada a pH 6,8). Las muestras se calentaron durante 5 minutos a 95°C y se corrieron en un gel de 12,5% de SDS-poliacrilamida a 55 mA. Una vez que las proteínas de interés (que se encuentran desnaturalizadas y reducidas) se separaron de acuerdo a su peso molecular, estas fueron transferidas a una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF) mediante electroforesis (SDS-PAGE) a 350 mA durante 45-90 minutos en refrigeración. Para el bloqueo, se utilizó BSA al 5% disuelta en TBS-T (Tris buffer salino con 0,1 % de Tween 20) durante 1 h a temperatura ambiente en agitación. A continuación, la membrana se incubó con el anticuerpo primario correspondiente (Tabla 2) durante toda la noche en heladera. Al día siguiente, se realizaron tres lavados durante 5 minutos con TBS-T y se incubó con el anticuerpo secundario adecuado acoplado a HRP (Tabla 2) durante 2 hs a temperatura ambiente. Finalmente, se procedió con los lavados con TBS-T y un último lavado con TBS (5 minutos).

La visualización de la quimioluminiscencia se realizó con un kit casero mezclando en buffer ECL (Tris 100mM) luminol (1,125 mM), ácido para-cumárico (0,46 mM) y peróxido de hidrogeno (26 mM). En el cuarto oscuro, la emisión de luz fue capturada con placas fotográficas (Carestream Medical X-ray Green / MXG film) a distintos tiempos y se revelaron para el posterior escaneo y cuantificación de la intensidad de las bandas con el programa Image J. Para el cálculo de la cantidad relativa de las proteínas de interés, la intensidad de las bandas de estas se refrieron a la intensidad de las bandas de beta-actina correspondientes.

<b>Anticuerpo</b>	<b>Catálogo/Lote/Proveedor</b>	<b>Dilución</b>
Anti beta Actina	Cat # bs-0061R Lot # AH01032107 Bios Antibodies	1/4.000

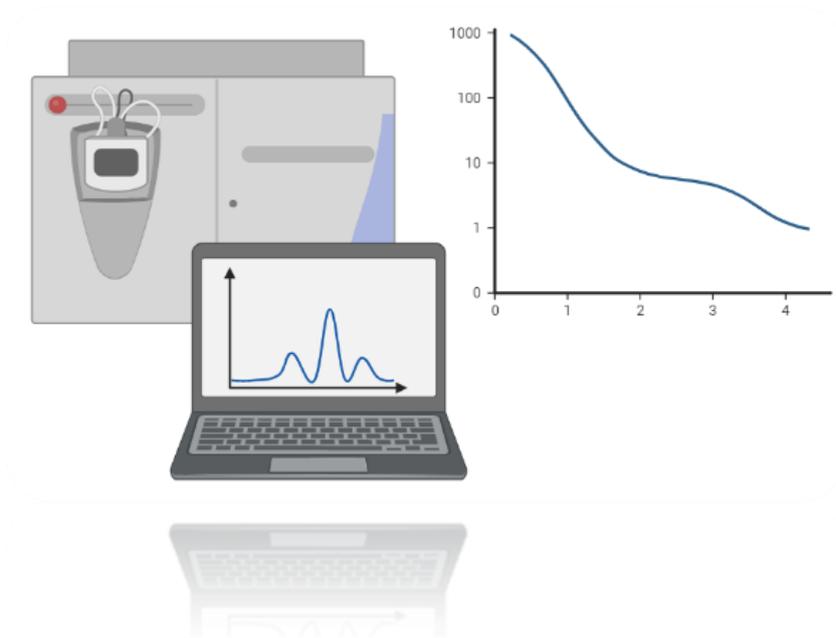
Anti UCP1	Cat # ab-10983 Lot # GR214286-5 Abcam	1/3.500
Anti PPARG	Ca t# sc-7196x Lot # H1514 Santa Cruz	1/1.000
Anti CYT C	Cat # sc-13156 Lot # D1117 Santa Cruz	1/200
Anti conejo conjugado a HRP	Cat # sc-2004 Lot # 22905 Santa Cruz	1/10.000
Anti ratón conjugado a HRP	Cat # sc-516102 Lot # E1519 Santa Cruz	1/1.000

**Tabla 2. Anticuerpos utilizados en el presente trabajo.**

### 3.11. Análisis estadístico

Los resultados obtenidos en el presente trabajo de tesis fueron graficados y analizados mediante el programa estadístico GraphPad Prism versión 8. En primer lugar, los datos obtenidos fueron analizados con la prueba de Shapiro-Wilk para comprobar si los mismos presentaban distribución normal. Luego se siguió con la prueba estadística correspondiente. En cada leyenda de cada uno de los gráficos generados se especifica la prueba estadística empleada ya sea la prueba t de Student bilateral, para el análisis de dos medias normalmente distribuidas, Mann-Whitney bilateral en el caso en que los datos no estén normalmente distribuidos o ANOVA de 2 vías para el análisis de dos variables independientes y sus posibles interacciones. En este último caso, el análisis se finalizó cuando alguna de las variables resultó estadísticamente significativa pero cuando la interacción (ya sea positiva o negativa) entre las mismas fue significativa, se utilizó la prueba de Sidak para realizar las comparaciones múltiples entre los grupos. En todos los casos, los resultados se consideraron estadísticamente significativos cuando el valor p fuera menor a 0,05.

# 4. Resultados



## 4.1. Caracterización del modelo de depleción de andrógenos generado durante la edad prepuberal

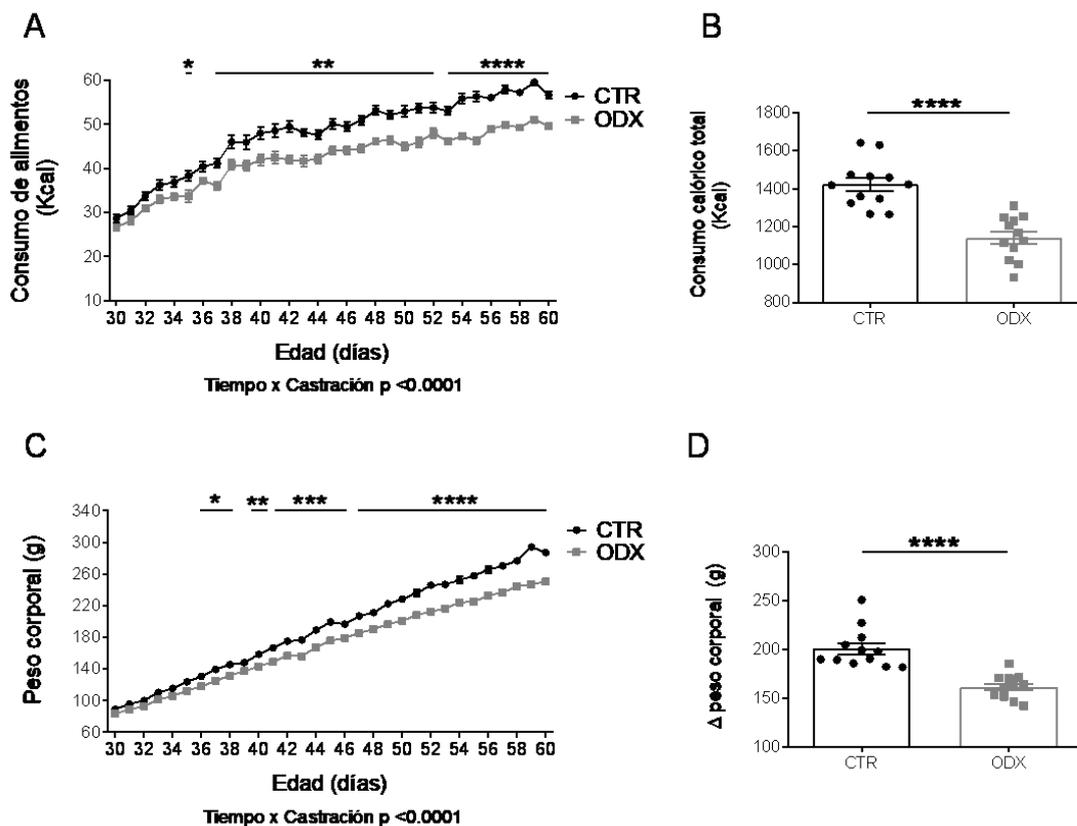
### 4.1.1. La depleción prepuberal de andrógenos ocasiona cambios metabólicos en la edad adulta

En los animales machos, las células intersticiales ubicadas entre los túbulos seminíferos de los testículos son la principal fuente de síntesis de los andrógenos. En general, los modelos de depleción de andrógenos descritos en la literatura corresponden a castraciones realizadas durante la edad adulta del animal, cuando el pico de secreción de andrógenos en la pubertad ya ha ocurrido y los niveles de andrógenos se mantienen relativamente estables. Por otro lado, también existen modelos murinos *knock out* para el receptor de andrógenos (ARKO) para el estudio de estas hormonas sobre el TA, en donde la ausencia de acción los andrógenos ocurre desde la etapa intrauterina. En esta sección, se evaluaron los efectos de la depleción prepuberal de andrógenos sobre el TA.

En primer lugar se realizó una caracterización metabólica del modelo empleado para este trabajo. Para ello se utilizaron animales controles (CTR) y orquidectomizados (ODX). Las castraciones bilaterales fueron realizadas a los 27 días de edad y los animales sometidos a este procedimiento se dejaron recuperar durante 3 días. A continuación, se registraron el peso corporal y el consumo de alimento desde los 30 hasta los 60 días de edad a la misma hora diariamente. Asimismo, se calculó el consumo calórico total durante esos 30 días así como la ganancia de peso corporal. En la figura 11 se muestran los gráficos correspondientes. Debido a que los animales aún se encuentran en una etapa de crecimiento, puede observarse el incremento tanto del consumo de alimento (Fig. 11A) como del peso corporal (Fig. 11C) en ambos grupos a lo largo del tiempo experimental. En ambos casos el análisis estadístico mostró una interacción entre las variables tiempo y castración, lo que indicaría que el efecto de la castración se acentúa con el crecimiento de los animales (Fig. 11A y C). Como era de esperarse a partir de estos resultados, los animales castrados presentaron una menor ingesta de

alimento total (Fig. 11B) a la vez que ganaron menor peso corporal (Fig. 11D) durante esos 30 días.

A continuación se siguió con la medida de ciertos metabolitos plasmáticos de interés (tabla 3). En primer lugar se observó que la testosterona plasmática total disminuyó en los animales orquidectomizados comparado con los controles, corroborando que dicha intervención permitió obtener un modelo de depleción de andrógenos. En adición, se halló un descenso en los niveles plasmáticos de leptina en el grupo castrado mientras que la insulinemia, la glucemia y la concentración de ALT plasmática permanecieron sin cambios. Sin embargo, el grupo ODX presentó una menor trigliceridemia.



**Figura 11. La castración prepuberal altera el consumo de alimento y la ganancia de peso corporal.** Registro diario del consumo de calorías (A) y del peso corporal (B) desde los 30 a los 60 días de edad de animales controles (CTR) y orquidectomizados (ODX). Cálculo de las calorías totales ingeridas durante los días experimentales (C) y del incremento del peso corporal obtenido como la resta entre el valor del peso final y el valor del peso inicial (D). Los valores se muestran como la media  $\pm$  EEM.  $n=12$  animales por grupo. Para el análisis estadístico se empleó la prueba t de Student bilateral. \* $p < 0.05$  y \*\*\*\* $p < 0.0001$  vs CTR.

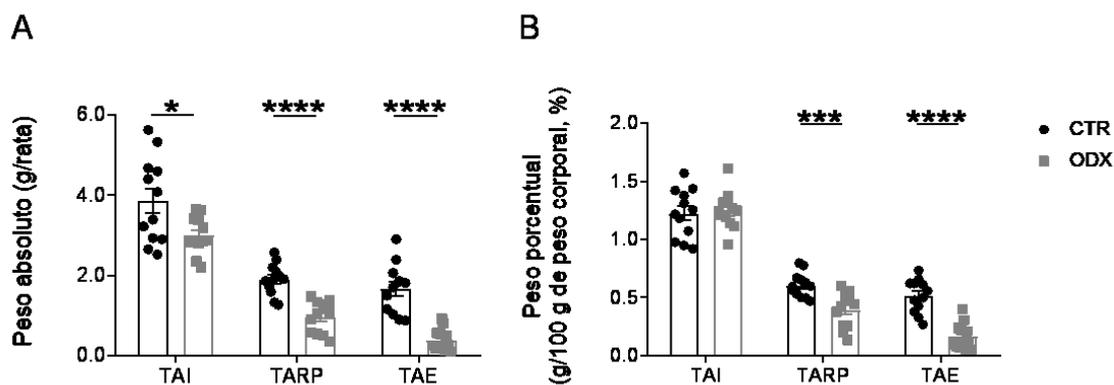
	CTR	ODX
<b>Testosterona plasmática (ng/ml)</b>	2.17 ± 0.33	0.57 ± 0.04***
<b>Leptina plasmática (ng/ml)</b>	3.21 ± 8.82	0.96 ± 0.14**
<b>Insulina plasmática (ng/ml)</b>	0.84 ± 0.14	1.06 ± 0.08
<b>Glucosa plasmática (g/l)</b>	1.41 ± 0.06	1.33 ± 0.05
<b>Triglicéridos plasmáticos (g/l)</b>	1.19 ± 0.19	0.70 ± 0.05**
<b>ALT plasmática (UI/l)</b>	75.07 ± 4.04	75.35 ± 1.85

**Tabla 3. Medida de análisis plasmáticos en cada grupo experimental.** Los valores se muestran como la media ± EEM. n=12 animales por grupo. Para el análisis estadístico se empleó la prueba t de Student bilateral. \*\*p<0.01 y \*\*\*p<0.001 vs CTR

#### 4.1.2. La depleción de andrógenos modifica las masas del TA subcutáneo y visceral

En el momento del sacrificio, se aislaron los depósitos de TAB y se determinaron el peso total y porcentual. De esta manera, el peso absoluto de TAI fue significativamente menor en el grupo ODX comparado con el CTR (Fig. 12A). Estas diferencias también fueron encontradas para los depósitos viscerales analizados, es decir, el TAE y el TARP (Fig. 12A). Luego se calculó el peso porcentual, debido a que los animales ODX presentaron menor peso corporal y esto podría ocasionar por sí mismo una disminución en la masa de órganos y tejidos. De este modo, el peso porcentual del TAI permaneció sin cambios (Fig. 12B). En tanto que para los depósitos viscerales la disminución del peso porcentual en el grupo ODX continuó resultando significativa (Fig. 12B). Por lo tanto, la castración en etapas prepuberales provocó una disminución en la ingesta de alimento que fue acompañado por un descenso en el peso corporal, en los pesos absolutos de los depósitos estudiados y en los pesos porcentuales del TARP y del TAE. Cabe aclarar que para los siguientes ensayos continuamos con el estudio del TAI y del TARP, éste último como representante de un depósito visceral.

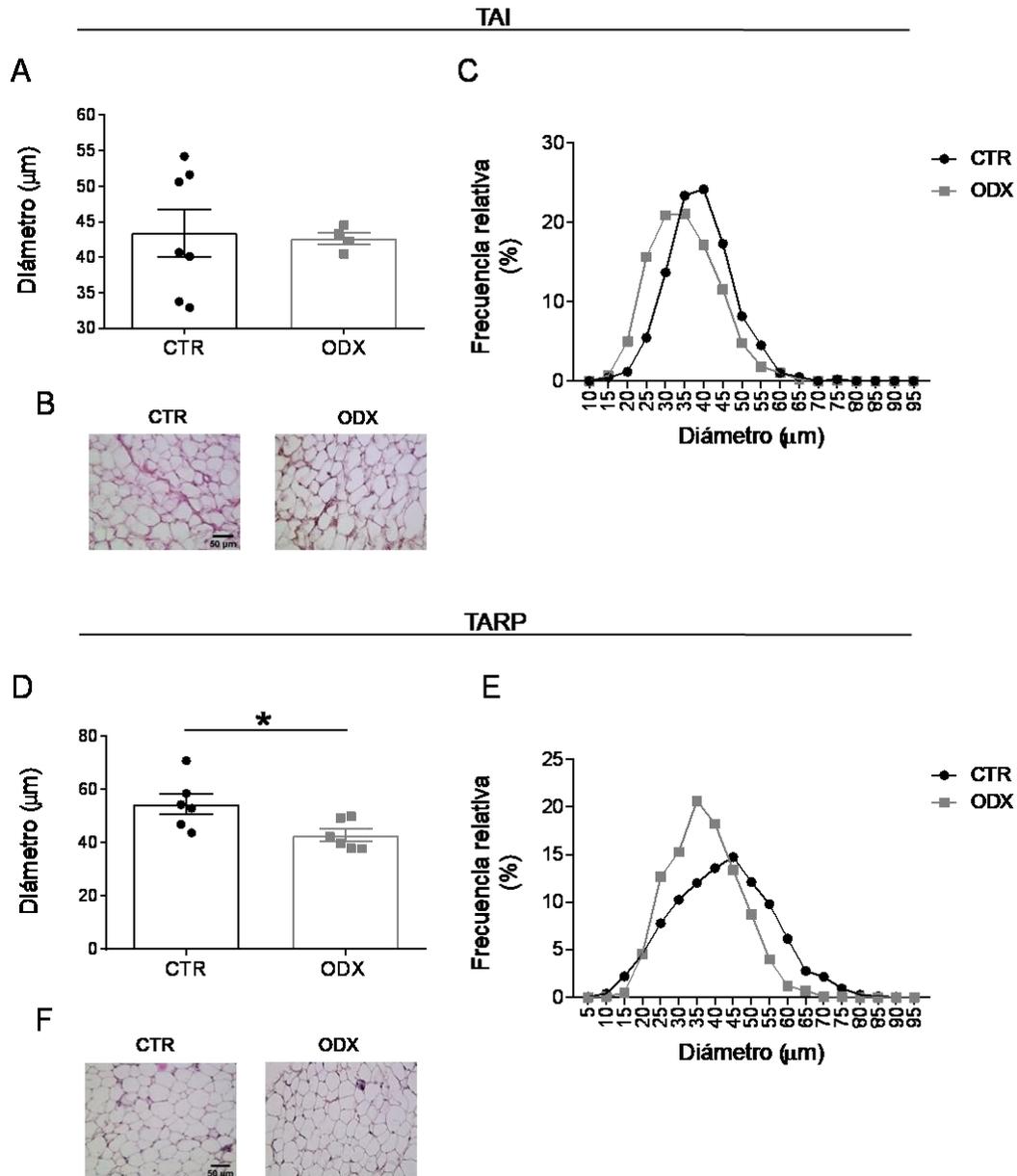
## Resultados



**Figura 12. La castración prepuberal disminuye el peso de los depósitos de TA.** Valores de masas absolutas de los diferentes depósitos del TA (A) y de las respectivas masas porcentuales calculadas cada 100 g de peso corporal (B). Los valores se muestran como la media  $\pm$  EEM. n=12 animales por grupo. Para el análisis estadístico se empleó la prueba t de Student bilateral. \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001y \*\*\*\*p<0.0001 vs CTR.

#### 4.1.3. El análisis histológico de los depósitos del TA revela adipocitos de menor tamaño en el TARP

Debido a que los andrógenos pueden regular los procesos de lipólisis, lipogénesis y adipogénesis y luego de observar que el peso porcentual de TAI no cambia en el grupo ODX pero sí en el TARP se prosiguió con el análisis histológico de ambos depósitos para verificar si se producían cambios a nivel morfológico en los adipocitos. En este caso, no se encontraron diferencias en el diámetro de los adipocitos del TAI entre los grupos CTR y ODX (Fig. 13A) pero se observó una disminución en este parámetro en los adipocitos provenientes del TARP de los ODX (Fig. 13D). Además, para determinar la posible existencia de algún efecto sobre las poblaciones adipocitarias, se graficó la frecuencia relativa de distribución del diámetro adipocitario. Como puede observarse no hubo cambios en la población adipocitaria por efecto de los andrógenos, siendo esta una distribución normal en ambos tipos de depósitos (Fig. 13C y E). Asimismo la presencia de adipocitos más pequeños en el TARP del grupo ODX podría ser un indicio del efecto que tienen los andrógenos sobre el metabolismo lipídico y/o sobre la generación de nuevos adipocitos. Además en el contexto del *browning*, la termogénesis se acompaña por un incremento en la utilización de AG como fuente de energía para generar calor y por lo tanto esto podría ser una posible causa en la disminución del tamaño celular.

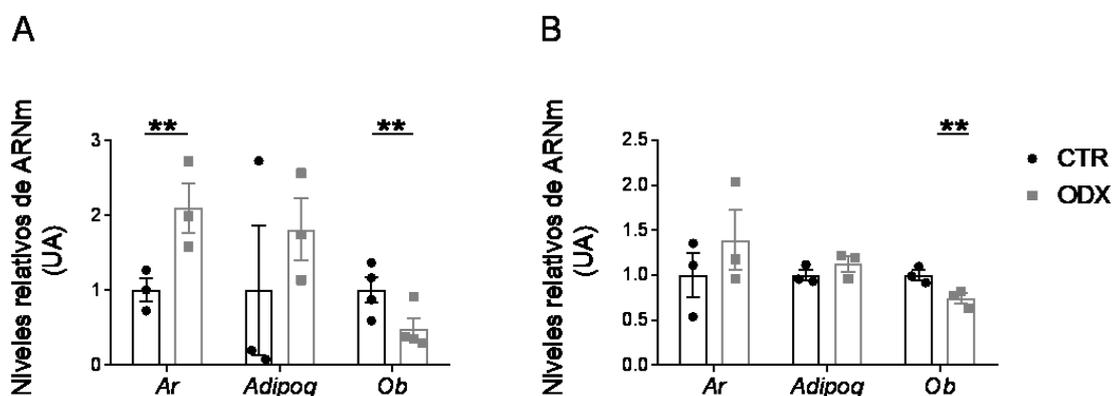


**Figura 13. La depleción de andrógenos disminuye el tamaño de los adipocitos del TARP.** Microfotografías de secciones representativas de TA teñidas con H-E (magnificación de 400x) junto con el análisis del tamaño de los adipocitos en el TAI (**A**) y del TARP (**B**). Los valores se muestran como la media  $\pm$  EEM.  $n = 4-7$  animales por grupo. Para el análisis estadístico se empleó la prueba t de Student bilateral.  $*p < 0.05$  vs CTR. Distribución del diámetro de la población adipocitoria de TAI (**C**) y del TARP (**D**).

#### 4.1.4. Efectos de la depleción de andrógenos sobre la expresión del receptor de andrógenos, leptina y adiponectina

Para continuar con la evaluación los posibles cambios ocasionados por la castración, se midieron los niveles de ARNm mediante RT-qPCR del receptor de andrógenos (Ar) y de dos adipoquinas relacionadas con el balance energético: leptina (Ob) y adiponectina (AdipoQ) (Fig. 14A y B). Aquí se observó un incremento en los niveles de expresión de Ar en el TAI de las ratas ODX. Por otro lado, en el TARP no hubo diferencias significativas aunque si una leve tendencia al incremento del ARNm del Ar. En el anexo se encuentra la comparación entre los niveles relativos de Ar entre ambos tipos de TAB de animales CTR (Fig. 33). Así se compró el incremento en la expresión de este receptor en el depósito visceral.

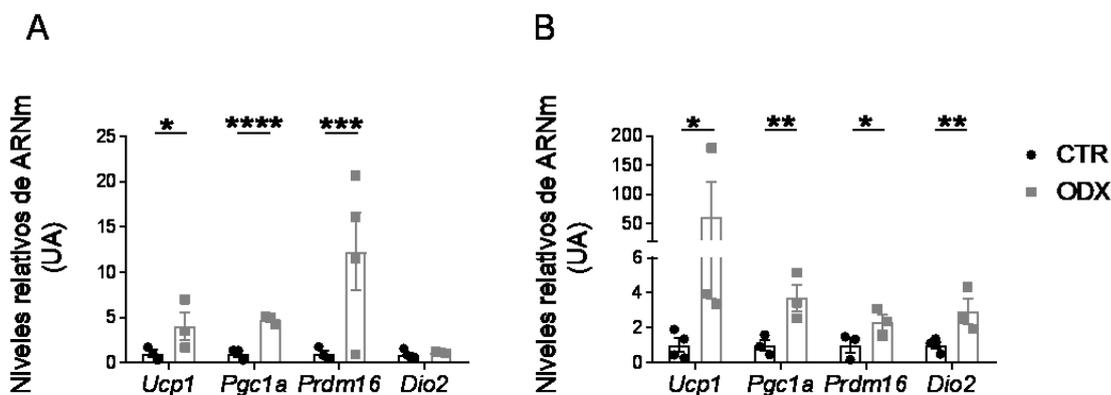
Los niveles de transcritos de AdipoQ no presentaron diferencias significativas entre los grupos CTR y ODX en ninguno de los depósitos de TAB, aunque se puede ver una leve tendencia al incremento en ambos depósitos. Por otro lado, los niveles de ARNm de Ob disminuyeron en ambos tejidos provenientes de los ODX, lo cual coincide con el descenso en la concentración plasmática de esta adipoquina, que es secretada principalmente por el TAB. De esta manera, la castración prepuberal modificó los niveles de ARNm del Ar en el TAI y de Ob en ambos depósitos empleados.



**Figura 14. El grupo de animales castrados presenta cambios en los niveles de expresión de genes de Ar y Ob.** Se muestran los valores de expresión relativa de ARNm de Ar, AdipoQ y Ob en el TAI (A) y del TARP (B). Los valores se muestran como la media  $\pm$  EEM. n= 3-4 animales por grupo analizado por duplicado. Para el análisis estadístico se empleó la prueba t de Student bilateral. \*\*p<0.01 vs CTR

#### 4.1.5. El grupo ODX presenta un incremento en la expresión de genes termogénicos en los depósitos de TA a temperatura ambiente

Luego de la caracterización de parámetros generales del modelo de depleción de andrógenos se prosiguió con el análisis de marcadores termogénicos de los depósitos de TAB, con el fin de evaluar si la ausencia de andrógenos afectaba la termogénesis basal del TAB (Fig. 15A y B). Este trabajo se centró en el mecanismo de termogénesis dependiente de UCP1. Por lo tanto, se evaluaron los niveles ARNm de marcadores termogénicos relacionados con este proceso. En este sentido, los niveles de Ucp1, Pgc1a y Prdm16 se encontraron elevados en ambos depósitos de TAB mientras que Dio2 se incrementó solo en el TARP. En adición a estos hallazgos, puede verse que la magnitud de incremento ocasionada por la castración fue mayor para el depósito visceral que para el subcutáneo. De este modo, se podría pensar que la ausencia de andrógenos promueve la presencia de adipocitos con menor diámetro dentro del TARP e incrementa la capacidad termogénica de ambos tipos de TAB siendo de mayor magnitud en el TARP.

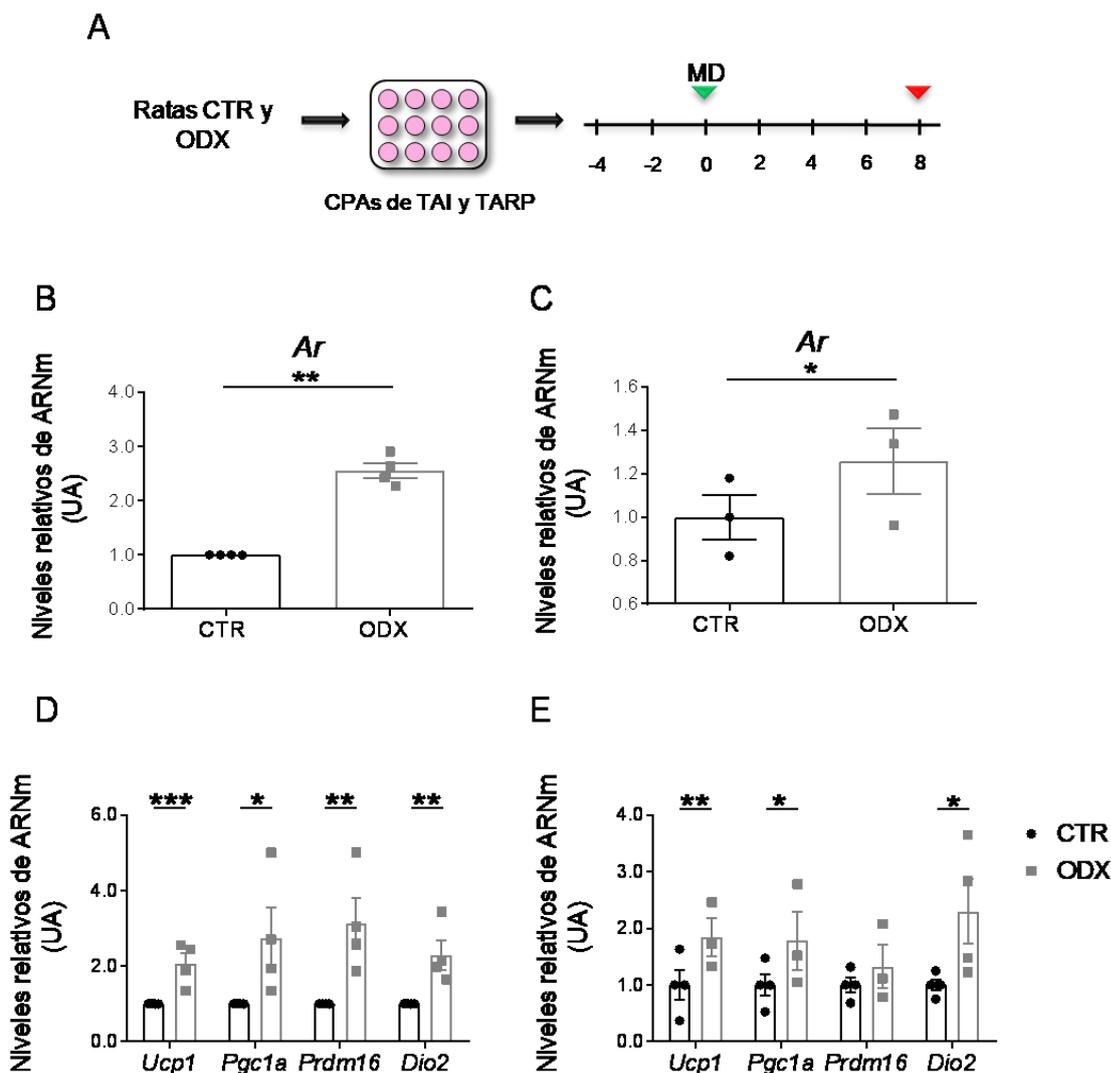


**Figura 15. Los animales ODX presentan un incremento en la expresión de marcadores termogénicos.** Niveles de expresión relativa de ARNm de marcadores relacionados con la termogénesis del TA (Ucp1, Pgc1a, Prdm16 y Dio2) en el TAI (A) y en el TARP (B). Los valores se muestran como la media  $\pm$  EEM. n= 3-4 animales por grupo analizado por duplicado. Para el análisis estadístico se empleó la prueba t de Student bilateral. \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001, \*\*\*\*p<0.0001 vs CTR.

#### 4.1.6. Las células precursoras de adipocitos del grupo ODX generan adipocitos beige con mayor capacidad termogénica

Luego de encontrar que los depósitos de TAB provenientes de los animales ODX presentaban mayores niveles de expresión de genes involucrados en la termogénesis, se evaluó si las CPAs aisladas a partir de estos tejidos eran capaces de generar adipocitos con capacidad termogénica *in vitro*. Así, una vez que las células llegaron a confluencia (día 0), las mismas fueron diferenciadas y mantenidas hasta el final del experimento (día 8) (Fig. 16A). En este punto se prosiguió con la determinación de los transcritos de los genes de interés. En primer lugar, los niveles del Ar fueron mayores en las células provenientes de ambos depósitos del grupo ODX versus el grupo CTR (Fig. 16B y C). Este efecto ya fue observado cuando se analizaron los niveles de expresión de este gen a nivel tisular. A continuación se midieron los niveles de ARNm de Ucp1, Pgc1a, Dio2 y de Prdm16, genes involucrados en la termogénesis (Fig. 16D y E). Como resultado, se encontró que Ucp1, Pgc1a, y Dio2 estaban elevados en los adipocitos diferenciados *in vitro* en el TAI y en el TARP de los animales ODX, en tanto que Prdm16 solo se incrementó en el TAI de los ODX. Estos resultados podrían indicar que la ausencia de andrógenos *in vivo* deja alguna impronta en las CPAs que permite que estas células se diferencien *in vitro* hacia adipocitos beige en mayor medida al ser estimuladas para diferenciarse hacia este linaje adipocitario.

## Resultados



**Figura 16. Las CPAs diferenciadas del grupo ODX muestran un incremento en la expresión de marcadores termogénicos.** Esquema experimental utilizado para la determinación del potencial de los CPAs de generar adipocitos beige *in vitro* (A). Medida de los niveles de expresión relativa de ARNm de Ar en el TAI (B) y el TARP (D) y de marcadores relacionados con la termogénesis del TA (Ucp1, Pgc1a, Prdm16 y Dio2) en el TAI (C) y en el TARP (E). Los valores se muestran como la media  $\pm$  EEM. n= 3-4 animales por grupo analizado por duplicado. Para el análisis estadístico se empleó la prueba t de Student bilateral. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$  vs CTR.

En conjunto, los datos presentados en esta sección demuestran que la castración prepuberal en ratas modificó el consumo de alimento y del peso corporal y algunos parámetros en sangre. Asimismo, dicha intervención modifica los niveles de expresión tanto de adipocinas como de genes relacionados con la termogénesis. En concordancia con esto, se pudo observar que los pre adipocitos aislados del TAI y del TARP diferenciados *in vitro* tuvieron un perfil de expresión

*Resultados*

génica de marcadores termogénicos incrementado. Esto podría indicar que el descenso de los niveles de andrógenos en la etapa prepuberal reprograma de alguna manera la capacidad termogénica de los adipocitos, favoreciendo el *browning* del TA y la diferenciación hacia el linaje beige. Para probar esta posibilidad, se siguió con el estudio de lo que ocurre sobre la capacidad termogénica en dicho modelo ante un inductor fisiológico del *browning*, el frío.

## 4.2. Análisis de la respuesta al browning inducido por el frío

### 4.2.1. Evaluación de los cambios metabólicos producidos durante la exposición al frío

Para regular la temperatura corporal, los animales homeotermos expuestos a bajas temperaturas, contrarrestan dicho efecto a través de la producción de calor. Uno de los mecanismos consiste en el surgimiento de adipocitos beige en los depósitos de TAB. En la presente sección, se muestran los resultados obtenidos de los efectos de la ausencia de andrógenos sobre el *browning* en condiciones estimuladas. Para ello un subgrupo de los animales CTR y ODX de 60 días de edad, se mantuvo durante 7 días a temperatura ambiente y otro subgrupo en frío, es decir, en condiciones que estimulan la aparición de adipocitos beige (Fig. 17A).

Nuevamente, en primer lugar se analizó el consumo de alimento (Fig.17B) y el peso corporal (Fig. 17C) en ambas condiciones. Como puede observarse el análisis estadístico reveló una interacción entre las variables frío y castración indicando que los animales castrados responden de diferente manera de acuerdo a la temperatura externa a la cual se alojen. En cuanto al consumo calórico acumulado, en el post test de comparaciones múltiples se halló, como era de esperarse, que los animales expuestos al frío consumen mayor cantidad de alimento en ambos grupos comparados con sus contrapartes en condiciones basales (Fig. 17B). Además, a pesar de que las diferencias encontradas entre grupos a temperatura ambiente se mantuvieron durante estos 7 días, estas diferencias no se observaron en los grupos expuestos a frío. Es decir, los grupos CTR-F y ODX-F tienen los mismos valores de consumo calórico acumulado.

Por otro lado, los grupos de animales expuestos al frío presentaron una menor ganancia de peso corporal con respecto a los grupos mantenidos a temperatura ambiente (Fig. 17C). Asimismo, no se encontraron diferencias en la ganancia de peso corporal entre los grupos CTR-A y ODX-A pero sí una tendencia al descenso de peso entre ODX-F vs CTR-F ( $p = 0.07$ , Fig. 17C).

A continuación, se analizaron los niveles plasmáticos de glucosa y triglicéridos. La glucemia no se vió afectada por ninguna de las variables analizadas, pero se halló una interacción entre las variables en la medida de la trigliceridemia (Tabla 4). El post test reveló que las ratas ODX-A presentaron valores menores de TG que las

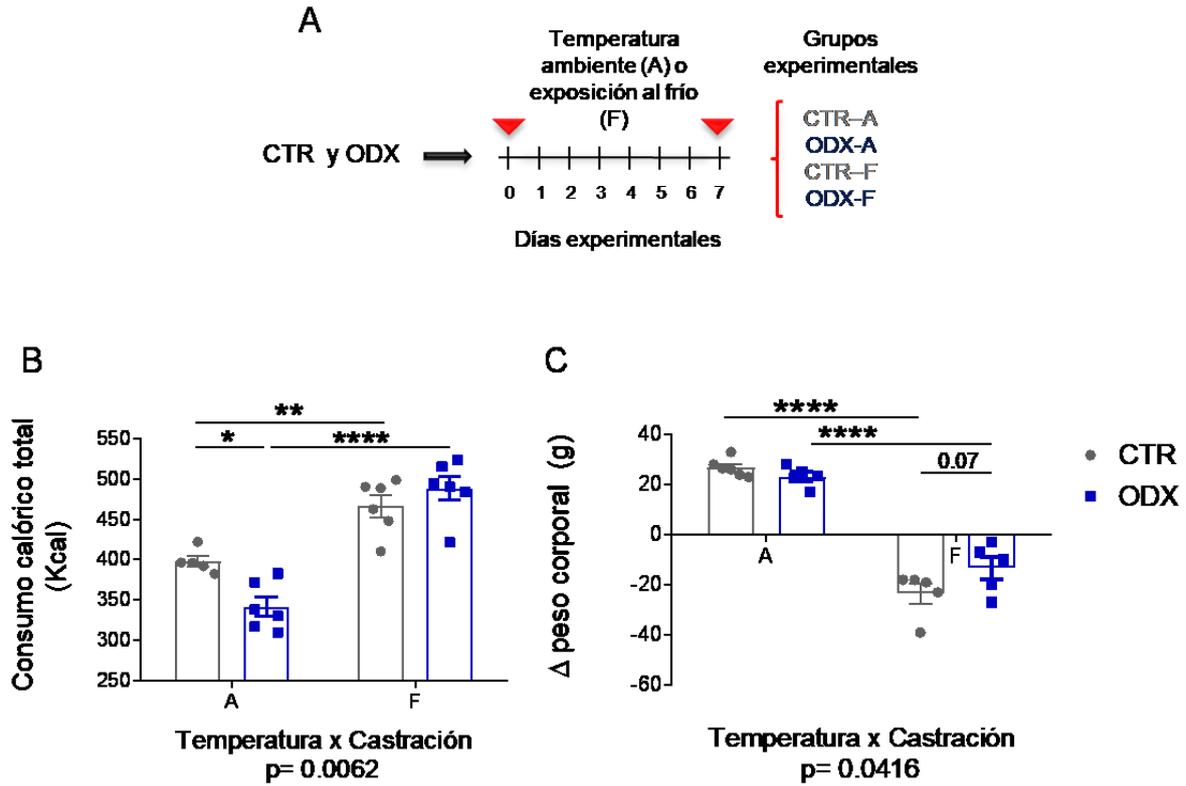
*Resultados*

ratas CTR-A, pero no se observaron diferencias entre CTR-F vs ODX-F. Además, los animales CTR-F tuvieron un descenso significativo en los valores de TG comparado con los del grupo CTR-A.

Durante la inducción de la termogénesis, el hígado es capaz de suplir sus reservas energéticas (lípidos y glucosa) para su utilización por parte de los TA termogénicos y de los músculos. Por este motivo evaluamos los niveles de triglicéridos hepáticos y se encontró una disminución debido a la castración a ambas temperaturas (Tabla 4).

A continuación, se corroboró el efecto conocido del frío sobre el peso porcentual del TAP interescapular que resultó, como era de esperarse, incrementado en los grupos estimulados con el frío (Fig. 18A). En cuanto a los depósitos de TAB, el peso porcentual del TAI decreció cuando los animales se expusieron al frío (Fig. 18B), mientras que el peso porcentual del TARP decreció por la castración (Fig. 18C). Luego se prosiguió con el análisis histológico y se encontró que en el TAI se redujo el tamaño de los adipocitos por la exposición al frío (Fig. 19A) mientras que, en el TARP, por la castración (Fig. 19B), de manera similar a los resultados encontrados en los pesos porcentuales. Además, se observó la presencia de focos de adipocitos multivacuolares en el TARP de los animales ODX-F, lo cual es un indicio de una posible activación termogénica.

Resultados

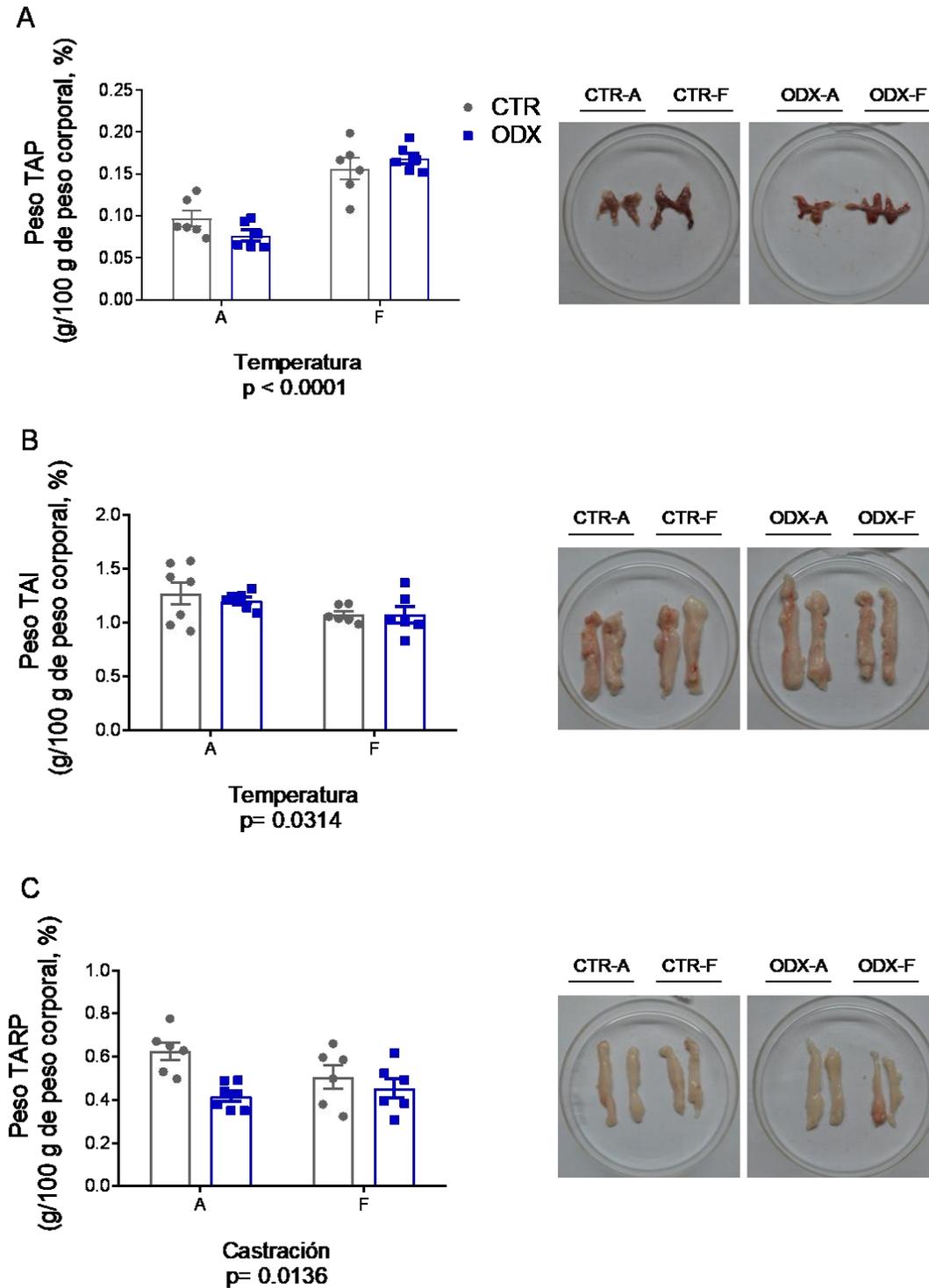


**Figura 17. El grupo ODX no presenta cambios en el consumo de alimento ni en el peso corporal durante la exposición al frío.** Esquema experimental utilizado para evaluar la respuesta del TAB ante el *browning* inducido por la exposición a bajas temperaturas (A). Determinación de la ingesta calórica acumulada durante los 7 días experimentales (B) y cálculo del incremento de peso corporal (C). Los valores se muestran como la media  $\pm$  EEM. n= 3-7 animales por grupo. Para el análisis estadístico se empleó la prueba ANOVA de dos vías para analizar los factores de manera individual (temperatura y castración) y su interacción (temperatura x castración) seguido por la prueba de Sidak. \*p<0.05, \*\*p<0.01, y \*\*\*\*p<0.0001

	CTR-A	ODX-A	CTR-F	ODX-F	ANOVA 2 vías
Glucosa plasmática (g/l)	1.37 $\pm$ 0.04	1.34 $\pm$ 0.05	1.37 $\pm$ 0.05	1.55 $\pm$ 0.12	ns
Triglicéridos plasmáticos (g/l)	1.24 $\pm$ 0.12	0.74 $\pm$ 0.04****	0.35 $\pm$ 0.06****	0.46 $\pm$ 0.07	T x C= 0.0116
Triglicéridos hepáticos (mg/g)	4.50 $\pm$ 0.47	3.20 $\pm$ 0.41	4.13 $\pm$ 0.13	3.98 $\pm$ 0.23	C= 0.0436

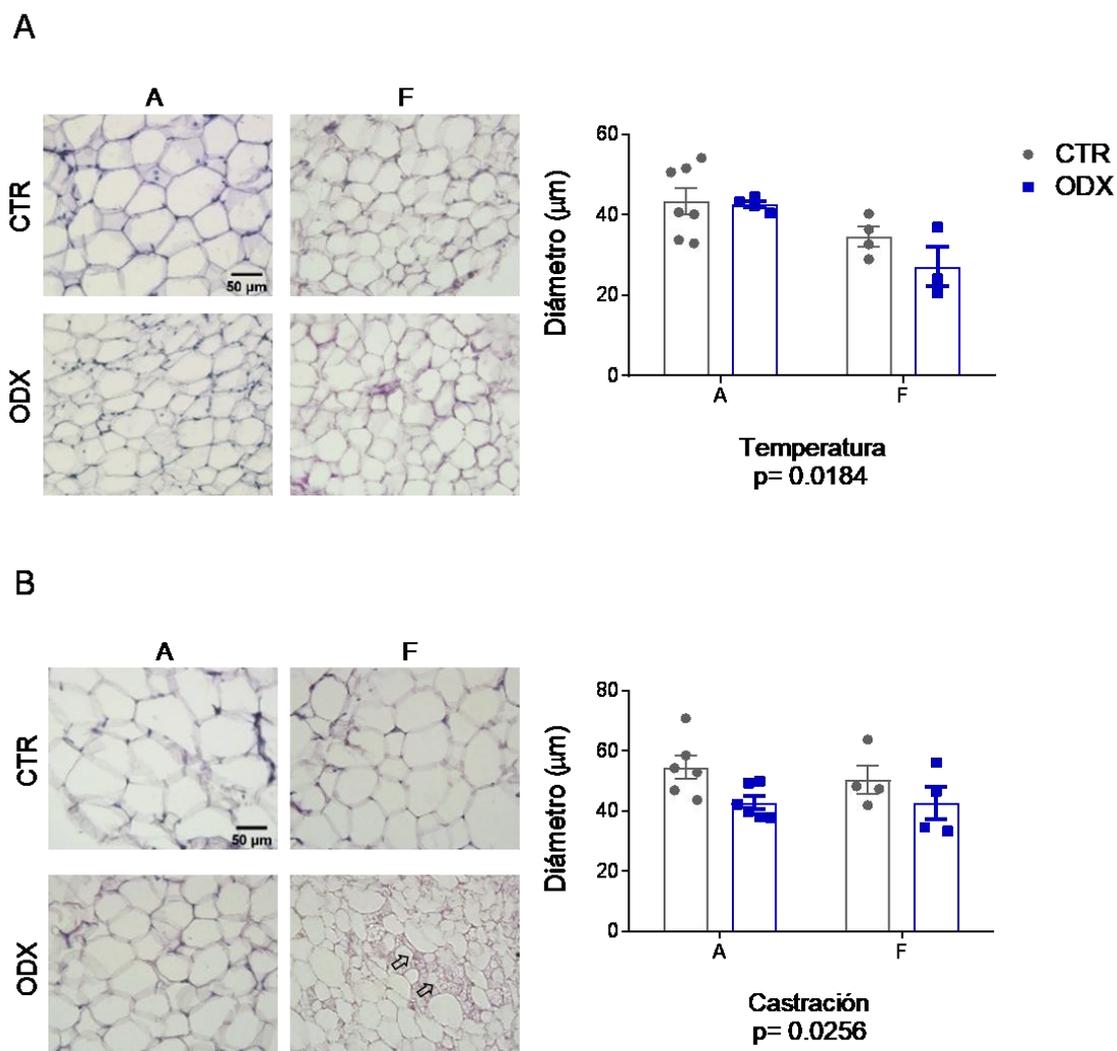
Resultados

**Tabla 4. Medida de metabolitos plasmáticos en cada grupo experimental.** Los valores se muestran como la media  $\pm$  EEM. n=3-6 animales por grupo. Las determinaciones fueron medidas por duplicado. Para el análisis estadístico se empleó la prueba ANOVA de dos vías para analizar los factores de manera individual (temperatura y castración) y su interacción (temperatura x castración) seguido por la prueba de Sidak. \*p<0.05 y \*\*\*\*p<0.0001 vs CTR-A y <sup>+</sup>p<0.05 vs ODX-A.



Resultados

**Figura 18. El peso del TARP se ve afectado por la castración a ambas temperaturas.** Imágenes en fresco del TAP (A), el TAI (B) y el TARP (C) junto con los valores de los pesos porcentuales respectivos. Los valores se muestran como la media  $\pm$  EEM. n=6-7 animales por grupo. Para el análisis estadístico se empleó la prueba ANOVA de dos vías para analizar los factores de manera individual (temperatura y castración) y su interacción (temperatura x castración).



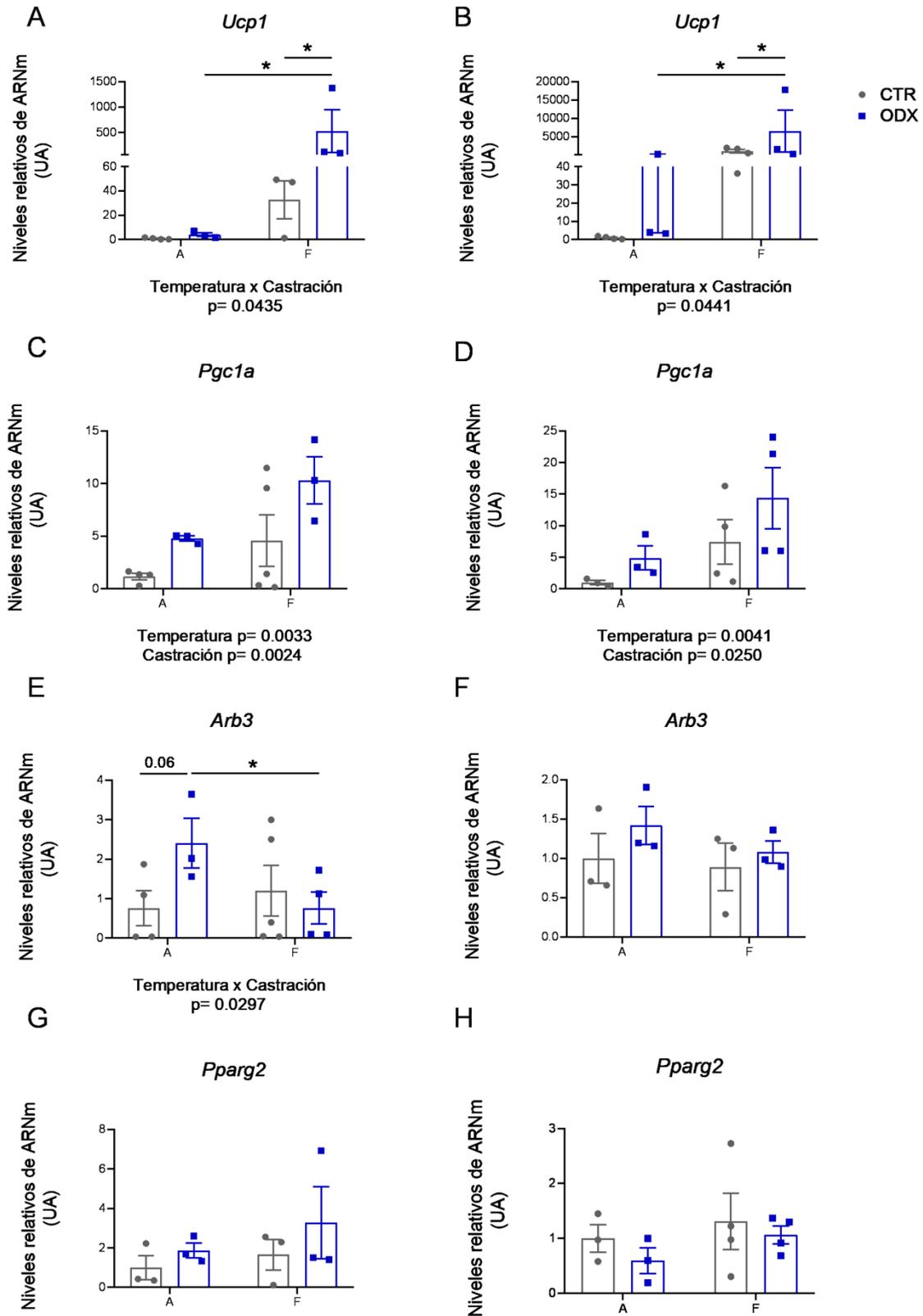
**Figura 19. Los adipocitos del TARP de los animales ODX presentan menor tamaño.** Microfotografías de secciones representativas de TA teñidas con H-E (magnificación de 400x) junto con el análisis del tamaño de los adipocitos del TAI (A) y del TARP (B). Los valores se muestran como la media  $\pm$  EEM. n=3-7 animales por grupo. Para el análisis estadístico se empleó la prueba ANOVA de dos vías para analizar los factores de manera individual (temperatura y castración) y su interacción (temperatura x castración).

#### 4.2.2. Efecto de la depleción de andrógenos sobre los niveles de transcripto de genes termogénicos durante la inducción del *browning* por frío

De los depósitos de TAB aislados, se analizaron los niveles de expresión de Ucp1, Pgc1a, Adrb3 y Pparg2 (Fig. 20). En el anexo (Fig. 34) se compararon los niveles de expresión de estos marcadores entre depósitos de animales CTR.

Aquí, el resultado del ANOVA arrojó una interacción entre las variables temperatura y castración en los niveles de expresión de Ucp1 tanto en el TAI (Fig. 20A) como en el TARP (Fig. 20B). El post test reveló que el grupo ODX expresa mayores niveles de Ucp1 cuando este grupo se mantuvo expuesto al frío. Además, se encontró que en ambos depósitos la expresión de Pgc1a se incrementó tanto por la castración como por la exposición al frío (Fig. 20C y D). Por otro lado, analizamos los niveles de ARNm de Adrb3 ya que este receptor está involucrado en la activación de la termogénesis del TAB de roedores. El análisis estadístico indicó una interacción entre ambas variables en la expresión de Adrb3 en el TAI (Fig. 20C). Además, el post test reveló que los niveles de Adrb3 del grupo ODX-RT tienden a un incremento versus CTR-RT ( $p = 0.06$ ), pero los niveles de Adrb3 de los animales ODX-C decrecieron con la exposición al frío (Fig. 20C). Por otro lado, no se hallaron diferencias significativas en los niveles de Adrb3 provenientes del TARP (Fig. 20D). Por último, se encontró que los niveles de Pparg2, cuya inducción promueve el *browning*, tienden a incrementarse ( $p=0.0826$ ) con la castración en el TAI (Fig. 20G) permaneciendo sin cambios en el TARP (Fig. 20H).

Resultados



**Figura 20.** Los animales ODX expresan niveles mayores de ARNm de genes involucrados en la termogénesis dependiente de *Ucp1*. Medida de los niveles relativos de expresión de ARNm de *Ucp1*, *Pgc1a*, *Arb3* y *Pparg2* en TAI (A, C, E y G, respectivamente) y en TARP (B, D, F y H,

respectivamente). Los valores se muestran como la media  $\pm$  EEM. n=3-5 animales por grupo Para el análisis estadístico se empleó la prueba ANOVA de dos vías para analizar los factores de manera individual (temperatura y castración) y su interacción (temperatura x castración) seguido por la prueba de Sidak. \*p<0.05.

#### 4.2.3. El grupo ODX muestra cambios en los niveles de proteínas involucradas en la termogénesis

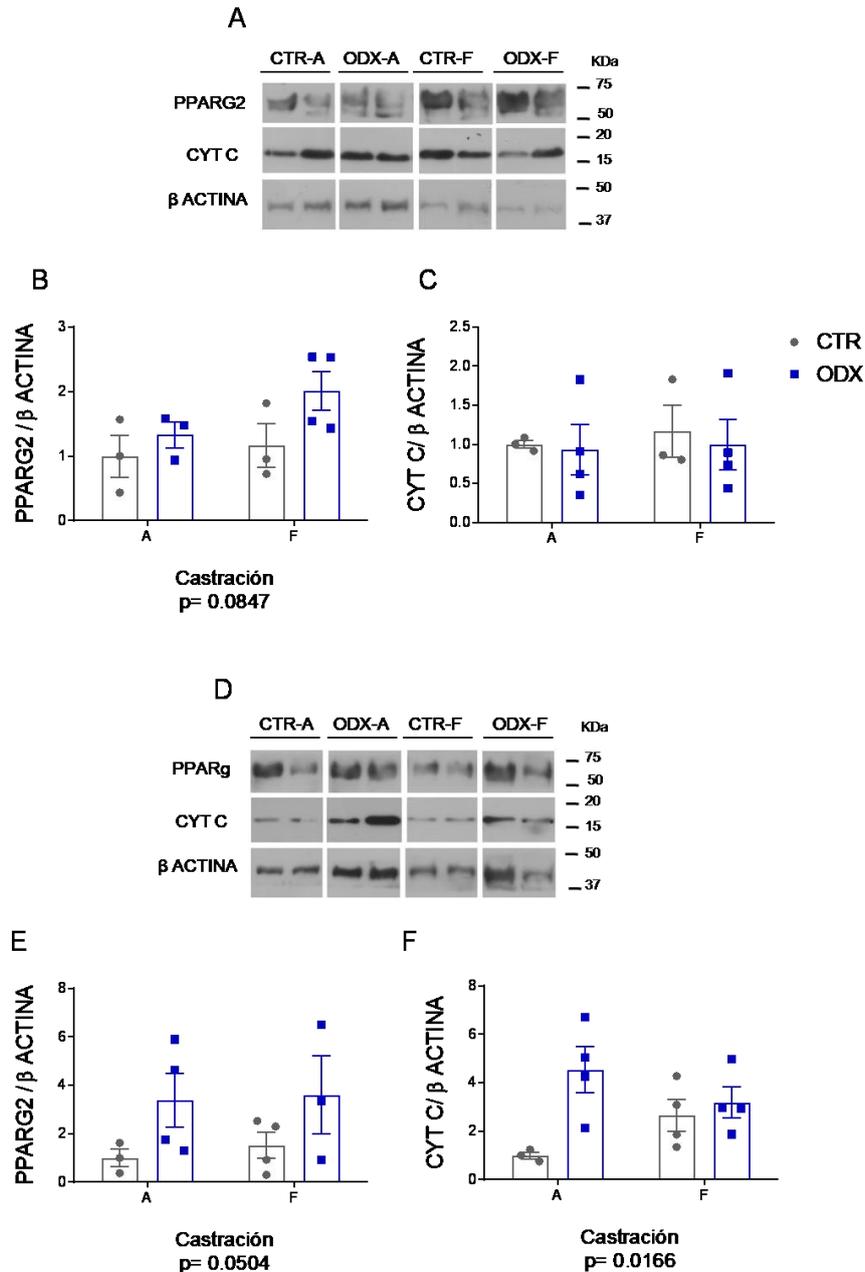
Finalmente, se evaluaron los niveles proteicos de CYT C (como medida de una proteína mitocondrial), de PPAR $\gamma$  (debido a que su inducción promueve el *browning*) y de UCP1 mediante Western blot. En primer lugar, los niveles de CYT C permanecieron sin cambios en el TAI (Fig. 21C), pero sus niveles relativos se incrementaron debido a la castración en el TARP (Fig. 21F). Por otro lado, PPAR $\gamma$  mostró una tendencia al incremento, similar a la encontrada a nivel de ARNm, en el TAI (Fig. 21B). En el TARP se halló una fuerte tendencia al incremento de esta proteína debido a la castración (Fig. 21E).

De manera similar a lo que ocurre con lo observado en el ARNm, la castración y el frío incrementaron los niveles proteicos de UCP1 en el TAI (Fig. 22B). En el TARP se registró una interacción entre las variables analizadas y el post test indicó que las ratas ODX expuestas al frío presentaron niveles elevados de UCP1 versus el grupo CTR-C (Fig. 22D).

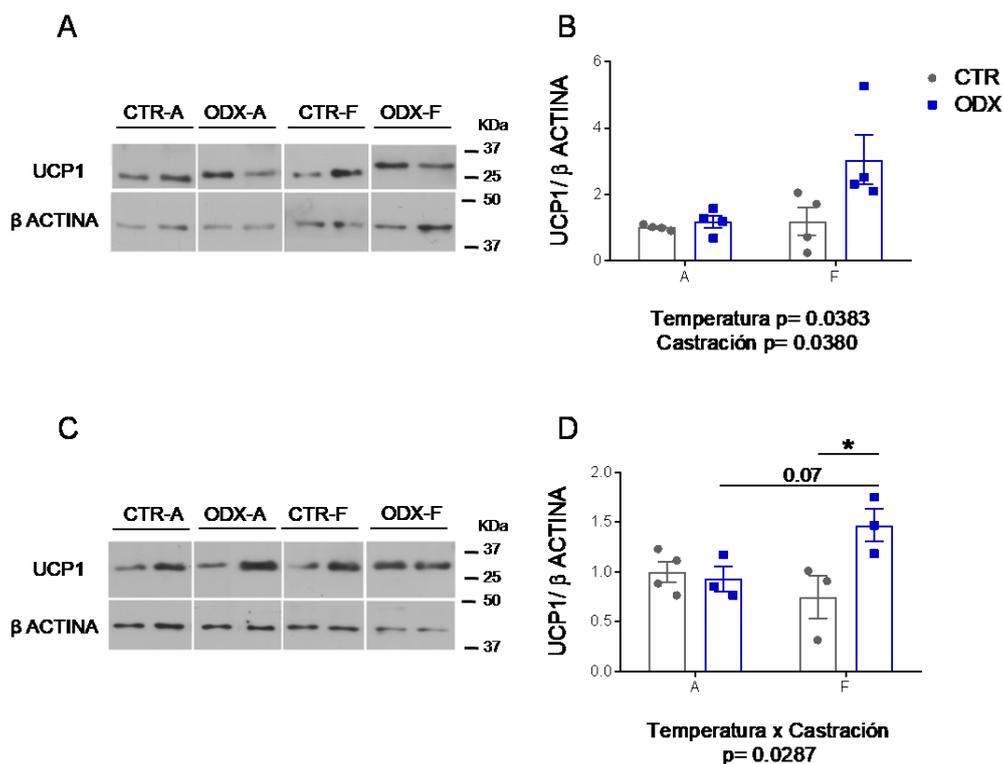
En resumen, estos resultados indicarían que la depleción prepuberal de andrógenos favorece el programa termogénico involucrado en la termogénesis *non-shivering* de los depósitos de TAB.

De esta manera, estos resultados indican que la capacidad de realizar *browning* de los animales ODX expuestos al frío se vió incrementada y, por lo tanto, la depleción temprana de andrógenos favorecería en la edad adulta la formación de adipocitos beige ante un inductor.

Resultados



**Figura 21. La depleción de andrógenos incrementa los niveles proteicos de PPARG2 y CYT C en el TARP.** Imágenes representativas de las auto radiografías obtenidas mediante la técnica de Western blot para cada el TAI (A) y para el TARP (D) junto con la cuantificación correspondiente de los niveles proteicos de PPARG2 y CYT C en el TAI (**B y C, respectivamente**) y el TARP (**E y F, respectivamente**) de animales expuestos a temperatura ambiente (CTR-A y ODX-A) o al frío (CTR-F y ODX-F).). Como control de carga se utilizó β ACTINA. Los valores se muestran como la media ± EEM. n=3-4 animales por grupo. Para el análisis estadístico se empleó la prueba ANOVA de dos vías para analizar los factores de manera individual (temperatura y castración) y su interacción (temperatura x castración).



**Figura 22. La depleción de andrógenos incrementa los niveles proteicos de UCP1.** Imágenes representativas de las auto radiografías obtenidas mediante la técnica de Western blot para el TAI (A) y para el TARP (C) junto con la cuantificación correspondiente de los niveles proteicos de UCP1 en el TAI (B) y el TARP (D) de animales expuestos a temperatura ambiente (CTR-A y ODX-A) o al frío (CTR-F y ODX-F). Como control de carga se utilizó  $\beta$  ACTINA. Los valores se muestran como la media  $\pm$  EEM. n=3-4 animales por grupo. Para el análisis estadístico se empleó la prueba ANOVA de dos vías para analizar los factores de manera individual (temperatura y castración) y su interacción (temperatura x castración) seguido por la prueba de Sidak. \*p<0.05.

#### 4.2.4. El grupo ODX muestra cambios en los niveles de ARNm de proteínas involucradas en la autofagia

Como se menciona en la introducción, estudios recientes han comprobado que durante la inducción del *browning* se acompaña por una inhibición de la mitofagia. Por lo tanto, nos preguntamos si en este modelo de depleción de andrógenos prepuberal, que presentó un incremento en la capacidad termogénica, se producían cambios en la expresión de genes involucrados en este tipo de autofagia. En el

*Resultados*

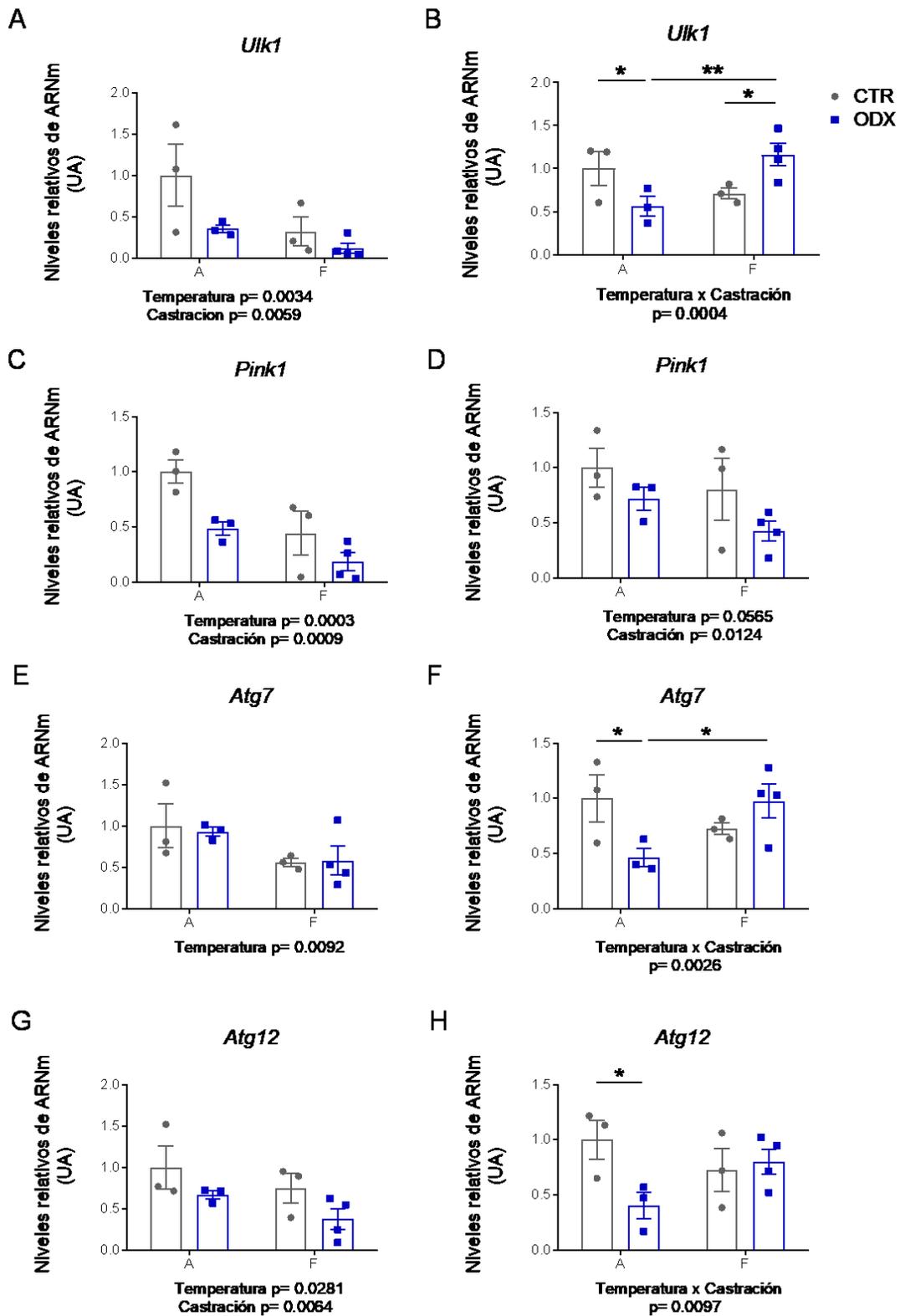
anexo (Fig. 36) se muestra la comparación de la expresión de estos marcadores entre los depósitos de animales CTR.

En la figura 23 se pueden observar los resultados encontrados para ambos depósitos de TAB estudiados. En este caso, se encontró que en el depósito inguinal los niveles de Ulk1 (Fig. 23A), Pink1 (Fig. 23C) y Atg12 (Fig. 23G) se vieron reducidos tanto por la exposición a frío como por la castración. Por otra parte, los niveles de mRNA de Atg7 sólo se vieron afectados por la exposición al frío, observándose una disminución en los mismos en ambos grupos (Fig. 23E).

Para el depósito visceral, pudimos hallar una interacción entre las variables temperatura y castración sobre los valores de Ulk1 (Fig. 23B), Atg7 (Fig. 23F) y Atg12 (Fig. 23H), indicando un comportamiento diferencial en la expresión de estos marcadores. El post test reveló que, mientras a temperatura ambiente el grupo ODX presentó valores reducidos del ARNm de estos marcadores, en condiciones estimuladas se encontró el efecto opuesto. Por otro lado, la expresión génica de Pink1 (Fig. 23D) sólo se redujo por efecto de la castración, aunque el efecto de la variable frío mostró una fuerte tendencia de disminución ( $p= 0.0565$ ).

En términos generales, estos resultados indicarían que la expresión de genes involucrados en la mitofagia en el TAB son sensibles tanto a los cambios de temperatura y a la concentración de andrógenos *in vivo* posiblemente debido a un incremento del proceso termogénico.

Resultados



**Figura 23. La depleción de andrógenos modifica la expresión de genes involucrados en la autofagia.** Medida de los niveles relativos de expresión de ARNm de Ulk1, Pink1, Atg7 y Atg12 en TAI (A, C, E y G, respectivamente) y en TARP (B, D, F y H, respectivamente). Los valores se muestran como la media  $\pm$  EEM.  $n=3-4$  animales por grupo. Para el análisis estadístico se empleó la

*Resultados*

prueba ANOVA de dos vías para analizar los factores de manera individual (temperatura y castración) y su interacción (temperatura x castración) seguido por la prueba de Sidak. \* $p < 0.05$  y \*\* $p < 0.01$ .

### 4.3. Estudio *in vitro* de los efectos de los andrógenos sobre los adipocitos beige

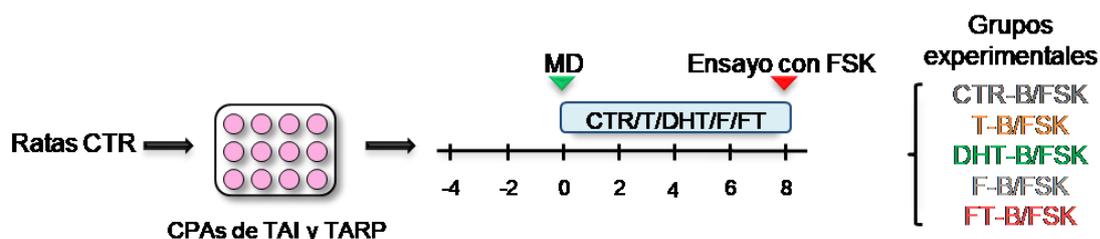
Hasta el momento se han evaluado los efectos de los andrógenos *in vivo*. En líneas generales, se describió que la depleción de estas hormonas en estadios prepuberales promueve el *browning* en condiciones basales y resulta incrementado durante la inducción por bajas temperaturas. En los estudios *in vivo* de la primera sección las células precursoras de adipocitos se encontraban en un ambiente carente de andrógenos. En esta sección el objetivo consistió en evaluar el rol de la testosterona y de la dihidrotestosterona *in vitro* sobre un cultivo primario de CPAs provenientes del TAI y del TARP de animales controles de 60 días de edad. En primer lugar, los andrógenos fueron agregados en el momento en que dichas células llegaron al estadio de confluencia (día 0) hasta el final del experimento (día 8). En este día se les agregó forskolina durante 4 hs para incrementar los niveles de AMPc intracelular y con ello estimular la termogénesis. En el anexo (Fig. 35) se demuestra la comparación los cultivos de animales CTR. Asimismo, se realizaron experimentos con flutamida, un antagonista del receptor de andrógenos, con el fin de comprobar si el efecto de la testosterona era dependiente dicho receptor, ya que la testosterona puede aromatizarse a estrógenos por la actividad enzimática de aromatasas adipocitarias.

Luego, se analizó el rol de la testosterona en diferentes etapas de la adipogénesis. Por un lado, se evaluó el efecto de este andrógeno durante las últimas 48 h (del sexto al octavo día experimental) para estudiar si la misma modula la expresión de marcadores termogénicos en adipocitos beige maduros. Finalmente, se estudió el efecto de la testosterona sobre las CPAs sin diferenciar, para evaluar si dicha hormona modifica marcadores de precursores del linaje adipocitario beige.

#### 4.3.1. La testosterona modifica el número de mitocondrias en los adipocitos cultivados *in vitro*

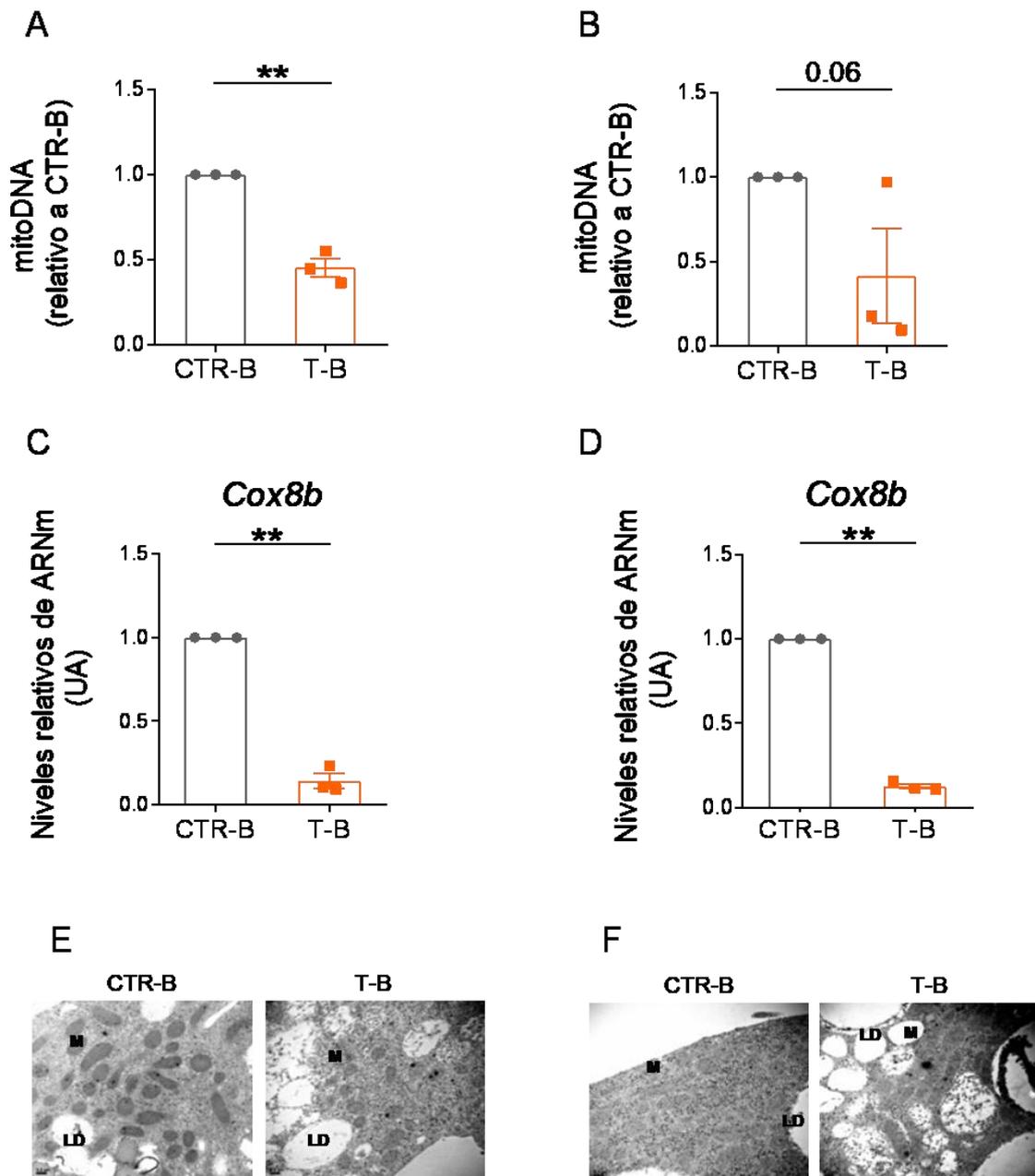
En primer lugar, se analizaron los efectos del andrógeno que se encuentra en mayor concentración en la sangre periférica de animales macho: la testosterona. En la figura 24 se puede ver el esquema experimental usado para tal fin.

Como bien se menciona en la introducción, las mitocondrias desempeñan un papel fundamental en la termogénesis. Por este motivo, en primer lugar se midió el contenido mitocondrial mediante RT-qPCR. Se demostró que la cantidad relativa de genomas mitocondriales descendió significativamente en las células del TAI tratadas con testosterona (Fig. 25A) mientras que en el TARP se encontró una fuerte tendencia al descenso ( $p= 0.06$ ) (Fig. 25B). Adicionalmente, se determinó la expresión de Cox8b, un gen nuclear que expresa para una subunidad del complejo de citocromo c oxidasa mitocondrial. En este caso, se encontró que la testosterona decrece los niveles de Cox8b en adipocitos diferenciados provenientes de ambos depósitos (Fig. 25C y D). Por último, en las microfotografías obtenidas por MET se puede apreciar un menor contenido mitocondrial en células tratadas con testosterona (Fig. 25E y F). Por lo tanto, se podría afirmar que la testosterona es capaz de modular el número de mitocondrias en ambos depósitos de TAB.



**Figura 24. Diseño experimental utilizado en esta sección para los ensayos con testosterona, dihidrotestosterona y flutamida.** Se aislaron y cultivaron las CPAs obtenidas del TAI y del TARP de animales CTR. Luego de llegar a confluencia (d0), las células fueron inducidas hacia el linaje adipocitario beige con el agregado de la mezcla de diferenciación correspondiente (MD). Desde este momento hasta el final de experimento (d8) las células fueron mantenidas sin el agregado de ningún andrógeno o antagonista (CTR) o incubadas con testosterona (T), dihidrotestosterona (DHT), flutamida (F) o flutamida junto con testosterona (FT). Al final del experimento, se incubaron en condiciones basales (CTR-B, T-B, DHT-B, F-B y FT-B, respectivamente) o con el agregado de forskolina durante 4 hs (CTR-FSK, T-FSK, DHT-FSK, F-FSK y FT-FSK, respectivamente).

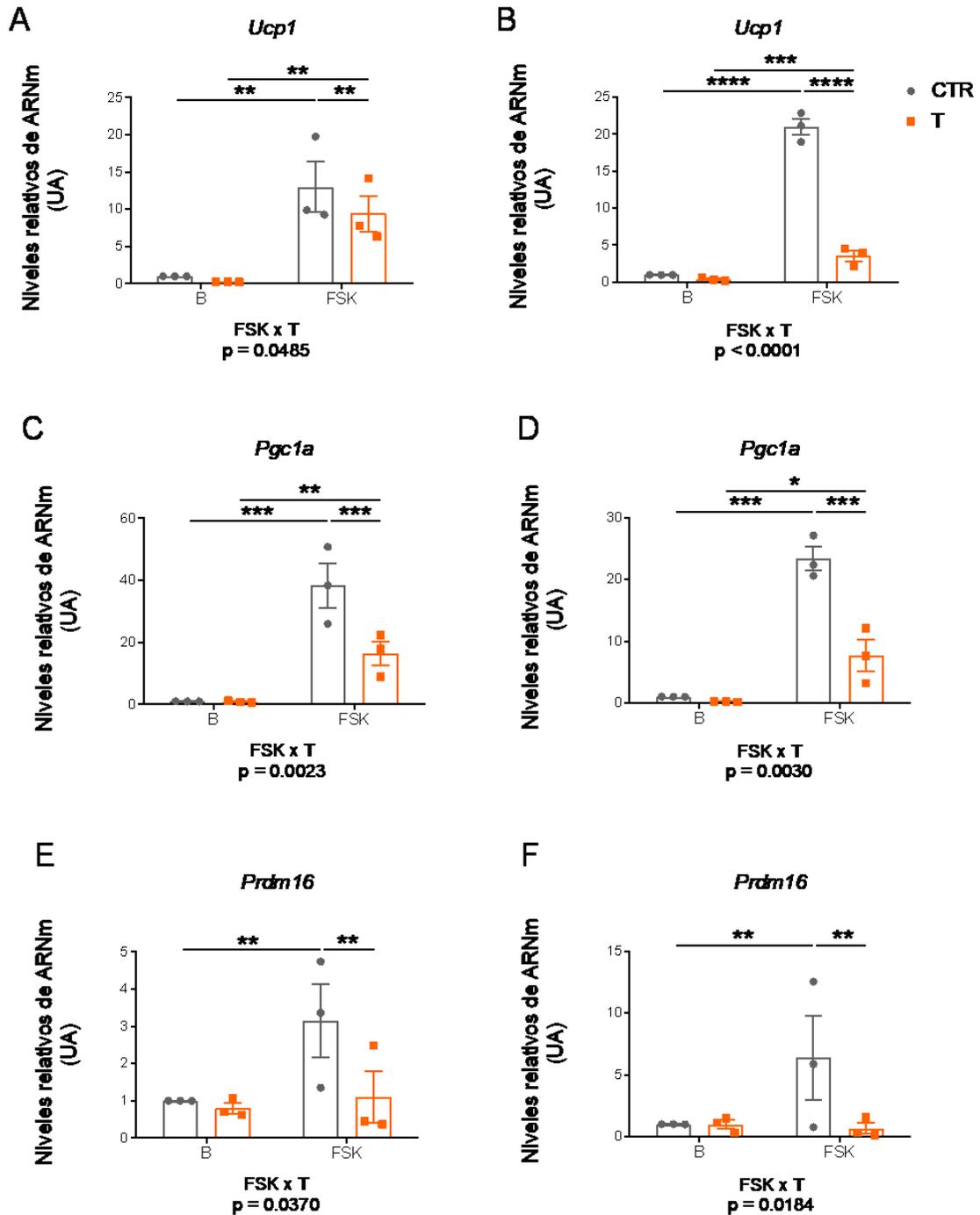
## Resultados



**Figura 25. Efecto de la testosterona sobre el contenido mitocondrial de adipocitos cultivados *in vitro*.** Medida del contenido mitocondrial relativo del cultivo de células provenientes del TAI (A) y del TARP (B). Medida de la expresión relativa de ARNm de *Cox8b* del cultivo de células provenientes TAI (C) y del TARP (D). Imágenes representativas obtenidas por MET (x 50.000) de cultivos controles (CTR-B) y tratados con testosterona (T-B) de CPAs obtenidas del TAI (E) y del TARP (F). La letra M indica mitocondrias y LD vacuolas lipídicas. Los valores se muestran como la media  $\pm$  EEM. n= 3 experimentos independientes analizado por duplicado. Para el análisis estadístico se empleó la prueba no paramétrica de Mann-Whitney bilateral. \*\*p<0.01 vs CTR.

#### *4.3.2. Los andrógenos inhiben la expresión de genes involucrados en la termogénesis en adipocitos cultivados in vitro*

A continuación, se midieron los niveles de expresión genes involucrados en la función termogénica: Ucp1, Pgc1a y Prdm16 en condiciones basales y estimuladas con FSK durante 4 horas (Fig. 26). La expresión de Ucp1 en los adipocitos diferenciados de ambos depósitos fue afectada por la interacción entre las variables tratamiento y estímulo (Fig. 26A y B). El post test reveló que, como era de esperarse, el agregado de FSK aumentó la expresión de Ucp1 (CTR-FSK vs CTR-B y T-FSK vs T-B) en ambos tipos de depósitos (Fig. 26A y B). Además, se halló que el grupo T-FSK presentó niveles de expresión disminuidos en este gen comparado con el grupo CTR-FSK. Si bien puede observarse en el gráfico un descenso también en condiciones basales (CTR-B vs T-B), esto no resultó estadísticamente significativo. Este resultado se repitieron cuando se evaluaron los niveles de Pgc1a (Fig. 26c y D) y de Prdm16 en los cultivos de TAI y de TARP (Fig. 26E y F) con la salvedad que para este último marcador la FSK no fue capaz de incrementar dichos valores en los adipocitos tratados con testosterona (T-FSK vs T-B).

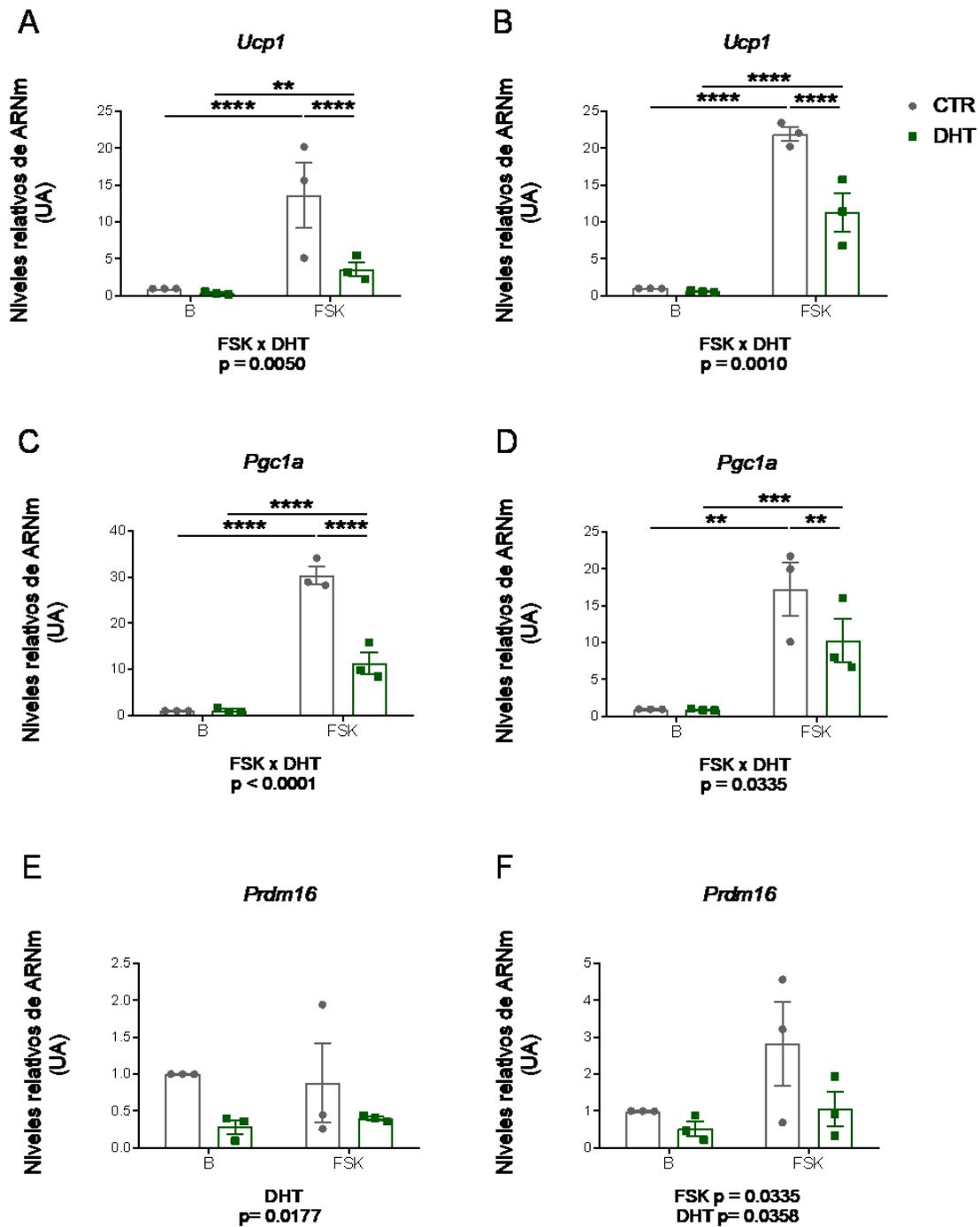


**Figura 26. La testosterona reduce la expresión de marcadores termogénicos en adipocitos cultivados in vitro.** Medida mediante RT-qPCR de los niveles de expresión relativa de *Ucp1*, *Pgc1a* y *Prdm16* en adipocitos diferenciados *in vitro* provenientes de CPAs del TAI (A, C y E respectivamente) y del TARP (B, D y F, respectivamente) en condiciones basales (B) y estimuladas (FSK) con forskolina como se indica en el esquema experimental de la figura 11. Los valores se muestran como la media  $\pm$  EEM. n=3 experimentos independientes por grupo analizados por duplicado. Para el análisis estadístico se empleó la prueba ANOVA de dos vías para analizar los factores de manera individual (forskolina y testosterona) y su interacción (forskolina x testosterona) seguido por la prueba de Sidak. \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001 y \*\*\*\*p<0.0001.

Luego se evaluó la acción de la dihidrotestosterona, un andrógeno no aromatizable y agonista del receptor de andrógenos, sobre la expresión de los mismos marcadores estudiados anteriormente (Fig. 27). En este caso tanto en la expresión de Ucp1 (Fig. 27A y B) como en la Pgc1a (Fig. 26C y D) de los adipocitos derivados de ambos depósitos de TAB hubo una interacción entre las variables. El post test demostró el efecto estimulante de la FSK sobre la expresión de estos genes comparados con sus contrapartes en condiciones basales (CTR-FSK vs CTR-B y T-FSK vs T-B), pero además se observó que la dihidrotestosterona inhibió dichos valores cuando se las estimuló con la FSK (CTR-FSK vs D-FSK). Por otro lado, en el TAI la expresión de Prdm16 disminuyó en las células tratadas con DHT en ambas condiciones (Fig. 26E) mientras que para el TARP se encontró que la FSK estimuló la expresión de este gen, pero el andrógeno la inhibió (Fig. 26F).

Por todo lo anterior, podríamos decir que el agregado de andrógenos *in vitro* es capaz de reducir los valores de ARNm de proteínas que intervienen en la función termogénica de adipocitos cultivados *in vitro*, encontrándose efectos similares en ambos tipos de depósitos.

Resultados



**Figura 27. La dihidrotestosterona reduce la expresión de marcadores termogénicos en adipocitos cultivados *in vitro*.** Medida mediante RT-qPCR de los niveles de expresión relativa de *Ucp1*, *Pgc1a* y *Prdm16* en adipocitos diferenciados *in vitro* provenientes de CPAs del TAI (A, C y E respectivamente) y del TARP (B, D y F, respectivamente) en condiciones basales (B) y estimuladas (FSK) con forskolina como se indica en el esquema experimental de la figura 11. Los valores se muestran como la media  $\pm$  EEM. n=3 experimentos independientes por grupo analizados por duplicado. Para el análisis estadístico se empleó la prueba ANOVA de dos vías para analizar los

factores de manera individual (forskolina y dihidrotestosterona) y su interacción (forskolina x dihidrotestosterona) seguido por la prueba de Sidak. \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  y \*\*\*\* $p < 0.0001$ .

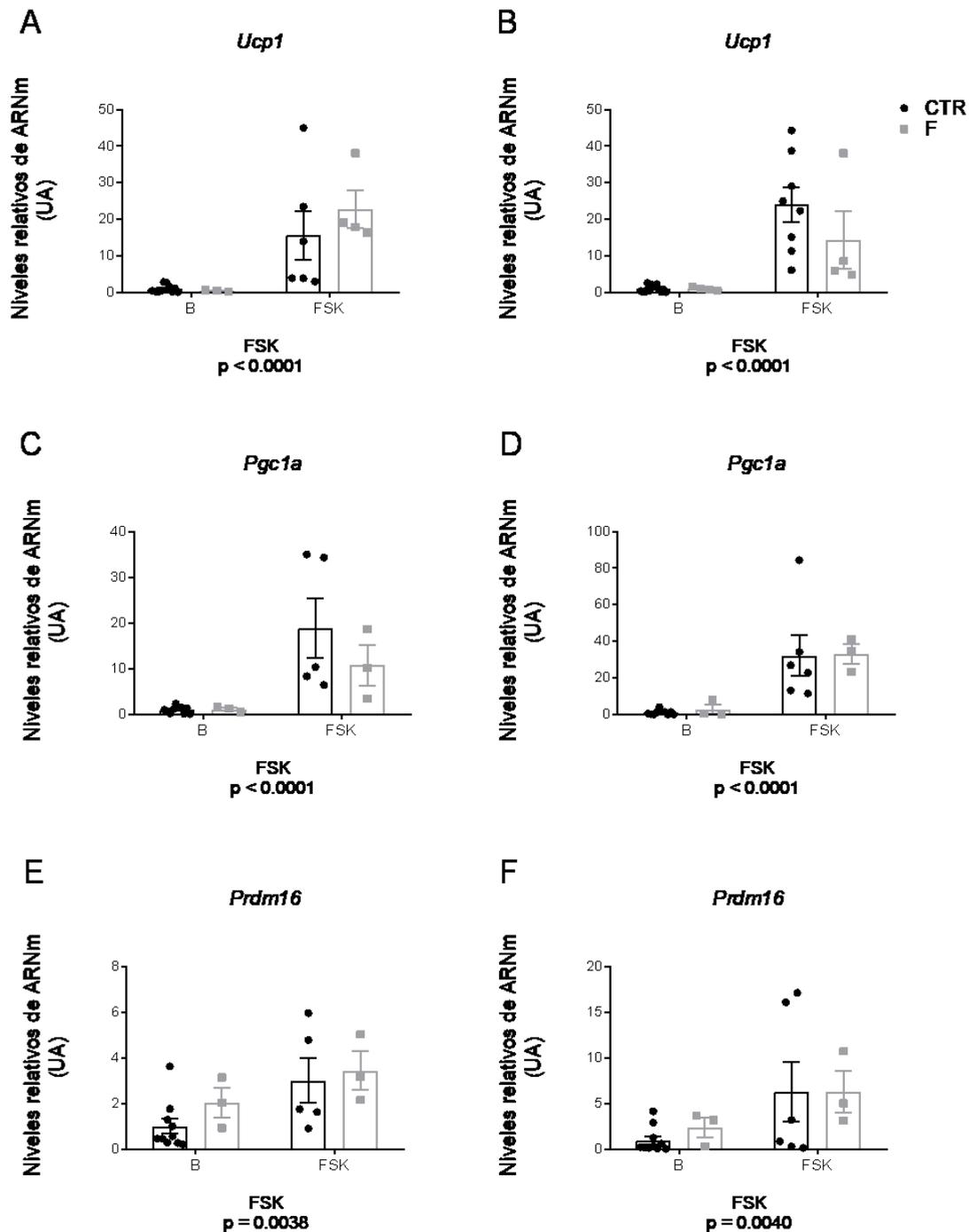
#### *4.3.3. La inhibición ocasionada por la testosterona sobre los marcadores termogénicos esta mediada por el receptor de andrógenos*

Finalmente, para comprobar si los efectos de la testosterona eran mediados por el Ar se prosiguió con los ensayos *in vitro* utilizando un antagonista del dicho receptor. Inicialmente, se verificó si la flutamida modificaba los niveles de expresión de los marcadores de interés (Fig. 28). Para ello, los cultivos primarios de adipocitos aislados del TAI y del TARP de animales controles se cultivaron en ausencia y en presencia flutamida durante los 8 días de diferenciación/maduración de las células, tanto en condiciones basales como estimuladas. Como puede observarse en los gráficos, solo la variable estímulo con FSK tuvo un efecto sobre los niveles relativos de Ucp1 (Fig. 28A y B), Pgc1a (Fig. 28C y D) y Prdm16 (Fig. 28E y F) de ambos depósitos de TAB. Es decir, que la presencia del antagonista no modificó los valores de expresión de dichos genes

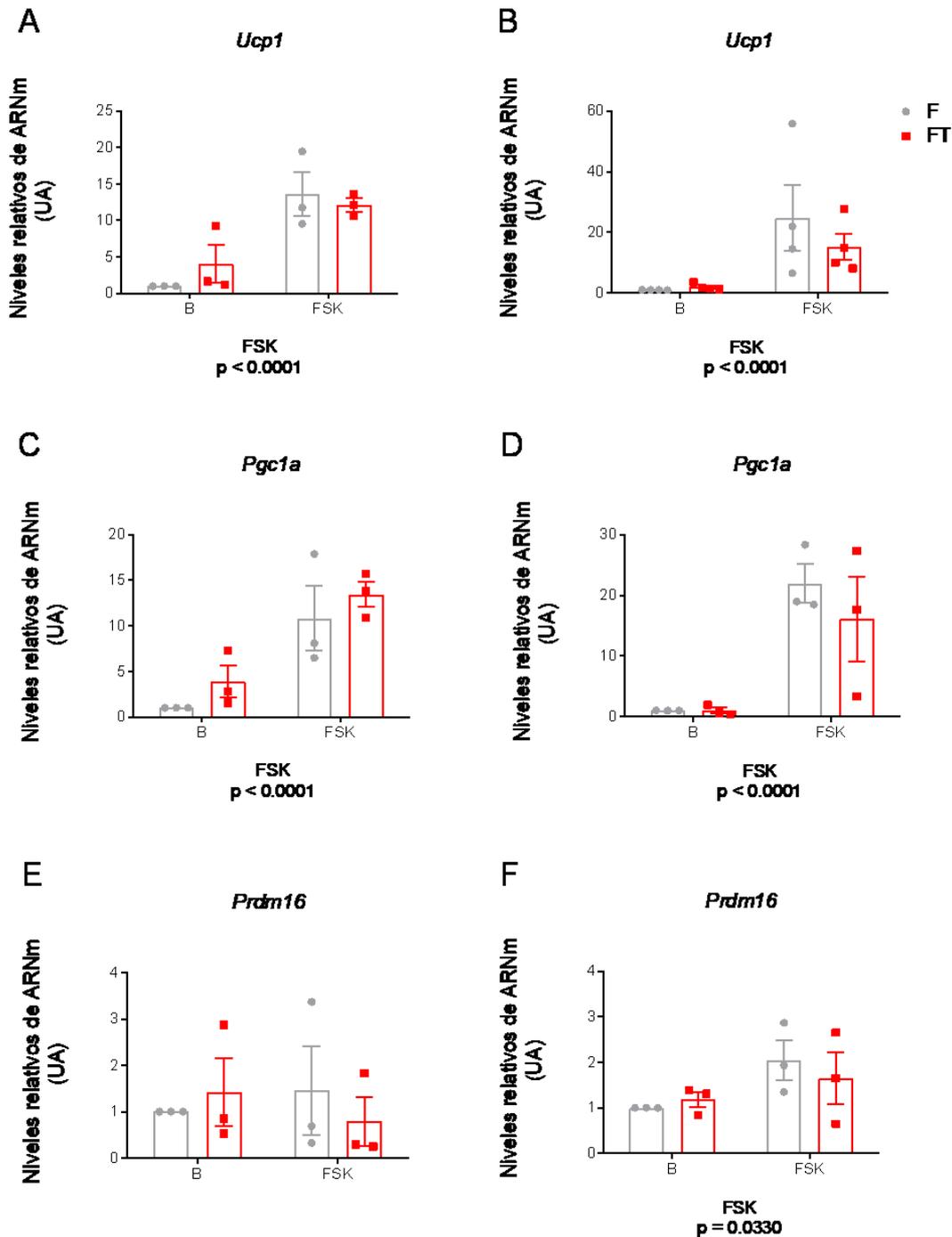
A continuación, se llevó a cabo un cultivo primario con el agregado concomitante de flutamida y testosterona durante todo el proceso de diferenciación (Fig. 29). Nuevamente, se realizó el ensayo con FSK durante las últimas 4 h. En estos experimentos, solo la variable FSK fue estadísticamente significativa para los genes Ucp1 (Fig. 29A y B) y Pgc1a (Fig. 29C y D) en los cultivos provenientes de ambos depósitos, pero la expresión de Prdm16 solo fue incrementada con FSK en el cultivo de los adipocitos diferenciados del TARP (Fig. 29F) sin cambios en el TAI (Fig. 29E). Por lo tanto, la inhibición encontrada anteriormente por la testosterona fue bloqueada por el agregado del antagonista. .

De esta manera, los resultados aquí encontrados nos permiten concluir que la reducción en la expresión de los marcadores termogénicos sería dependiente de los efectos desencadenados por los andrógenos y su unión al receptor nuclear correspondiente.

## Resultados



**Figura 28. La flutamida no modifica la expresión de marcadores termogénicos en adipocitos diferenciados *in vitro*.** Medida mediante RT-qPCR de los niveles de expresión relativa de *Ucp1*, *Pgc1a* y *Prdm16* en adipocitos diferenciados *in vitro* provenientes de CPAs del TAI (**A**, **C** y **E** respectivamente) y del TARP (**B**, **D** y **F**, respectivamente) en condiciones basales (B) y estimuladas (FSK) con forskolina como se indica en el esquema experimental de la figura 11. Los valores se muestran como la media  $\pm$  EEM.  $n=3$  experimentos independientes por grupo analizados por duplicado. Para el análisis estadístico se empleó la prueba ANOVA de dos vías para analizar los factores de manera individual (forskolina y flutamida) y su interacción (forskolina x flutamida).



**Figura 29.** La inhibición de la expresión de los marcadores termogénicos en adipocitos cultivados *in vitro* es dependiente del receptor de andrógenos. Medida mediante RT-qPCR de los niveles de expresión relativa de *Ucp1*, *Pgc1a* y *Prdm16* en adipocitos diferenciados *in vitro* provenientes de CPAs del TAI (**A**, **C** y **E** respectivamente) y del TARP (**B**, **D** y **F**, respectivamente) en condiciones basales (B) y estimuladas (FSK) con forskolina como se indica en el esquema experimental de la figura 11. Los valores se muestran como la media  $\pm$  EEM. n=3 experimentos

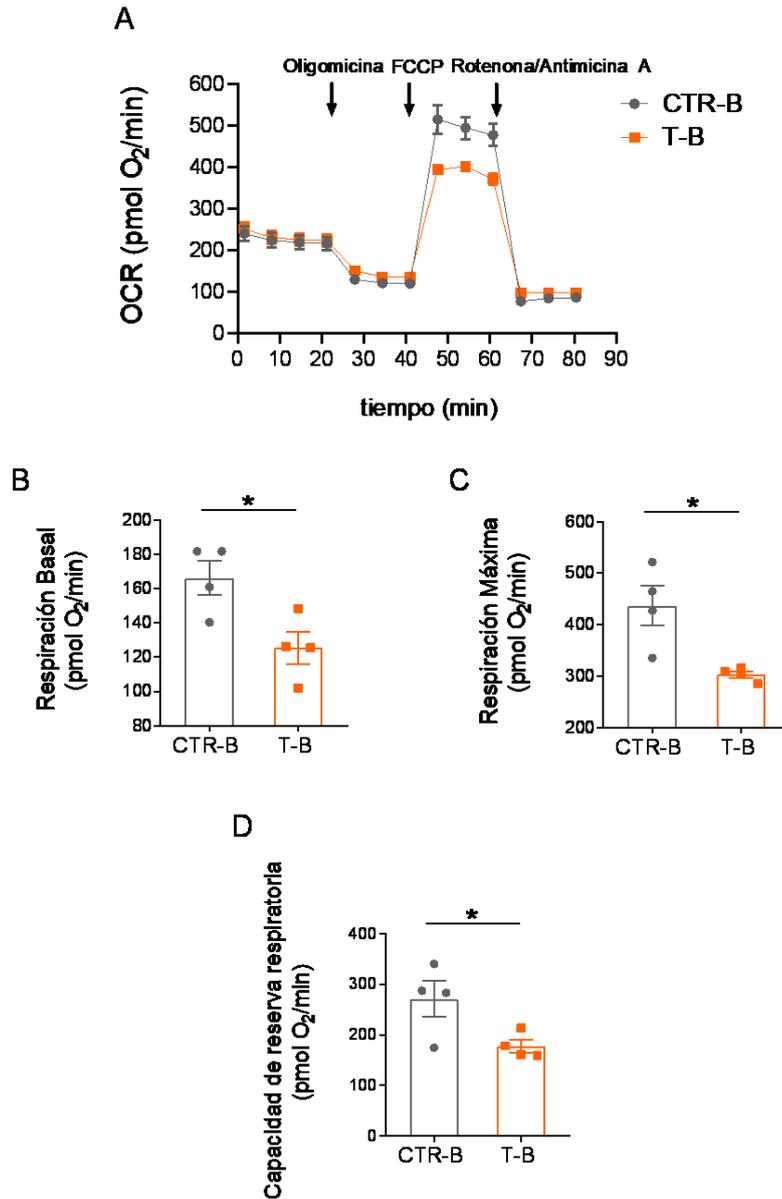
*Resultados*

independientes por grupo analizados por duplicado. Para el análisis estadístico se empleó la prueba ANOVA de dos vías para analizar los factores de manera individual (forskolina y testosterona) y su interacción (forskolina x testosterona).

*4.3.4. La testosterona modifica parámetros relacionados con la actividad mitocondrial la respiración basal y la respiración máxima*

Por último, se evaluó si la testosterona modifica la funcionalidad de las mitocondrias a través de la determinación de la tasa de consumo de oxígeno (OCR, en inglés) (Fig. 30). Este experimento solo fue realizado con cultivos de CPAs provenientes del TARP debido a que este depósito presenta una mayor relevancia en machos por su implicancia en desordenes metabólicos y además la comparación en la expresión de marcadores termogénicos entre depósitos de animales CTR (Figs. 34A y 35A) indicó que la expresión de Ucp1 en condiciones estimuladas resultó mayor para el depósito visceral. En la figura 30A se muestra el perfil de la corrida obtenida para cultivos CTR y tratados con testosterona. En este caso, encontramos que la capacidad respiratoria basal (Fig. 30B), la capacidad respiratoria máxima (obtenida luego de la adición de FCCP) (Fig. 30C) y la capacidad de reserva respiratoria (Fig. 30D) descendieron con el agregado de testosterona.

Resultados



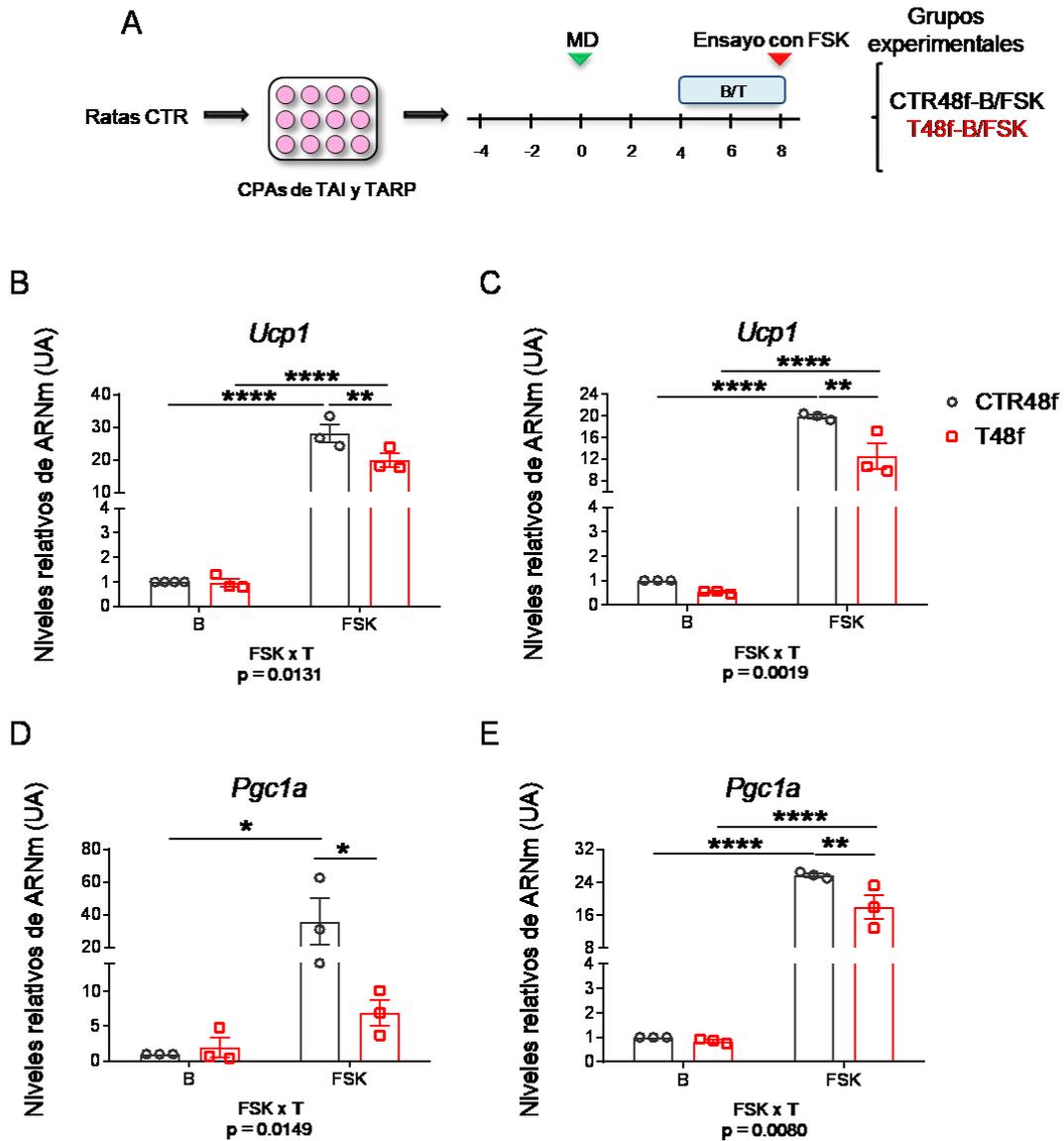
**Figura 30. La testosterona modifica parámetros relacionados a la respiración mitocondrial en el TARP.** Se muestra el perfil obtenido de la de cultivos CTR-B y T-B del TARP (A) junto con la respiración basal (B), la respiración máxima (C) y la capacidad de reserva respiratoria (D). Los valores se muestran como la media  $\pm$  EEM. n= 4 experimentos independientes realizados por duplicado. Para el análisis estadístico se empleó la prueba t de Student bilateral. \*p<0.05 vs CTR.

#### *4.3.5. Los adipocitos cultivados in vitro con testosterona durante la última etapa de diferenciación presentan menor expresión de marcadores termogénicos*

Una vez estudiada la acción de los andrógenos durante todo el proceso de diferenciación, se fue evaluó si la testosterona fue capaz de modular la expresión de genes involucrados en la termogénesis sobre adipocitos beige ya diferenciados (Fig. 31A). Es decir, en esta etapa el tratamiento se realizó sobre adipocitos que ya presentaban un aumento en el número de vacuolas lipídicas y por lo tanto, un elevado grado de diferenciación. En este experimento se encontró una interacción entre las variables estudiadas, y por lo tanto un efecto diferencial entre condiciones basales y estimuladas, tanto en la expresión de Ucp1 (Fig. 31B y C) como en la de Pgc1a (Fig. 31D y E) de ambos depósitos. El post test indicó que la expresión de ambos genes en los CTR48f incrementó con el agregado de FSK al igual que en el grupo T48f, salvo para Pgc1a en el TAI de este grupo. Además, en condiciones estimuladas se encontró que la testosterona redujo los niveles relativos de ARNm de Ucp1 y Pgc1a tanto en el TAI como en el TARP.

Por lo tanto, se podría decir que la testosterona regula la transcripción de genes involucrados en el programa termogénico en adipocitos beige maduros.

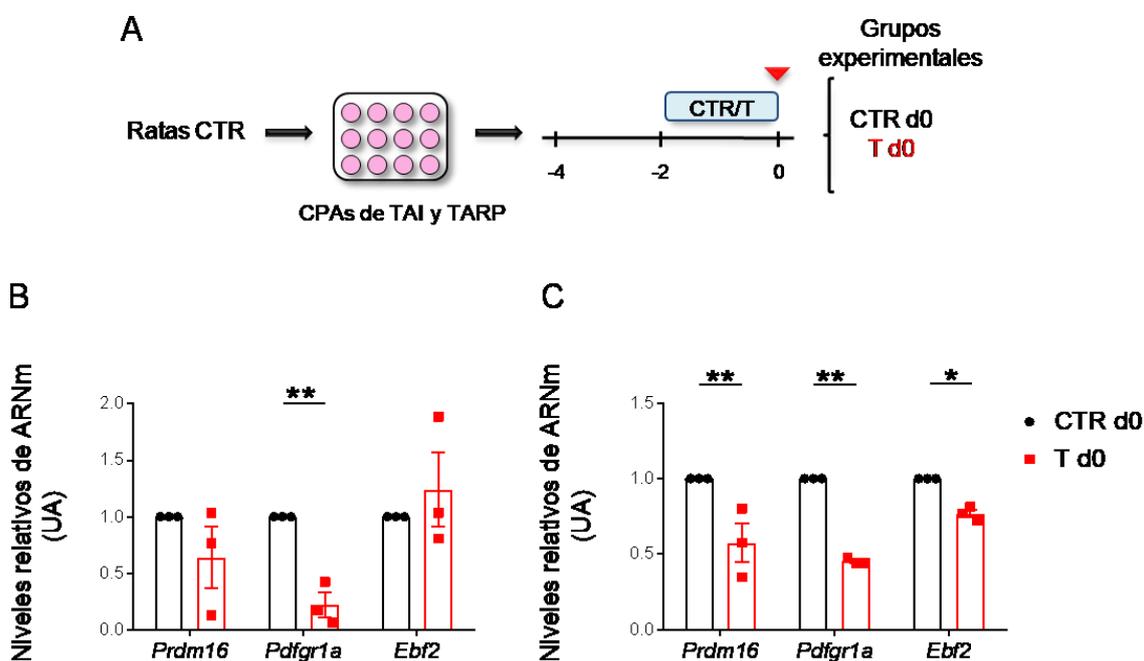
Resultados



**Figura 31. La testosterona inhibe marcadores de expresión termogénicos en adipocitos beige postdiferenciados.** Esquema experimental utilizado para evaluar el efecto de la testosterona sobre adipocitos beige maduros diferenciados in vitro provenientes del TAI y del TARP de animales controles (A). Medida mediante RT-qPCR de los niveles de expresión relativa de *Ucp1* y *Pgc1a* en el TAI (B y D, respectivamente) y en el TARP (C y E, respectivamente) en condiciones basales (B) y estimuladas (FSK) con forskolina como se indica en el esquema experimental. Los valores se muestran como la media ± EEM. n=3 experimentos independientes por grupo analizados por duplicado. Para el análisis estadístico se empleó la prueba ANOVA de dos vías para analizar los factores de manera individual (forskolina y testosterona) y su interacción (forskolina x testosterona) seguido por la prueba de Sidak. \*p<0.05, \*\*p<0.01 y \*\*\*\*p<0.0001.

#### 4.3.6. La incubación de las células precursoras de adipocitos con testosterona inhibe la expresión de marcadores de precursores de adipocitos beige

Como se menciona en la introducción, uno de los mecanismos por los cuales se generan los adipocitos beige consiste en la adipogénesis a partir de CPAs. Por lo tanto, se indagó acerca del efecto de los andrógenos sobre las CPAs obtenidas de la FEV de animales CTR. En la Figura 32A se representa el esquema experimental. Luego de la incubación durante 48 hs, las células se levantaron y se evaluaron los niveles de Prdm16, Pdgfr1a y Ebf2 mediante RT-qPCR (Fig. 32B y C). Como puede observarse, en ambos tipos de depósitos, los valores relativos de expresión de Prdm16 y Pdgfr1a descendieron en presencia de testosterona mientras que Ebf2 solo disminuyó en el TARP. Esto indicaría que dicha hormona es capaz de inhibir la expresión de genes involucrados en la adipogénesis beige y por lo tanto, podría resultar en una alteración funcional en estadios madurativos posteriores.



**Figura 32. La testosterona reduce el potencial de generar adipocitos beige.** Esquema experimental utilizado para la determinar el efecto de la testosterona sobre la expresión de marcadores de precursores de adipocitos beige (A). Valores relativos de ARNm de Prdm16, Pdgfr1a y Ebf2 en cultivos de CPAs obtenidas del TAI (B) y del TARP (C) de animales controles adultos. Los

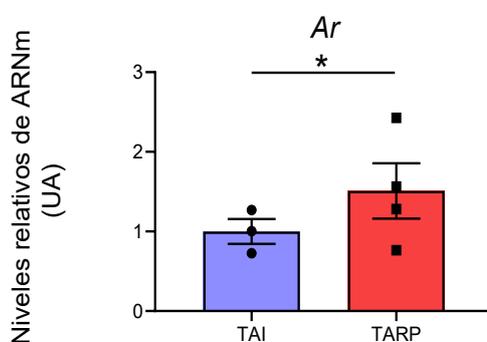
*Resultados*

valores se muestran como la media  $\pm$  EEM. n= 3 experimentos independientes analizado por duplicado. Para el análisis estadístico se empleó la prueba no paramétrica de Mann-Whitney bilateral. \*p<0.05 y \*\*p<0.01 vs CTR.

## Anexo

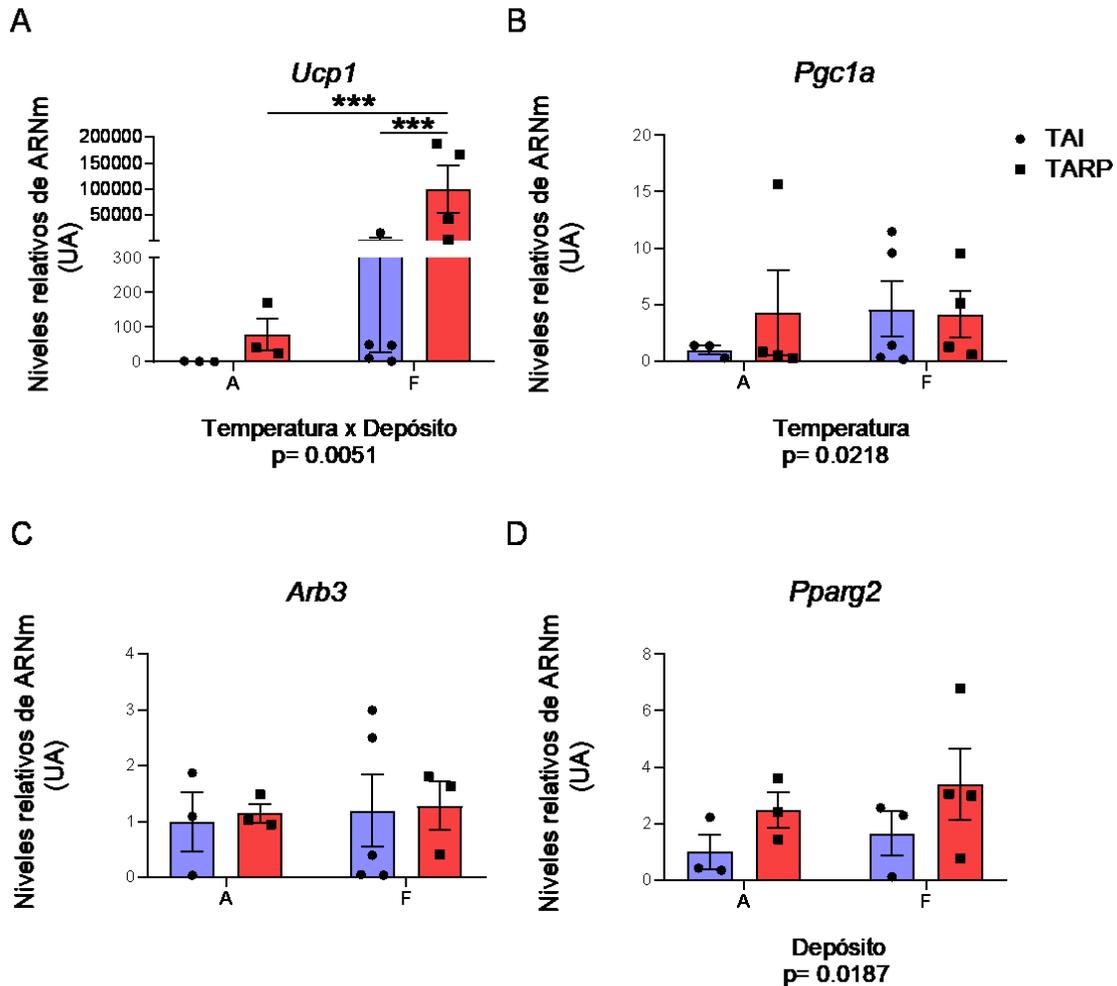
En este anexo se muestran los niveles de expresión relativo de ARNm de distintos marcadores utilizados durante la presente tesis doctoral en donde se realizaron comparaciones entre los dos tipos de depósitos de TAB empleados provenientes de animales controles. Esto fue realizado con el fin de analizar si existen diferencias dependientes del depósito empleado.

En primer lugar, el análisis de los niveles de Ar arrojó que este receptor se expresó en mayor medida en el depósito visceral (Fig. 33). En cuanto a los marcadores termogénicos, se encontró una interacción entre las variables (temperatura y tipo de depósito) en los valores de Ucp1 (Fig. 34A). El post test indicó que si bien a temperatura ambiente no presentaron diferencias, el TARP de animales expuestos al frío tuvo el mayor incremento en la expresión de este gen. Por otro lado, los niveles de Pgc1a incrementaron en ambos depósitos por la exposición al frío, sin presentar diferencias entre los mismos (Fig. 34B) mientras que Arb3 no se vió afectado por las variables ensayadas (Fig. 34C). Finalmente, la expresión de Pparg2 se halló incrementada en el depósito visceral (Fig. 34D).



**Figura 33. La testosterona modifica parámetros relacionados a la respiración mitocondrial en el TARP.** Se muestra el perfil obtenido de la de cultivos CTR-B y T-B del TARP (A) junto con la respiración basal (B), la respiración máxima (C) y la capacidad de reserva respiratoria (D). Los valores se muestran como la media  $\pm$  EEM. n= 4 experimentos independientes realizados por duplicado. Para el análisis estadístico se empleó la prueba t de Student bilateral. \*p<0.05 vs CTR.

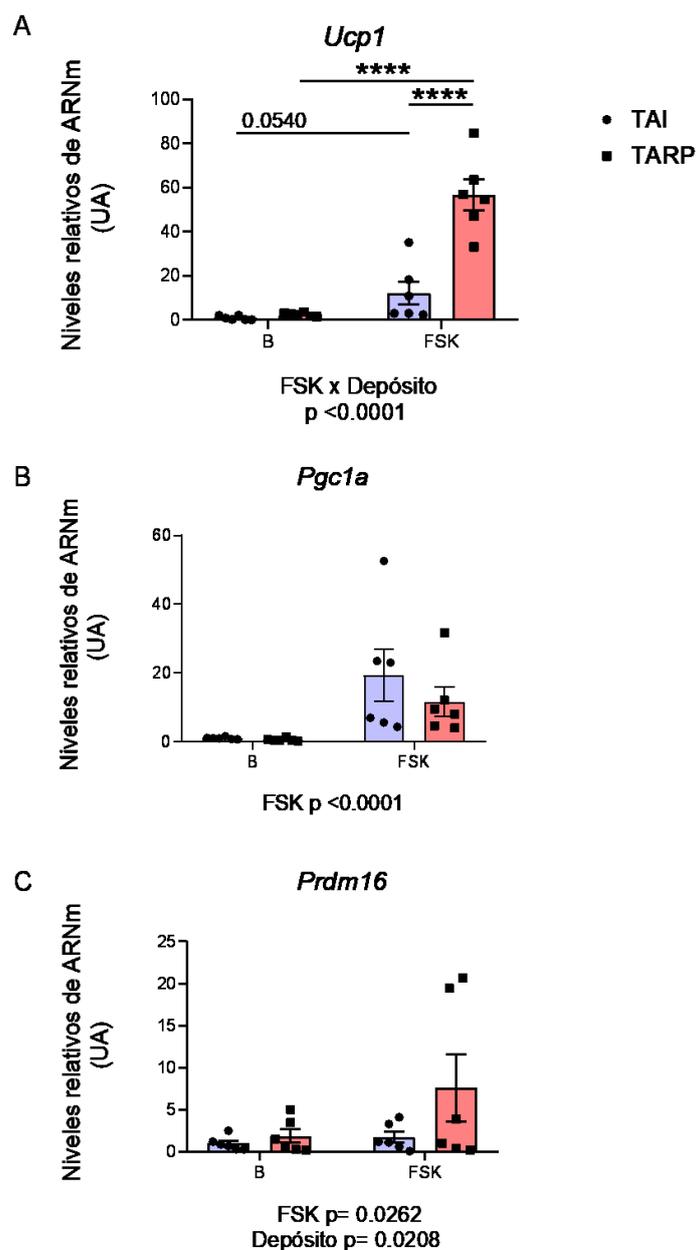
## Resultados



**Figura 34.** El TARP de los animales CTR muestra una mayor inducción por el frío en la expresión tisular de *Ucp1*. Medida de los niveles relativos de expresión de ARNm de *Ucp1*, *Pgc1a*, *Arb3* y *Pparg2* en muestras de animales controles. (A, B, C y D, respectivamente). Los valores se muestran como la media  $\pm$  EEM. n=3-5 animales por grupo Para el análisis estadístico se empleó la prueba ANOVA de dos vías para analizar los factores de manera individual (temperatura y depósito) y su interacción (temperatura x depósito) seguido por la prueba de Sidak. \*\*\*p<0.001.

En cuanto a los marcadores termogénicos evaluados en los cultivos hasta día 8, se encontró una interacción entre las variables FSK (estímulo) y tipo de depósito en los valores de *Ucp1* (Fig. 35A). El post test indicó que si bien en ausencia de estímulo no se presentaron diferencias, los adipocitos del TARP bajo la incubación con FSK tuvieron el mayor incremento en la expresión de este gen. Por otro lado, los niveles de *Pgc1a* incrementaron en ambos depósitos por la incubación con FSK, sin presentar diferencias entre los mismos (Fig. 35B) mientras que *Prdm16* aumentó debido al estímulo y su expresión fue más elevada en los adipocitos del TARP (Fig. 35C).

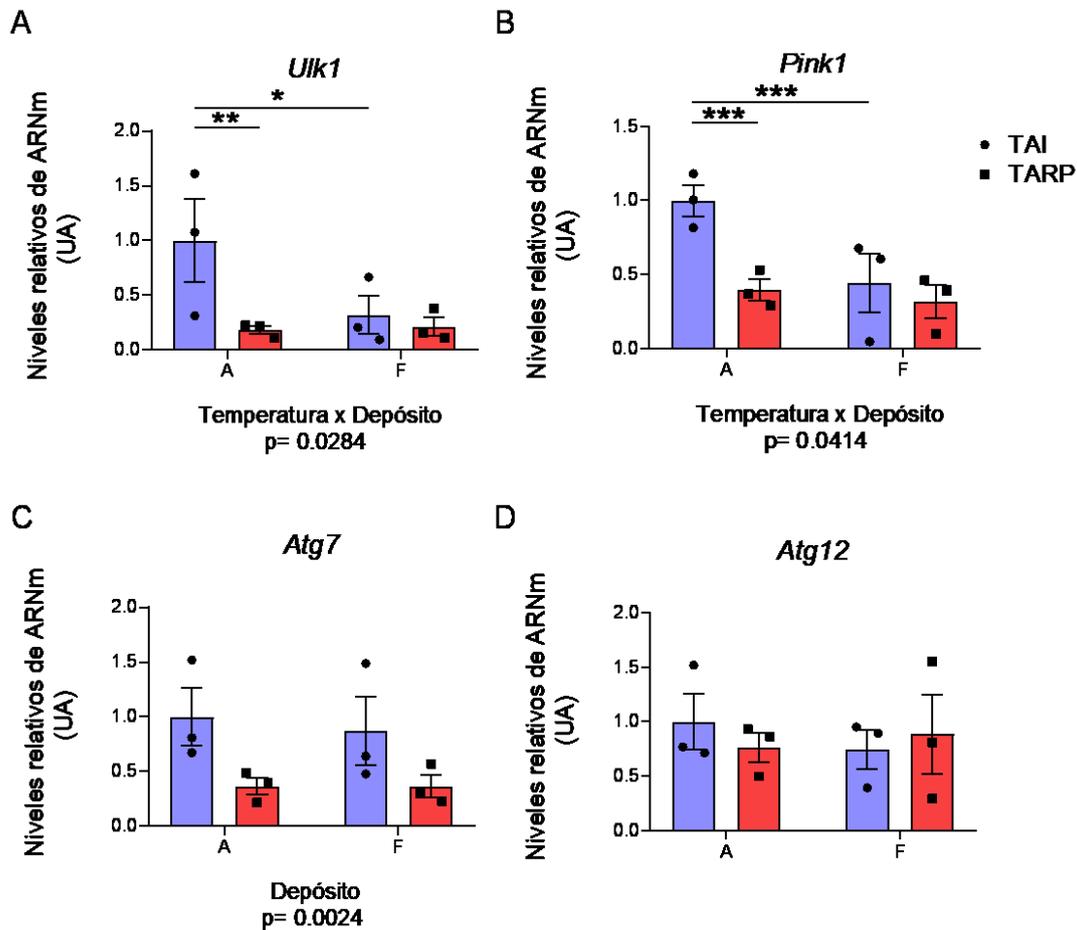
## Resultados



**Figura 35. Los adipocitos del TARP de los animales CTR muestran una mayor inducción por la FSK en la expresión de Ucp1.** Medida de los niveles relativos de expresión de ARNm de Ucp1, Pgc1a y Prdm16 en muestras de cultivos de CPAs diferenciadas y mantenidas hasta día 8 animales controles. (A, B y C, respectivamente). Los valores se muestran como la media  $\pm$  EEM. n=6 experimentos por grupo Para el análisis estadístico se empleó la prueba ANOVA de dos vías para analizar los factores de manera individual (FSK y depósito) y su interacción (FSK x depósito) seguido por la prueba de Sidak. \*\*\*p<0.0001.

Finalmente, se comparó la expresión tisular de los distintos genes empleados como marcadores del proceso de autofagia (Fig. 36). En Ulk1 y Pink1, se encontró

una interacción entre las variables temperatura y tipo de depósito (Fig. 36A y B). El post test indicó que a temperatura ambiente el TARP expresó niveles menores de estos genes comparado con el TAI. El frío ocasionó una reducción en estos valores en el depósito subcutáneo. Además, los niveles de Atg7 se redujeron en el TARP (Fig. 36C) pero Atg12 se mantuvo sin cambios (Fig. 36D).



**Figura 36. El TARP de los animales CTR muestran un descenso en la expresión de marcadores de autofagia.** Medida de los niveles relativos de expresión de ARNm de Ulk1, Pink1, Atg7 y Atg12 en muestras de tejidos de animales controles. (A, B y C, respectivamente). Los valores se muestran como la media  $\pm$  EEM. n=3 animales por grupo Para el análisis estadístico se empleó la prueba ANOVA de dos vías para analizar los factores de manera individual (temperatura y depósito) y su interacción (temperatura x depósito) seguido por la prueba de Sidak. \*p<0.05, \*\*p<0.001 y \*\*\*p<0.0001.

## *5. Discusión*



### 5.1. Consideraciones generales

En humanos se ha estimado que 40-50 g de TAP estimulado al máximo podría representar un aumento del 20 % del gasto energético diario<sup>188</sup>. Esta estimación fue realizada antes de conocerse la existencia del otro tipo de adipocitos termogénicos, los adipocitos beige, De esta manera, su descubrimiento abrió las puertas hacia la exploración de los mecanismos que gobiernan el proceso termogénico y sus posibles aplicaciones para el tratamiento y/o prevención de enfermedades metabólicas.

Además, se ha visto que el TAP de humanos presentan un patrón de expresión de marcadores similares a los encontrados en adipocitos beige de roedores (CD137, TMEM26 y TBX1)<sup>73</sup>.

En este sentido, un grupo de investigadores utilizó la técnica CRISPR-SAM-CAS para generar a partir de preadipocitos humanos provenientes de TAB adipocitos que fueron capaces de expresar marcadores termogénicos e incluso funcionaron como adipocitos beige<sup>189</sup>. Asimismo, el trasplante de estas células en ratones resultó en una menor ganancia de peso corporal, un menor contenido lipídico hepático y en una activación del TAP endógeno<sup>190</sup>. Esto demuestra el potencial terapéutico que podrían brindar los adipocitos beige en contextos metabólicos desfavorables y por lo tanto, las investigaciones básicas realizadas en este campo presentan una gran relevancia en el ámbito de la salud.

Como se mencionó en la introducción, existe una gran evidencia de los efectos de los andrógenos en la biología y el metabolismo del TA, que incluyen la regulación de la lipólisis/lipogénesis, la síntesis de adipoquinas y la diferenciación de adipocitos blancos<sup>191</sup>. Además, se han estudiado las acciones de los andrógenos sobre la fisiología de TAP<sup>192</sup>. Sin embargo, los estudios acerca de los efectos sobre el *browning* del TAB y la generación de adipocitos beige existentes son escasos y controvertidos. Es por ello que en la presente tesis doctoral se evaluaron los efectos de los andrógenos sobre este proceso a través de dos acercamientos: *in vivo* (a partir de castraciones prepuberales de ratas macho) e *in vitro* (mediante el cultivo en presencia de testosterona o dihidrotestosterona de células precursoras de adipocitos y su eventual diferenciación).

## 5.2. Modificaciones en el metabolismo general a raíz de la depleción prepuberal de los andrógenos

En primera instancia, se llevó a cabo la caracterización del modelo utilizado para este estudio. Debido a que la mayor producción de testosterona transcurre durante la pubertad y luego estos valores se mantienen estables durante la etapa adulta, se realizaron castraciones bilaterales previas a ese incremento.

En este caso, se encontró una disminución del 73,7% en la concentración plasmática de testosterona total en la edad adulta en los animales castrados. En dichos individuos se observó un descenso en el peso corporal comparado con los animales intactos. El descenso en el peso corporal a causa de la castración de animales machos ha sido observado en otros trabajos<sup>193-195</sup>. Se ha reportado que la testosterona es necesaria para un correcto desarrollo del sistema óseo<sup>196,197</sup>. Incluso, la testosterona resulta importante para el desarrollo de la masa muscular en roedores jóvenes<sup>198</sup>. Sin embargo, en estos trabajos los valores de testosterona obtenidos debido a la castración son menores al 10 % con respecto a los animales controles. Por otro lado, la castración de ratones de 8 semanas de edad causó cambios en la masa muscular en la doceava semana posterior a la intervención que fueron revertidos con el tratamiento con testosterona<sup>199</sup>.

En este caso, el descenso en el peso corporal se acompañó con una reducción en la ingesta calórica en el grupo ODX. La regulación del consumo de alimento es un proceso fisiológico complejo en el cual intervienen adipocinas sintetizadas por el TAB así como también hormonas secretadas por órganos del sistema digestivo que tienen como dianas regiones del sistema nervioso central. Así, la leptina que es sintetizada principalmente por el TAB en los estados de saciedad conduce a la reducción del consumo de alimento y al aumento del gasto energético. De manera opuesta, la ghrelina es liberada por el estómago en condiciones preprandiales y promueve el consumo de alimento. Si bien aquí no se realizaron determinación de ghrelina plasmática, los niveles gástricos de ARNm de la hormona orexigénica ghrelina son bajos en estadios postnatales pero su expresión se mantiene estable a los 40 días y no son afectados por la gonadectomía<sup>200</sup>. Sin embargo, la castración de ratas alrededor de este estadio reduce los niveles de ghrelina plasmática y son recuperados cuando se les aplica testosterona<sup>201,202</sup>. De manera opuesta, en

humanos la testosterona disminuye los niveles de ghrelina, tanto en prepuberales<sup>203</sup> como en la adultez<sup>204</sup>. Además, el descenso encontrado en la hormona de crecimiento en ratas castradas se correlacionó con una disminución en la ghrelina<sup>205</sup>.

De manera sorprendente, los niveles plasmáticos de leptina se hallaban significativamente disminuidos en los animales castrados. Esto resultó llamativo debido a que se esperaría que el descenso en dicha adipocina ocasionara un incremento en el consumo de alimento ya que indicaría un menor estado de saciedad. En ratones *ob/ob* se observa un retardo en el inicio de la pubertad<sup>206</sup>, acompañado por hipogonadismo y obesidad<sup>207</sup>.

Por lo tanto, se requieren estudios más exhaustivos que den cuenta de los efectos de la depleción de andrógenos sobre centros reguladores del apetito.

A pesar de que en hombres el hipogonadismo se asocia a un incremento en la insulino-resistencia<sup>208</sup>, al analizar la insulinemia y la glucemia en condiciones no ayunadas, no se encontraron diferencias entre los grupos CTR y ODX. En ratas adultas, se ha reportado que tanto la castración como el exceso de andrógenos promueven resistencia a la insulina<sup>209</sup> y una reducción en la masa pancreática<sup>210</sup>. Sin embargo los animales castrados presentaron una normoglucemia y en otro trabajo, una prueba de tolerancia a la glucosa oral inalterado<sup>211</sup>. Asimismo, se ha descrito la existencia de un eje adipoinsular en donde la secreción de leptina por parte del TA reduce los niveles de insulina mientras que esta hormona incrementa la liberación de leptina<sup>212</sup>. Por lo tanto, el descenso en los valores de leptina podría contrarrestar una posible hiperinsulinemia y de esta manera el resultado final es una glucemia normal.

En cuanto a los TG plasmáticos, la castración redujo dichos niveles. Esto puede deberse a la disminución en el consumo de alimento o a modificaciones del metabolismo lipídico a nivel hepático, es decir, a la producción endógena.

Esta disminución de TG en los animales ODX se acompañó con una disminución en las masas de los TAB. El incremento del TA visceral se asocia al desarrollo de insulino-resistencia y por lo tanto, al aumento del riesgo de padecer diabetes<sup>213</sup>. Asimismo, un posible mecanismo que contribuye al descenso en los valores de leptina puede deberse a la disminución de la trigliceridemia. Se comprobó que el incremento en los niveles plasmáticos de TG conduce a un descenso en el

transporte de la leptina a través de la barrera hematoencefálica y por lo tanto promueve la resistencia a la acción de esta hormona<sup>214,215</sup>. Asimismo, se demostró que la disminución de los TG en plasma y en el TA mejora la sensibilidad a la leptina y a la insulina<sup>216</sup>. Por lo tanto, un posible mecanismo que contribuya al descenso de la leptina con una insulinemia normal en los ODX pueda deberse al incremento en la sensibilidad del TAB a estas hormonas. Otros estudios deberían realizarse para evaluar esta posibilidad.

Uno de los factor clave que regula la concentración de TG en sangre se debe a la actividad de la enzima LPL<sup>217</sup>, ubicada en el endotelio de los capilares sanguíneos y regulada por los andrógenos: su actividad desciende con la testosterona<sup>218-220</sup> mientras que la castración la incrementa<sup>221,222</sup> y de esta manera se favorece el *clearance* en sangre. Debe tenerse en cuenta que el incremento en la actividad de LPL conllevaría al aumento en la captación de AG y al posterior almacenamiento de lípidos dentro de los adipocitos<sup>223</sup>. Sin embargo, durante el *browning* se induce un aumento en los niveles de LPL para permitir la utilización de los AG liberados como fuente de energía para la termogénesis<sup>224</sup>. A partir de los resultados de esta tesis, se podría inferir que la depleción de andrógenos favorecería la captación de TG por parte del TAB ocasionando un descenso a nivel plasmático y esto no se traduce en un aumento de la adiposidad debido al incremento en la lipólisis para el desencadenamiento del *browning*. Retomando, el descenso en el consumo de alimento observado por la castración conlleva al menor peso corporal y a un menor contenido de TG en sangre. Esto último permitiría una mejora en la acción de la leptina y contribuiría a su descenso.

Si bien, por lo expuesto con anterioridad, el descenso del peso corporal del grupo ODX no puede ser totalmente atribuida a la disminución en el peso de los depósitos de TA, la corrección de dichos valores por peso corporal mantuvo el descenso en el TARP y en el TAE pero no así en el TAI. Esto indicaría un cambio específico en la distribución de la masa de los depósitos viscerales debido a la castración. Incluso, a través del análisis histológico se comprobó que la castración generó adipocitos de menor tamaño y un desplazamiento hacia la izquierda en la distribución del tamaño de los mismos. Esto también contribuye a que los animales ODX tengan una disminución en los niveles de leptina, ya que sus valores son directamente proporcionales al tamaño celular<sup>225</sup>. Asimismo, esto se acompañó con

un descenso en los niveles de transcriptos de Ob en ambos depósitos estudiados en los ODX. Los niveles de AdipoQ no presentaron cambios entre los animales castrados y los controles. Este resultado es congruente con el hallazgo de otros investigadores que demostraron que la castración de ratones machos no cambiaron los valores proteicos ni los de ARNm pero sí causó un incremento en la concentración plasmática de AdipoQ<sup>226</sup>.

Los valores de Ar se incrementaron en el TAI proveniente del primer grupo, posiblemente con el fin de aumentar la captación de los andrógenos remanentes luego de la intervención. En línea con esto, cuando se diferenciaron las CPAs *in vitro*, se hallaron niveles elevados de Ar en ambos depósitos de TAB provenientes de los ODX.

En respuesta a alteraciones en las demandas energéticas, el TA responde a través de modificaciones en el número y el tamaño de los adipocitos así como también en cambios en la FEV. Dicho fenómeno se conoce como remodelamiento del TA<sup>227</sup>. En este trabajo el tamaño de los adipocitos del TAI no cambió pero disminuyó en el TARP de los animales depletados prepuberalmente en andrógenos. Asimismo, el tamaño de los adipocitos se relaciona con la sensibilidad a la insulina, siendo los adipocitos hipertrofiados menos sensibles<sup>228</sup>.

### *5.3. Efecto de la depleción de andrógenos en el browning en condiciones basales de temperatura*

A continuación, se evaluaron marcadores termogénicos en ambos depósitos y hubo un incremento en los niveles de Ucp1, Pgc1a, Prdm16 en el TAI y TARP y en Dio2 en el TARP del grupo orquidectomizado, indicando la promoción hacia el linaje adipocitario beige debido a la ausencia de niveles elevados de andrógenos. Sin embargo, un grupo de investigadores demostró en ratones machos ARKO niveles reducidos de Ucp1 tanto en TAP como en TAB relacionados con la obesidad de inicio tardío<sup>177</sup>. No obstante, en ratones ARKO TA específico, se ha informado de un aumento en los niveles de ARNm de Pgc1a y Ucp2 en el TAE<sup>229</sup>. En línea con los resultados encontrados aquí, la castración en ratones indujo un aumento tanto en la expresión de Ucp1 en el TAP como en el área UCP1 positiva en el TAI a temperatura ambiente<sup>183</sup> mientras que la depleción de andrógenos en primates

ocasionó la aparición de adipocitos multivacuolares en depósitos de TAB pero no se encontraron cambios a nivel de la expresión de genes termogénicos<sup>182</sup>. Además, en animales castrados se observó un gasto energético y cociente respiratorio elevados acompañado de un bajo peso del depósito graso visceral<sup>205</sup>. Sin embargo, en dichos trabajos no se exploraron las respuestas de estos depósitos luego de la estimulación por frío.

En general, nuestros datos y los estudios mencionados anteriormente sugieren que la ausencia de andrógenos *in vivo* mejora la capacidad termogénica del TAB, que está en línea con la mayor activación del *browning* encontrada en el TA perirrenal y subcutánea de mujeres en comparación con los depósitos de grasa de hombres<sup>230,231</sup>.

Por otro lado, se ha observado que los hombres obesos presentan hipogonadismo<sup>232</sup>. Sin embargo recientemente se ha descrito que el TA subcutáneo de estos pacientes contiene niveles elevados de testosterona<sup>233</sup>. Por tanto, se podría plantear la hipótesis de que esta acumulación de andrógenos podría estar asociada con una inhibición del *browning* del TAB que podría contribuir a la hipertrofia de los adipocitos y la disfunción del TA observado en estos pacientes.

Los adipocitos beige se pueden generar por adipogénesis *de novo* a partir de CPAs beige y/o por transdiferenciación a partir de adipocitos blancos<sup>91,234</sup>. Asimismo, dentro del TAB existen otros tipos celulares capaces de interactuar con células del linaje adipocitario para promover o inhibir el *browning*<sup>235</sup>. Para investigar si la termogénesis encontrada en el TA de animales carentes de andrógenos puede deberse a alguna modificación sobre las propias CPAs, las mismas fueron aisladas y cultivadas *in vitro* con una MD que promueve el linaje beige. Al final del experimento, se encontró que las CPAs de animales ODX generaban adipocitos con una mayor capacidad termogénica, sustentado por una mayor expresión de marcadores de adipocitos beige, como Dio2, Pgc1a y Ucp1. Estos resultados podrían indicar que la gran capacidad termogénica encontrada a nivel tisular en animales ODX puede deberse, en parte, a un aumento en el potencial adipogénico de CPAs hacia el linaje de adipocitario beige, generado por un nicho deficiente en andrógenos.

La enzima DIO2 controla la activación de las hormonas tiroideas<sup>236</sup> y la disrupción de su gen deteriora la termogénesis del TAP<sup>237</sup>. Además, sus niveles de

expresión en el TA subcutáneo de pacientes con síndrome metabólico se correlacionan negativamente con los niveles de TG<sup>238</sup> mientras que se ven incrementados en el TAP de ratas tratadas con leptina<sup>239</sup>. Aquí se halló un aumento en la expresión de este gen tanto a nivel tisular como en los adipocitos diferenciados *in vitro* provenientes de los animales castrados y por lo tanto, quedarían más propensos a la acción de las hormonas tiroideas lo cual favorecería el desencadenamiento del proceso termogénico. Asimismo, el receptor de hormonas tiroideas (TR) comparte el mismo co-regulador (ARA70) con AR<sup>240</sup> y por lo tanto, ante la ausencia de ligando (andrógenos) podría favorecerse la interacción T3-TR-ARA70 y con ello, la termogénesis<sup>241</sup>.

A diferencia de lo que ocurre con el TAP, el TAB se encuentra menos desarrollado luego del nacimiento. Como se mencionó en la introducción, se ha demostrado que durante las primeras semanas postnatales se observa, una inducción transitoria del *browning* en el TARP y el TAI de ratones, con un máximo alrededor de los 20 días de edad y un decaimiento hacia los 30 días de edad<sup>93,242</sup>. Este remodelamiento inicial puede ser una respuesta ante la primera exposición al medio externo y podría ser necesario para generar una respuesta más rápida y de mayor magnitud ante una próxima exposición a temperaturas menores. Extrapolando estos resultados al modelo de estudio empleado en la presente tesis, se podría decir que la combinación de la aparición de adipocitos beige dada como respuesta ante la primera aclimatación junto con la ausencia de la inhibición por parte de los andrógenos sobre la adipogénesis en los animales ODX lograría mantener el linaje beige más allá de los primeros estadios postnatales. Estudios de marcación y seguimiento del linaje adipocitario podrían ser utilizados para analizar con más detalle este supuesto.

#### *5.4. Cambios metabólicos inducidos por la exposición al frío en animales depletados en andrógenos*

Ante el hallazgo de que los animales ODX mostraron un incremento en los marcadores termogénicos en condiciones basales, se prosiguió con el estudio del *browning* inducido por bajas temperaturas durante 7 días. Tanto en el consumo de alimento como en el peso corporal los ODX se comportaron de manera similar a los

controles ante el frío, es decir, sin diferencias entre los grupos CTR-C y ODX-C, pero a temperatura ambiente la diferencia se mantuvo. Asimismo, como era de esperarse debido al incremento en el gasto energético para mantener la homeostasis corporal térmica<sup>243</sup> el frío ocasiona un aumento en el consumo calórico y un descenso en el peso corporal en ambos grupos experimentales. Sin embargo, la exposición a bajas temperaturas ocasiona en el grupo castrado un incremento de 1.5 veces en el consumo calórico mientras que en los controles, 1.3 veces. Esta pequeña diferencia fue estadísticamente significativa (no mostrado) y además, al no presentarse cambios en el delta del peso corporal entre los grupos en frío, estaría indicando que el excedente del consumo calórico en las ratas castradas es utilizado por otros procesos fisiológicos que no se traducen en un aumento del peso corporal.

A pesar de la hiperfagia, el análisis de la glucosa plasmática no mostró cambios durante este experimento. Los TG plasmáticos permanecieron con diferencias significativas a temperatura ambiente pero no así en frío, ya que disminuyeron en el grupo CTR-F. Los niveles de TG en sangre están determinados por la ingesta de alimentos como fuente exógena y la síntesis hepática como fuente endógena. Por lo tanto, debido al rol crítico del hígado en el metabolismo de lípidos, se evaluaron los niveles de TG en este órgano. Se ha informado que durante la exposición al frío ocurre un primer descenso en los TG hepáticos entre los días 2-4 pero luego retorna a los valores encontrados a temperatura ambiente al quinto día del estímulo<sup>244</sup>. En esta línea, se notificó una disminución de del contenido de TG hepáticos ocasionados por la castración. Sin embargo, en otros trabajos se reportó que animales carentes en andrógenos y alimentados con una HFD presentaron un aumento en los niveles de TG<sup>245-247</sup>, pero la inducción del *browning* los redujo<sup>248,249</sup>.

### *5.5. Remodelamiento del TA durante la termogénesis adaptativa inducida por bajas temperaturas*

Si bien en esta tesis, se centró en la termogénesis ocasionada por el *browning*, la medida del peso porcentual del TAP resultó útil para comprobar los efectos estimulantes conocidos del frío sobre este depósito y no se evaluaron otros aspectos de su funcionalidad. El peso porcentual del TAI solo se vió afectada por la disminución de la temperatura, lo cual también es un reflejo de lo encontrado con

anterioridad a temperatura ambiente. Asimismo, el diámetro adipocitario de este TA estuvo afectado solo por este parámetro y en el mismo sentido, es decir, tuvo una disminución. En cambio, la masa porcentual del TARP y el tamaño de los adipocitos decrecieron por la castración. De manera interesante, se visualizó la presencia de adipocitos multivacuolares en el TARP de los animales ODX, lo cual implicaría una activación del *browning* en este depósito.

La termogénesis generada frente al frío puede deberse a la contracción muscular involuntaria (*shivering*) y/o a los mecanismos dependientes del TA, es decir, debido a la actividad de los adipocitos pardos y beige. Tanto en roedores como en humanos la primera respuesta evocada ante la disminución de la temperatura ambiente proviene del *shivering*, que luego decae para dar lugar a la termogénesis producida por el TA<sup>250,251</sup>. El presente trabajo se enfocó específicamente en la termogénesis originada por el *browning* del TAB. En adición, aquí se demostró por primera vez el efecto de la depleción de andrógenos *in vivo* en condiciones estimuladas por frío.

En consecuencia, a raíz de la exposición al estímulo se evidenció en ambos depósitos del TA de ratas ODX expresaron mayores niveles de Ucp1 y Pgc1a, lo que también se reflejó en niveles proteicos de UCP1 más elevados e incluso, como se señaló anteriormente, en adipocitos multiloculares en el TARP.

De manera adicional, al comparar los valores de expresión de los marcadores termogénicos utilizados aquí entre los TAB de animales CTR se pudo observar que el TARP presentó niveles elevados de Ucp1 en comparación con el TAI. Un patrón similar fue hallado en el TA proveniente de humanos<sup>17</sup>.

En este trabajo, se observó que la expresión de Adrb3 en el TAI de los ODX fue dependiente de la temperatura externa. Mientras que la expresión de Adrb3 de ratas ODX-RT mostró una tendencia al aumento en comparación con CTR-RT, la expresión de Adrb3 de ratas ODX-C disminuyó a niveles del control. Por otro lado, no se encontraron diferencias significativas en los niveles de ARNm de Adrb3 de TARP. A pesar de esto, se observó un aumento considerable en la expresión génica y proteica de UCP1 en ambos depósitos. Con respecto al rol de los receptores adrenérgicos, se ha informado que la respuesta termogénica del TAP y del TAI de los ratones ADRB3-KO fue similar a la de los ratones salvajes, sin cambios en la expresión de Adrb1 tanto durante la exposición al frío durante períodos agudos y

crónicos<sup>59</sup>. Sin embargo, los ratones ADRB1-KO con una dieta alta en grasas tienen una respuesta al frío alterada y un aumento de la adiposidad<sup>252</sup>. Estas observaciones indican que el papel del receptor adrenérgico en la termogénesis debería requerir una investigación más profunda.

Desde hace muchos años se conoce la existencia del ADRB3 en humanos<sup>253</sup>. En pos de estimular la actividad termogénica mediada por este receptor, se ha estudiado la función del agonista mirabegron, utilizado para el tratamiento de pacientes con vejiga hiperactiva<sup>254</sup>. En este sentido, se comprobó que 10 mg/día durante 10 días de mirabegron en humanos induce un incremento en los niveles de UCP1<sup>255</sup> y mejora parámetros relacionados con la homeostasis de la glucosa en obesos<sup>256</sup>. Hallazgos similares fueron encontrados en roedores tratados con este compuesto<sup>257</sup>.

Sin embargo, se debe tener en cuenta que en humanos los niveles de expresión de este receptor en el TA son menores en comparación con los roedores<sup>258</sup> y por lo tanto podrían ser menos sensibles a los efectos de agonistas.

Asimismo, se ha estudiado el efecto de los andrógenos sobre los receptores adrenérgicos. Mientras que el tratamiento con testosterona en hámsters incrementó los niveles de ADRA2<sup>259-261</sup> en ratas se registró un aumento en los receptores adrenérgicos beta<sup>153</sup>. Por otro lado, se encontró una mayor respuesta ante la lipólisis en ratones hembras que en macho debido a su mayor contenido de ARB3<sup>64</sup> lo cual indicaría una relación entre el perfil de hormonas sexuales y este tipo de receptor.

Por otro lado, se analizaron los niveles de expresión de PPARg, debido a su rol fundamental en la adipogénesis de los tres tipos de adipocitos y a que su inducción incrementa los valores de UCP1<sup>262</sup>. No se encontraron cambios significativos a nivel del ARNm, pero se observó una tendencia al incremento tanto en el TAI ( $p=0.0847$ ) como en el TARP ( $p=0.0504$ ) de los animales castrados, independientemente de la temperatura en la cual se encontraban. Sin embargo, en esta determinación no se discernió entre la contribución citoplasmática y nuclear sobre el contenido total de PPARg. Por otro lado, durante la exposición al frío la expresión de Pparg del TAB de ratas decrece en las primeras 5 h pero hacia el día 21 retorna a los valores iniciales<sup>263</sup>. Además, en el TAB de ratones, la exposición aguda (3 h) aumenta Pparg mientras que la exposición crónica (7 d) no produce efectos<sup>264</sup>.

Asimismo, debido al rol importante que tienen las mitocondrias en el *browning* del TAB se evaluaron los niveles proteicos de CYT C, una proteína ubicada en el espacio intermembrana de las mitocondrias que interviene en el transporte de electrones durante la respiración mitocondrial<sup>265</sup>. En el TAE de animales sometidos a HFD se registró una disminución en los niveles proteicos de CYT C y de otros constituyentes de la cadena respiratoria<sup>266</sup>. En este caso, el contenido de esta proteína se incrementó en el TARP de ratas castradas de manera independiente a la temperatura externa. En ratas se ha demostrado que el TAE posee una mayor actividad de enzimas mitocondriales y un mayor incremento en la respiración estimulada por noradrenalina con respecto al TAI<sup>267</sup>. Hallazgos similares se registraron en humanos, es decir, el TA visceral resultó tener mayor actividad en la fosforilación oxidativa que el TA subcutáneo<sup>268</sup>.

Entre las funciones de PGC1a se encuentra la activación de TFAM para promover la biogénesis mitocondrial. En esta dirección, la transducción de adipocitos humanos con Pgc1a incrementó la expresión de Cyt C<sup>268</sup>. Como se menciona anteriormente, este marcador estuvo elevado en los depósitos de TAB de animales ODX mantenidos en condiciones basales (sección 1) y en condiciones estimuladas (sección 2) por lo cual el incremento en los niveles proteicos de CYT C pueda deberse a una estimulación en la generación de mitocondrias, con actividad termogénica debido al aumento en la cantidad de Ucp1. De esta manera, los mayores cambios a favor de la termogénesis se observaron en el TARP de los animales ODX.

Por lo tanto, la depleción prepuberal favorece la inducción del *browning* ocasionada por bajas temperaturas, modificando el tamaño adipocitario y la expresión de marcadores importantes para desencadenar el proceso termogénico.

En los últimos años, las investigaciones en el campo de la termogénesis del TAB se han enfocado en los mecanismos que gobiernan la desactivación de los adipocitos beige una vez que el estímulo cesa. En esta dirección, la inhibición de la mitofagia podría ser un blanco farmacológico interesante para contrarrestar el *whitening* del TAB y de esta manera retener el fenotipo adipocitario beige.

Como una aproximación al estudio de la mitofagia, aquí se evaluaron marcadores relacionados con este proceso. Así, al comparar la expresión entre diferentes depósitos de animales controles se pudo hallar que la expresión de Ulk1 y

Pink1 descendieron en el TARP a temperatura ambiente y además descendieron en el TAI con la exposición al frío. Atg7 fue menor en el TARP independientemente de la temperatura mientras que Atg12 no presentó cambios. Esto indicaría que el depósito visceral sería menos proclive al desencadenamiento de la mitofagia y explicaría, al menos en parte, por qué se encuentran mayores niveles de Ucp1 en este tipo de depósito frente a un estímulo termogénico.

En el TAI de animales ODX, se encontró que Ulk1, Pink1 y Atg12 descendieron con la castración y la exposición al frío y Atg7 solo con el descenso de la temperatura. En tanto que en el TARP Ulk1, Atg7 y Atg12 respondieron de manera diferencial según la temperatura externa, es decir, a temperatura ambiente hubo un descenso en la expresión de dichos marcadores en los ODX, pero en estos animales el frío incrementó Ulk1 y Atg7. Esto resultó llamativo ya que se esperaría que ante la inducción del *browning* los marcadores se encuentren descendidos.

Sin embargo, la exposición al frío es capaz de alterar el estado oxidativo en varios órganos<sup>269</sup>. En el TAP se comprobó que la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) resultó ser relevante para la activación, mediante oxidación de la cisteína ubicada en la posición 253, de UCP1<sup>270</sup>. También se demostró que la producción de ROS durante la exposición al frío promueve el recambio mitocondrial a través de la activación de la mitofagia y de la biogénesis de dichas organelas<sup>271</sup>. A pesar de esta estimulación paradójica de la mitofagia, el resultado final continúa siendo un incremento neto en la cantidad de mitocondrias no dañadas. Por lo tanto, con los resultados de esta tesis se podría inferir que la elevación de la transcripción de genes relacionados con la mitofagia en el TARP de los animales castrados expuestos al frío podría ser producto de una mayor actividad termogénica dado por un aumento en Ucp1 en este tejido que ocasiona una mayor regulación de posibles mitocondrias dañadas. Aún así, el resultado sería un aumento en la biogénesis mitocondrial ya que Pgc1a se encontró elevado en este depósito.

### *5.6. Los andrógenos in vitro reprimen el linaje adipocitario beige*

Con el fin de corroborar que los andrógenos son los encargados de reducir la termogénesis basal y estimulada por frío, se desarrollaron cultivos con CPAs

provenientes de animales CTR y se las cultivó en diferentes momentos del proceso de diferenciación con dichas hormonas esteroideas.

En primer lugar, los cultivos de las células con testosterona y dihidrotestosterona se realizaron durante 8 días posteriores al momento de confluencia. Como se mencionó más arriba, las mitocondrias juegan un papel relevante en la funcionalidad de los adipocitos beige. De esta manera, en las células tratadas con testosterona se detectó una disminución en el número de las mitocondrias dada por una reducción en el contenido de ADN mitocondrial y además descendió la expresión de Cox8b que participa en la cadena de transporte de electrones dentro de las mitocondrias. Curiosamente, se demostró que AR se localiza en las mitocondrias de células LNCaP y decrece los niveles del factor de transcripción mitocondrial A (TFAM) de manera que reduce el contenido de ADNmt y la función mitocondrial en dichas células<sup>272</sup>. Además, se comprobó que las hembras poseen un TAI enriquecido en ADNmt comparado con machos lo cual se acompañó por un incremento en la expresión de genes mitocondriales de la fosforilación oxidativa<sup>273</sup>.

En general, estos resultados sugieren que la testosterona podría inhibir la biogénesis mitocondrial y/o incrementar la promoción de la degradación de estas organelas contribuyendo a una menor actividad termogénica.

En línea con la hipótesis planteada en este trabajo, la incubación con los andrógenos redujo de manera significativa la inducción mediada por FSK en la expresión de Ucp1, Pgc1a y Prdm16 y por lo tanto resultaría en una menor capacidad termogénica. Dicho efecto fue registrado para ambos tipos de depósitos. En este sentido, se observó que la adición de testosterona a un cultivo primario de adipocitos pardos disminuyó la expresión de Ucp1 inducida por noradrenalina de manera dosis-dependiente<sup>172</sup>. Además de la expresión de Ucp1, la diferenciación en adipocitos termogénicos está sincronizada con la biogénesis mitocondrial. Este proceso es llevado a cabo por Pgc1a/b, que actúa en conjunto con el factor respiratorio nuclear 1 y 2 (Nrf 1/2) para regular al aumento de Tfam y finalmente conduce a aumentar el número de mitocondrias<sup>274</sup>. Se ha descrito que la testosterona disminuye la expresión de Cox4, Pgc1b y Gabpa y la actividad Citrato sintasa en células 3T3L-1, sin cambios en Pgc1a<sup>275</sup>. Por el contrario, dicha hormona disminuyó los niveles de ARNm de Pgc1a en cultivos de adipocitos pardos<sup>276</sup>. Además, se ha comprobado que el tratamiento con DHT disminuye la respiración

mitocondrial en una línea celular adiposa parda inmortalizada de ratón<sup>277</sup>. Sin embargo, se ha demostrado que la testosterona promovió la expresión de Tfam en preadipocitos de cerdo<sup>278</sup>, a pesar de la inhibición de la adipogénesis.

En esta tesis se comprobó que la inhibición de la testosterona sobre los adipocitos beige fue revertida por la co-incubación con un antagonista del Ar, flutamida. De manera similar el andrógeno no aromatizable, dihidrotestosterona, produjo un efecto similar al de la testosterona.

Se sabe que los depósitos viscerales presentan mayor capacidad oxidativa que los subcutáneos. Además, los resultados de las comparaciones entre los niveles de expresión de TAI y TARP demostraron que este último depósito presentó mayores incrementos de Ucp1 bajo condiciones estimuladas. Es por ello que el análisis funcional del consumo de oxígeno se realizó únicamente sobre el depósito visceral. En esta tesis se reporta que la incubación con testosterona altera parámetros relacionados con la actividad mitocondrial y por lo tanto, esto provocaría una respuesta a la inducción de la termogénesis alterada.

En consecuencia, el contenido de mitocondrias de los adipocitos tratados con testosterona parecía ser menor, tal como se muestra en las fotomicrografías de TEM. En general, nuestros resultados sugieren que los andrógenos inhiben la biogénesis y la actividad mitocondriales contribuyendo a la menor actividad termogénica.

Los andrógenos actúan a través de su unión al Ar, que pertenece a la superfamilia de receptores nucleares. Informes anteriores mostraron que el antagonista de Ar, flutamida, revirtió el efecto inhibitor de testosterona y de dihidrotestosterona sobre el compromiso y las etapas tempranas de la diferenciación de células madre de adipocitos humanos, principalmente al prevenir el descenso dependiente de BMP4 de C/EBPa/b y Pparg<sup>146</sup>. En el presente trabajo se demostró que la flutamida bloqueó el efecto inhibitor de la testosterona sobre las expresiones de Ucp1, Pgc1a y Prdm16 en adipocitos beige, de manera similar a lo encontrado previamente en cultivo de adipocitos pardos<sup>172</sup>, lo que indica un mecanismo dependiente de Ar. En este sentido, se han descrito elementos de respuesta del receptor de esteroides (TGTTCT) en la secuencia del promotor Ucp1 en adipocitos 3T3-L1. Un ensayo de luciferasa dual no reveló ningún efecto de DHT sobre el promotor Ucp1 en ausencia de Ar, pero sí una activación en su presencia<sup>177</sup>.

Estudios adicionales deben realizarse para evaluar los efectos no genómicos de los andrógenos, dado que la flutamida no inhibe la vía no clásica de Ar<sup>279,280</sup>.

En resumen, se ha informado que los andrógenos inhiben la diferenciación de adipocitos hacia el linaje adipocitario blanco<sup>281</sup>. Los datos presentados aquí indican que este efecto podría extenderse al linaje de adipocitos beige. Por otro lado, varios estudios han sugerido que las mujeres tienen un mayor potencial para activar el *browning* del TAB<sup>231</sup> y una mayor termogénesis adaptativa en TAP que los hombres de la misma edad<sup>282</sup>.

Como se menciona en la introducción, la adipogénesis consta de dos etapas secuenciales llamadas determinación y diferenciación terminal. En virtud de verificar si los andrógenos modificaban alguno o ambos pasos de la generación de adipocitos beige, se desarrollaron cultivos con testosterona durante cada etapa.

En este sentido, la testosterona agregada sobre adipocitos beige maduros redujo los niveles de marcadores termogénicos en condiciones estimuladas en ambos tipos de depósitos de TAB, de manera similar a lo hallado durante los 8 días de incubación. Sin embargo, como en este experimento la incubación se realizó sobre adipocitos maduros se podría inferir que la testosterona podría promover el estado de adipocitos durmientes impidiendo la transcripción de genes termogénicos ante un estímulo externo.

Por otro lado, el tratamiento en las CPAs reduce la expresión de marcadores de precursores de adipocitos beige. Por lo tanto, lo observado *in vivo* a nivel tisular en los animales ODX podría ser resultado de la contribución de la desinhibición androgénica en la actividad termogénica de adipocitos maduros y en la proliferación adipocitaria hacia el linaje beige, de modo tal que ante un inductor del *browning* estas CPAs sensibles sean capaces de originar nuevos adipocitos beige.

Se ha propuesto que el balance *Pdgfra/Pdgfrb* tiene un rol relevante en la diferenciación hacia adipocitos beige o blancos, de acuerdo a si hay un incremento en de uno con respecto al otro<sup>80</sup>. Asimismo, en ratones la expresión de *Pdgfrb* predomina en el TAB visceral lo cual explicaría en parte su mayor resistencia al *browning*<sup>80</sup>. Cabe remarcar que los niveles de PDGFRs decrecen durante el proceso de diferenciación<sup>283</sup>. A pesar de tener un rol bipotencial en la formación de adipocitos beige y blancos, se observó que en el contexto de agentes estimuladores

del *browning*, las CPAs Pdgrfa<sup>+</sup> generan adipocitos beige<sup>230,284</sup>. En este trabajo, se comprobó que la testosterona *in vitro* reduce los marcadores de expresión de células precursoras beige y si esto también ocurriera *in vivo* demostraría que los andrógenos disminuirían el pool de precursores beige. Por lo tanto, la ausencia de andrógenos *in vivo* podría generar un nicho favorable para la proliferación de adipocitos termogénicos.

Asimismo, se sabe que los andrógenos inhiben la adipogénesis del linaje blanco<sup>146</sup>, principalmente regulando la función de Pparg de forma indirecta vía catenina Wnt B<sup>142</sup> o directamente a través del motivo de interacción LXXLL del co-activador ARA 70<sup>147</sup>. Recientemente, se halló que PPARg es más activo en las células precursoras del TAI de hembras con respecto a las de machos<sup>285</sup>. Pparg también es un regulador de adipogénesis beige<sup>286,287</sup>, este efecto inhibitorio posiblemente podría extenderse a los precursores de adipocitos beige. Apoyando esta hipótesis, se ha informado de varios perfiles compartidos y selectivos de sitios de unión de Pparg entre adipocitos blancos y pardos<sup>48,288</sup>. Sin embargo, se necesitan más estudios para confirmar y validar esta hipótesis. Prdm16 es otro factor de transcripción necesario en las células adiposas subcutáneas maduras para la activación completa de un programa génico similar al TAP, que incluye la expresión de Ucp1 y Pgc1a<sup>43</sup>. También es responsable de la determinación y diferenciación de las células beige<sup>289</sup>. Este marcador también fue inhibido en las CPAs cultivadas con testosterona.

Nosotros encontramos que la exposición al frío induce un incremento en la expresión de marcadores de adipocitos beige tanto en el TAI como en el TARP de animales castrados. Sin embargo, aún queda por ver la contribución de los procesos de adipogénesis y de transdiferenciación (o adipocitos durmientes) en la formación de estas células en cada TA ya que se ha visto que el reclutamiento de adipocitos beige es depósito-dependiente<sup>78</sup>

En esta tesis, nosotros encontramos que las CPAs provenientes de animales castrados se diferencian en mayor medida hacia adipocitos beige. Incluso, el agregado de testosterona *in vitro* reduce los marcadores de precursores de adipocitos beige.

Poco se conoce acerca de los efectos de estas hormonas sobre el *browning* del TA. Se ha demostrado que en monos no humanos, la castración induce la aparición

de adipocitos multivacuolares pero no se detectaron cambios en la expresión de genes termogénicos<sup>290</sup>. Se ha encontrado que en ratones castrados se reduce la masa del TAE acompañado por un descenso en el tamaño de los adipocitos y un incremento en la lipolisis<sup>183</sup>. En un reporte reciente describen que la activación del receptor de estrógenos alpha (Era) tanto en la línea celular 3T3-L1 como en un cultivo primario de adipocitos incrementa los niveles de UCP1<sup>291</sup>. Paradójicamente, se ha comprobado que la exposición al frío de ratones hembras castradas induce el incremento de la capacidad termogénica inducida por el *browning* del TA<sup>292</sup>.

Varios trabajos demostraron la compleja regulación de la termogénesis en los adipocitos beige, sin embargo, el papel de los andrógenos en el contexto del *browning* del TAB ha sido poco estudiado. En este trabajo, hemos demostrado que las ratas deficientes en andrógenos desarrollaron depósitos de TAB con una capacidad termogénica mejorada tanto en condiciones basales como estimuladas por frío. De acuerdo a esto, los andrógenos *in vitro* inhibieron el programa termogénico en el TAI y TARP, a través de un mecanismo dependiente de Ar.

Este hecho representa otra condición desfavorable para la funcionalidad del TAB en hombres en comparación con las mujeres. Asimismo, en el síndrome de ovario poliquístico (SOP), caracterizado por hiperandrogenismo, los niveles de testosterona se correlacionan inversamente con la actividad de TAP<sup>175</sup>, y se ha informado una expresión más baja de Ucp1, del consumo de O<sub>2</sub> y de marcadores funcionales mitocondriales<sup>174,293</sup>. En esta patología, la acción inhibitoria de los andrógenos en la termogénesis del TAB puede contribuir a un menor gasto energético, favoreciendo el fenotipo de obesidad asociado al SOP.

### 5.7. Limitaciones del estudio

En este trabajo nosotros estudiamos el efecto de la castración sobre el *browning* en animales jóvenes pero no se evaluó el impacto que la depleción de andrógenos podría llegar a tener en animales de mayor edad. Conocer esto nos permitiría evaluar si la estimulación del *browning* perdura más allá de la etapa estudiada aquí. Asimismo, en el futuro debería investigarse la respuesta de los animales ODX sometidos a una HFD para corroborar los efectos benéficos del *browning* en

condiciones de un balance energético positivo. Adicionalmente, llevar a cabo pruebas de tolerancia a la glucosa oral y de insulina permitiría conocer si en este modelo hay alteraciones, ya sea en beneficio o en perjuicio de la homeostasis de la glucosa.

Por otro lado, los efectos *in vivo* de la depleción de andrógenos podrían ser corroborados con una terapia de reemplazo hormonal, es decir, a través de la suplementación de los andrógenos. Con una metodología similar podría estudiarse el rol de los andrógenos sobre el *browning* en ratas hembras y por comparación con los estudios aquí realizados podríamos concluir si el efecto de estas hormonas es o no dependiente del sexo genético.

En esta tesis, se realizó una primera aproximación sobre los efectos de los andrógenos en la mitofagia y el control del *browning*. Sin embargo, esto requiere de una investigación más profunda para conocer el verdadero rol de los andrógenos sobre el *whitening* del TAB. Otra limitación de esta tesis se debe a la falta de ensayos de calorimetría para verificar el efecto de la depleción de andrógenos *in vivo* sobre el gasto energético total para conocer la contribución del *browning* sobre dichos valores.

Asimismo, al momento de extrapolar los resultados obtenidos en animales de laboratorio se debe tener en cuenta que en humanos aproximadamente el 10% de los adipocitos son renovados por año<sup>294</sup> mientras que en ratones el recambio diario de células oscila entre un 1.8 a 5.7 %<sup>295</sup>.

Por último, en este trabajo las castraciones fueron realizadas en etapas de desarrollo y por lo tanto hay una limitación en la implicación directa en humanos ya que el descenso de los andrógenos en individuos sanos ocurre durante el envejecimiento.

## *6. Conclusiones*



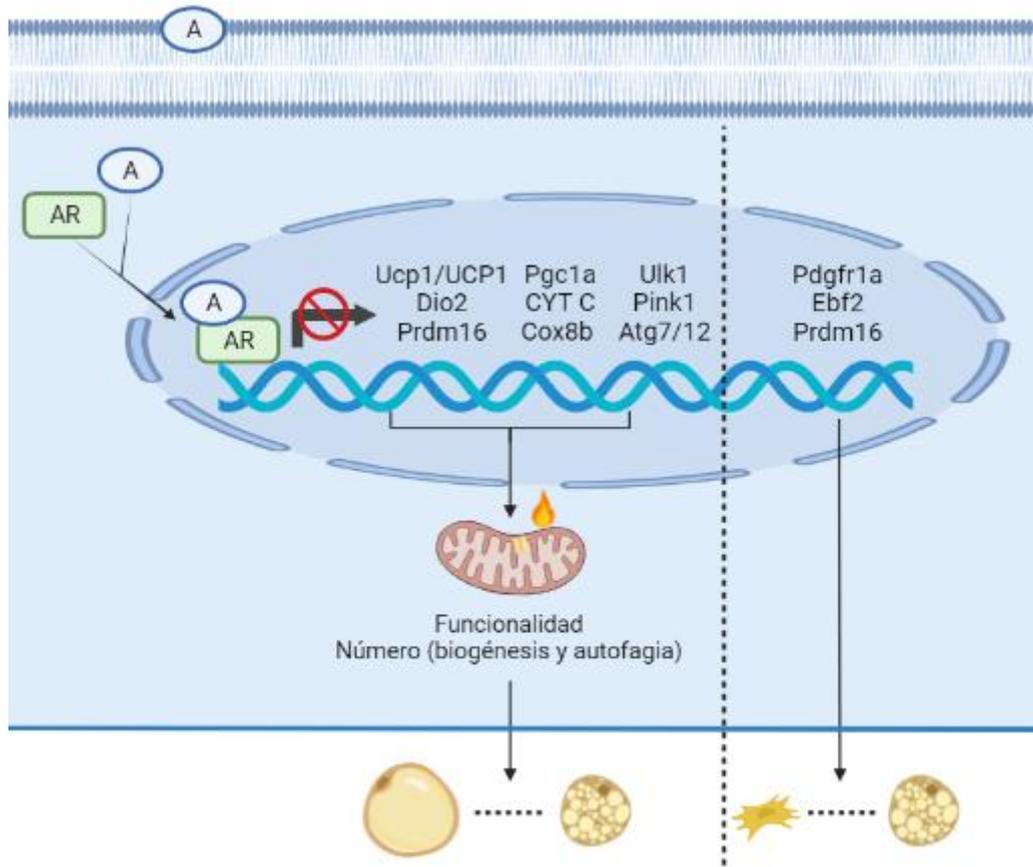
En esta tesis doctoral caracterizamos por primera vez los efectos de la depleción de andrógenos en estadios prepuberales en la termogénesis basal y estimulada por frío de dos tipos de depósitos de TAB. Además, estas acciones se confirmaron utilizando cultivos primarios de adipocitos diferenciados *in vitro* y en CPAs.

En conclusión, los resultados presentados nos indican que:

- La depleción de andrógenos en ratas macho en estadio prepuberal generó cambios metabólicos acompañados de una reducción en la ingesta calórica y en el aumento del peso corporal. Además, redujo tanto el peso porcentual del TARP como el tamaño de los adipocitos de dicho tejido.
- La depleción de andrógenos indujo un aumento en la expresión de marcadores termogénicos tanto a nivel tisular como en las CPAs diferenciadas *in vitro*, sugiriendo una mayor capacidad de *browning* en los animales ODX. Asimismo, el TARP resultó ser más sensible al frío que el TAI.
- La exposición al frío incrementó la expresión de marcadores termogénicos en los animales castrados junto con cambios en la transcripción genes involucrados en la mitofagia.
- Los andrógenos generaron una inhibición en la actividad termogénica de los adipocitos beige diferenciados *in vitro*, efecto que fue mediado por el receptor de andrógenos.

En conjunto, estos resultados mostraron que los andrógenos modulan el programa termogénico de los adipocitos beige provenientes de dos depósitos de TA, modulando la capacidad de *browning* de TAB.

En conclusión, nuestros resultados demuestran la importancia de las hormonas esteroides sexuales en la regulación de la termogénesis del TAB, sugiriendo una posible desventaja metabólica en hombres debido a un efecto inhibitorio del *browning* por parte de los andrógenos.



**Figura 37. Representación de los resultados aportados por la presente tesis doctoral.** En esta figura se muestra el efecto de los andrógenos (A) mediado por su receptor correspondiente (AR). Esta interacción conduciría a la translocación del complejo hormona-receptor al núcleo donde conduciría a efectos genómicos y cambios transcripcionales en el núcleo de adipocitos maduros o en células precursoras de adipocitos (separado por línea de puntos). En el primer caso, esto resultará en alteraciones en la funcionalidad y en el número de mitocondrias que reducirían la capacidad termogénica de los adipocitos en condiciones basales, y estimuladas en frío con un descenso en el *browning*. Por otro lado, los andrógenos reducen la expresión de marcadores relacionados con el linaje adipocitario beige, impidiendo en última instancia la adipogénesis beige.

# 7. *Bibliografía*



1. Thiagarajan, P. S. & Reizes, O. *Adipose Tissue-Derived Stem Cells in Regenerative Medicine and Impact on Cancer. Cancer Stem Cells: Targeting the Roots of Cancer, Seeds of Metastasis, and Sources of Therapy Resistance* (Elsevier Inc., 2016). doi:10.1016/B978-0-12-803892-5.00016-4.
2. 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**, 619–629 (2012).
3. Erin E. Kershaw, Jonathan K. Hamm, Linda A.W. Verhagen, Odile Peroni, Masa Katic, and J. S. F. Adipose Triglyceride Lipase: Function, Regulation by Insulin, and Comparison With Adiponutrin. *Diabetes* **23**, 1–7 (2006).
4. 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).
5. Galsgaard, K. D., Pedersen, J., Knop, F. K., Holst, J. J. & Albrechtsen, N. J. W. Glucagon receptor signaling and lipid metabolism. *Front. Physiol.* **10**, 1–11 (2019).
6. Nogueiras, R., Tschöp, M. H. & Zigman, J. M. Central nervous system regulation of energy metabolism: Ghrelin versus leptin. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1126**, 14–19 (2008).
7. Polito, R. *et al.* The Important Role of Adiponectin and Orexin-A, Two Key Proteins Improving Healthy Status: Focus on Physical Activity. *Front. Physiol.* **11**, 1–17 (2020).
8. Davoudi-Kiakalayeh, A., Mohammadi, R., Pourfathollah, A. A., Siery, Z. & Davoudi-Kiakalayeh, S. Adiponectin: Role in Physiology and Pathophysiology Abstract. *Int. J. Prev. Med.* **8**, (2017).
9. Moon, B., Kwan, J. J. M., Duddy, N., Sweeney, G. & Begum, N. Resistin inhibits glucose uptake in L6 cells independently of changes in insulin signaling and GLUT4 translocation. *Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab.* **285**, 106–115 (2003).
10. Liang, X. *et al.* Plasminogen activator inhibitor-1 modulates adipocyte differentiation. *Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab.* **290**, 103–113 (2006).
11. Wellen, K. E. & Hotamisligil, G. S. Inflammation, stress, and diabetes. *J. Clin. Invest.* **115**, 1111–1119 (2005).
12. Rich. 基因的改变NIH Public Access. *Bone* **23**, 1–7 (2009).
13. Sharon Lim , Jennifer Honek, and Y. C. Blood Vessels in White and Brown Adipose Tissues. *Ann. Endocrinol. (Paris)*. **63**, 91–95 (2002).
14. Morrison, S. F. & Madden, C. J. Central nervous system regulation of brown adipose tissue. *Compr. Physiol.* **4**, 1677–1713 (2014).
15. Ahmad, B. *et al.* Brown/Beige adipose tissues and the emerging role of their secretory factors in improving metabolic health: The batokines. *Biochimie* **184**, 26–39 (2021).
16. Labbé, S. M. *et al.* Metabolic activity of brown, “beige,” and white adipose tissues in response to chronic adrenergic stimulation in male mice. *Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab.* **311**, E260–E268 (2016).
17. 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**, 1–5 (2017).

18. Lehnig, A. C. *et al.* Exercise Training Induces Depot-Specific Adaptations to White and Brown Adipose Tissue. *iScience* **11**, 425–439 (2019).
19. Queathem, E. D. *et al.* White adipose tissue depots respond to chronic beta-3 adrenergic receptor activation in a sexually dimorphic and depot divergent manner. *Cells* **10**, (2021).
20. Dandona, P., Aljada, A. & Bandyopadhyay, A. Inflammation: The link between insulin resistance, obesity and diabetes. *Trends Immunol.* **25**, 4–7 (2004).
21. Hammarstedt, A., Gogg, S., Hedjazifar, S., Nerstedt, A. & Smith, U. Impaired adipogenesis and dysfunctional adipose tissue in human hypertrophic obesity. *Physiol. Rev.* **98**, 1911–1941 (2018).
22. Wang, J. *et al.* Leptin Promotes White Adipocyte Browning by Inhibiting the Hh Signaling Pathway. *Cells* **8**, 372 (2019).
23. Liu, H. M., Wang, C. H., Chang, Z. Y., Huang, T. H. & Lee, T. Y. Losartan attenuates insulin resistance and regulates browning phenomenon of white adipose tissue in ob/ob mice. *Curr. Issues Mol. Biol.* **43**, 1828–1843 (2021).
24. Maharjan, B. R., McLennan, S. V., Yee, C., Twigg, S. M. & Williams, P. F. The effect of a sustained high-fat diet on the metabolism of white and brown adipose tissue and its impact on insulin resistance: a selected time point cross-sectional study. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, (2021).
25. Anne-Laure Poher, Christelle Veyrat-Durebex, Jordi Altirriba, Xavier Montet, Didier J. Colin, Aurélie Caillon, Jacqueline Lyautey, F. R.-J. Ectopic UCP1 overexpression in white adipose tissue improves insulin sensitivity in Lou/C rats, a model of obesity resistance. 1–39 (2014).
26. Mössenböck, K. *et al.* Browning of white adipose tissue uncouples glucose uptake from insulin signaling. *PLoS One* **9**, (2014).
27. Lim, J. *et al.* Depot-specific UCP1 expression in human white adipose tissue and its association with obesity-related markers. *Int. J. Obes.* **44**, 697–706 (2020).
28. Distel, E. *et al.* Early induction of a brown-like phenotype by rosiglitazone in the epicardial adipose tissue of fatty Zucker rats. *Biochimie* **94**, 1660–1667 (2012).
29. Dozio, E. *et al.* Epicardial adipose tissue GLP-1 receptor is associated with genes involved in fatty acid oxidation and white-to-brown fat differentiation: A target to modulate cardiovascular risk? *Int. J. Cardiol.* **292**, 218–224 (2019).
30. Sacks, H. S. *et al.* Adult epicardial fat exhibits beige features. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **98**, 1448–1455 (2013).
31. Moon, H. *et al.* Brite Adipocyte FGF21 Attenuates Cardiac Modulating NRF2. (2022).
32. Zhao, J. *et al.* Hepatocyte TGF- $\beta$  Signaling Inhibiting WAT Browning to Promote NAFLD and Obesity Is Associated With Let-7b-5p. *Hepatology Commun.* **0**, 1–21 (2022).
33. Kataoka, N. *et al.* Lack of UCP1 stimulates fatty liver but mediates UCP1-independent action of beige fat to improve hyperlipidemia in Apoe knockout mice. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* **1866**, 165762 (2020).
34. Khalafi, M. *et al.* The impact of moderate-intensity continuous or high-intensity interval training on adipogenesis and browning of subcutaneous adipose tissue in obese male rats. *Nutrients* **12**, (2020).

35. Norheim, F. *et al.* The effects of acute and chronic exercise on PGC-1 $\alpha$ , irisin and browning of subcutaneous adipose tissue in humans. *FEBS J.* **281**, 739–749 (2014).
36. Zhang, K. *et al.* Molecular Mechanism of Stem Cell Differentiation into Adipocytes and Adipocyte Differentiation of Malignant Tumor. *Stem Cells Int.* **2020**, (2020).
37. Audano, M. *et al.* Regulatory mechanisms of the early phase of white adipocyte differentiation: an overview. *Cell. Mol. Life Sci.* **79**, (2022).
38. Brun, R. P. *et al.* Differential activation of adipogenesis by multiple PPAR isoforms. *Genes Dev.* **10**, 974–984 (1996).
39. Tyagi, S., Gupta, P., Saini, A., Kaushal, C. & Sharma, S. The peroxisome proliferator-activated receptor: A family of nuclear receptors role in various diseases. *J. Adv. Pharm. Technol. Res.* **2**, 236–240 (2011).
40. Petrovic, N. *et al.* Chronic peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) activation of epididymally derived white adipocyte cultures reveals a population of thermogenically competent, UCP1-containing adipocytes molecularly distinct from classic brown adipocytes. *J. Biol. Chem.* **285**, 7153–7164 (2010).
41. Bartesaghi, S. *et al.* Thermogenic activity of UCP1 in human white fat-derived beige adipocytes. *Mol. Endocrinol.* **29**, 130–139 (2015).
42. Yamasaki. PPAR agonists induce a white-to-brown fat conversion through stabilization of PRDM16 protein. *Bone* **23**, 1–7 (2014).
43. Seale, P. *et al.* Prdm16 determines the thermogenic program of subcutaneous white adipose tissue in mice. *J. Clin. Invest.* **121**, 96–105 (2011).
44. Al, C. J. V. *et.* TLE3 is a dual function transcriptional coregulator of adipogenesis. *Bone* **23**, 1–7 (2011).
45. Al, C. J. V. *et.* Adipose subtype–selective recruitment of TLE3 or Prdm16 by PPAR $\gamma$  specifies lipid-storage versus thermogenic gene programs. **17**, 423–435 (2013).
46. Pearson, S. *et al.* Loss of TLE3 promotes the mitochondrial program in beige adipocytes and improves glucose metabolism. *Genes Dev.* **33**, 747–762 (2019).
47. Wang, W. *et al.* Ebf2 is a selective marker of brown and beige adipogenic precursor cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**, 14466–14471 (2014).
48. Jaiswal. EBF2 determines and maintains brown adipocyte identity. *Bone* **23**, 1–7 (2014).
49. Stine, R. R. *et al.* EBF2 promotes the recruitment of beige adipocytes in white adipose tissue. *Mol. Metab.* **5**, 57–65 (2016).
50. Shao, M. *et al.* Zfp423 Maintains White Adipocyte Identity through Suppression of the Beige Cell Thermogenic Gene Program. *Cell Metab.* **23**, 1167–1184 (2016).
51. Roh, H. C. *et al.* Warming Induces Significant Reprogramming of Beige, but Not Brown, Adipocyte Cellular Identity. *Cell Metab.* **27**, 1121-1137.e5 (2018).
52. Germack, R., Starzec, A. B., Vassy, R. & Perret, G. Y.  $\beta$ -Adrenoceptor subtype expression and function in rat white adipocytes. *Br. J. Pharmacol.* **120**, 201–210 (1997).
53. Lafontan, M. *et al.* Adrenergic regulation of adipocyte metabolism. *Hum. Reprod.* **12 Suppl 1**, 6–20 (1997).

54. Cassard-Doulcier, A. M. *et al.* Tissue-specific and  $\beta$ -adrenergic regulation of the mitochondrial uncoupling protein gene: Control by cis-acting elements in the 5'-flanking region. *Mol. Endocrinol.* **7**, 497–506 (1993).
55. Merlin, J. *et al.* The PPAR $\gamma$  agonist rosiglitazone promotes the induction of brite adipocytes, increasing  $\beta$ -adrenoceptor-mediated mitochondrial function and glucose uptake. *Cell. Signal.* **42**, 54–66 (2018).
56. Bloom, J. D. *et al.* Disodium (R,R)-5-[2-[[2-(3-Chlorophenyl)-2-hydroxyethyl]amino]propyl]-1,3-benzodioxole-2,2-dicarboxylate (cl 316,243). A Potent  $\beta$ -Adrenergic Agonist Virtually Specific for  $\beta$ 3 Receptors. A Promising Antidiabetic and Antiobesity Agent. *J. Med. Chem.* **35**, 3081–3084 (1992).
57. Li, Y. *et al.* Comparative Transcriptome Profiling of Cold Exposure and  $\beta$ 3-AR Agonist CL316,243-Induced Browning of White Fat. *Front. Physiol.* **12**, 1–14 (2021).
58. Warner, A. *et al.* Activation of  $\beta$ 3-adrenoceptors increases in vivo free fatty acid uptake and utilization in brown but not white fat depots in high-fat-fed rats. *Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab.* **311**, E901–E910 (2016).
59. de Jong, J. M. A. *et al.* The  $\beta$ 3-adrenergic receptor is dispensable for browning of adipose tissues. *Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab.* **312**, E508–E518 (2017).
60. Nailliw Z Preite, Bruna P P do Nascimento, Cynthia R Muller, Anna Laura V Américo, Talita S Higa, Fabiana S Evangelista, Carmen L Lancellotti, Felipe dos Santos Henriques, Miguel Luiz Batista Jr, A. C. B. and M. O. R. Disruption of beta3 adrenergic receptor increases susceptibility to DIO in mouse. *Physiol. Behav.* **176**, 139–148 (2017).
61. Susulic, V. S. *et al.* Targeted disruption of the  $\beta$ 3-adrenergic receptor gene. *J. Biol. Chem.* **270**, 29483–29492 (1995).
62. Mattsson, C. L. *et al.*  $\beta$ 1-adrenergic receptors increase UCP1 in human MADS brown adipocytes and rescue cold-acclimated  $\beta$ 3-adrenergic receptor knockout mice via nonshivering thermogenesis. *Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab.* **301**, 1108–1118 (2011).
63. Bronnikov, G., Houstek, J. & Nedergaard, J.  $\beta$ -Adrenergic, cAMP-mediated stimulation of proliferation of brown fat cells in primary culture: Mediation via  $\beta$ 1 but not via  $\beta$ 3 adrenoceptors. *J. Biol. Chem.* **267**, 2006–2013 (1992).
64. Soloveva, V., Graves, R. A., Rasenick, M. M., Spiegelman, B. M. & Ross, S. R. Transgenic mice overexpressing the  $\beta$ 1-adrenergic receptor in adipose tissue are resistant to obesity. *Mol. Endocrinol.* **11**, 27–38 (1997).
65. Puigserver, P. *et al.* A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis. *Cell* **92**, 829–839 (1998).
66. Fisher, F. F. *et al.* FGF21 regulates PGC-1 $\alpha$  and browning of white adipose tissues in adaptive thermogenesis. *Genes Dev.* **26**, 271–281 (2012).
67. Uldry, M. *et al.* Complementary action of the PGC-1 coactivators in mitochondrial biogenesis and brown fat differentiation. *Cell Metab.* **3**, 333–341 (2006).
68. Yao, L. *et al.* Cold-Inducible SIRT6 Regulates Thermogenesis of Brown and Beige Fat. *Cell Rep.* **20**, 641–654 (2017).

69. Zekri, Y., Flamant, F. & Gauthier, K. Central vs. Peripheral action of thyroid hormone in adaptive thermogenesis: A burning topic. *Cells* **10**, (2021).
70. Guilherme, A. *et al.* Control of Adipocyte Thermogenesis and Lipogenesis through  $\gamma$ 3-Adrenergic and Thyroid Hormone Signal Integration. **31**, (2020).
71. Ježek, P., Jabůrek, M. & Porter, R. K. Uncoupling mechanism and redox regulation of mitochondrial uncoupling protein 1 (UCP1). *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* **1860**, 259–269 (2019).
72. Macher, G. *et al.* Inhibition of mitochondrial UCP1 and UCP3 by purine nucleotides and phosphate. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1860**, 664–672 (2018).
73. Wu, J. *et al.* Beige adipocytes are a distinct type of thermogenic fat cell in mouse and human. *Cell* **150**, 366–76 (2012).
74. Mayeuf-Louchart, A. *et al.* Glycogen Dynamics Drives Lipid Droplet Biogenesis during Brown Adipocyte Differentiation. *Cell Rep.* **29**, 1410-1418.e6 (2019).
75. Reddy, N. L., Tan, B. K., Barber, T. M. & Randevara, H. S. Brown adipose tissue: Endocrine determinants of function and therapeutic manipulation as a novel treatment strategy for obesity. *BMC Obes.* **1**, 1–12 (2014).
76. Wang, Q. A., Scherer, P. E. & Gupta, R. K. Improved methodologies for the study of adipose biology: Insights gained and opportunities ahead. *J. Lipid Res.* **55**, 605–624 (2014).
77. 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).
78. Lee, Y.-H. *et al.* In vivo identification of bipotential adipocyte progenitors recruited by  $\beta$ 3-adrenoceptor activation and high-fat feeding. *Cell Metab.* **15**, 480–91 (2012).
79. Berry, R. & Rodeheffer, M. S. Characterization of the adipocyte cellular lineage in vivo. *Nat. Cell Biol.* **15**, 302–308 (2013).
80. Gao, Z., Daquinag, A. C., Su, F., Snyder, B. & Kolonin, M. G. PDGFR $\alpha$ /PDGFR $\beta$  signaling balance modulates progenitor cell differentiation into white and beige adipocytes. *Dev.* **145**, (2018).
81. Vishvanath, L. *et al.* Pdgfr $\beta$ <sup>+</sup> mural preadipocytes contribute to adipocyte hyperplasia induced by high-fat-diet feeding and prolonged cold exposure in adult mice. *Cell Metab.* **23**, 350–359 (2016).
82. Long, J. Z. *et al.* A smooth muscle-like origin for beige adipocytes. *Cell Metab.* **19**, 810–820 (2014).
83. Chen, Y. *et al.* Thermal stress induces glycolytic beige fat formation via a myogenic state. *Nature* **565**, 180–185 (2019).
84. Cousin, B. *et al.* Cellular changes during cold acclimatation in adipose tissues. *J. Cell. Physiol.* **167**, 285–289 (1996).
85. Cherqui, G., Cadot, M., Senault, C. & Portet, R. Cellularity and composition of epididymal adipose tissue from cold-acclimatized rats. *Experientia* **35**, 1353–1354 (1979).
86. 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**, (2000).

87. Murano, I., Zingaretti, C. M. & Cinti, S. The adipose organ of Sv129 mice contains a prevalence of brown adipocytes and shows plasticity after cold exposure. *Adipocytes* **1**, 121–130 (2005).
88. 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. *Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab.* **298**, 1244–1253 (2010).
89. Frontini, A. *et al.* White-to-brown transdifferentiation of omental adipocytes in patients affected by pheochromocytoma. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* **1831**, 950–959 (2013).
90. Wang, E. P. and B. Towards a Better Understanding of Beige Adipocyte Plasticity. *Towar. a Better Underst. Metonymy* 1–169 (2019) doi:10.3726/b13365.
91. Shao, M. *et al.* Cellular origins of beige fat cells revisited. *Diabetes* **68**, 1874–1885 (2019).
92. Rosenwald, M., Perdikari, A., Rülcke, T. & Wolfrum, C. Bi-directional interconversion of brite and white adipocytes. *Nat. Cell Biol.* **15**, 659–667 (2013).
93. 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).
94. Zhang, C. *et al.* Characterization and beige adipogenic potential of human embryo white adipose tissue-derived stem cells. *Cell. Physiol. Biochem.* **51**, 2900–2915 (2019).
95. Hoang, A. C., Yu, H. & Röszer, T. Transcriptional landscaping identifies a beige adipocyte depot in the newborn mouse. *Cells* **10**, (2021).
96. Yuwei Jiang, Daniel C. Berry, W. T. and J. M. G. Independent stem cell lineages regulate adipose organogenesis and adipose homeostasis. *Bone* **23**, 1–7 (2014).
97. Wang, Y. *et al.* Adipocyte liver kinase b1 suppresses beige adipocyte renaissance through class IIa histone deacetylase 4. *Diabetes* **66**, 2952–2963 (2017).
98. Lonçar, D., Afzelius, B. A. & Cannon, B. Epididymal white adipose tissue after cold stress in rats I. Nonmitochondrial changes. *J. Ultrastruct. Res. Mol. Struct. Res.* **101**, 109–122 (1988).
99. Lonçar, D., Afzelius, B. A. & Cannon, B. Epididymal white adipose tissue after cold stress in rats II. Nonmitochondrial changes. *J. Ultrastruct. Res. Mol. Struct. Res.* **101**, 109–122 (1988).
100. Granneman, J. G., Burnazi, M., Zhu, Z. & Schwamb, L. A. White adipose tissue contributes to UCP1-independent thermogenesis. *Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab.* **285**, 1230–1236 (2003).
101. Liu, X., Rossmeisl, M., McClaine, J. & Kozak, L. P. Paradoxical resistance to diet-induced obesity in UCP1-deficient mice. *J. Clin. Invest.* **111**, 399–407 (2003).
102. Golozoubova, V., Cannon, B. & Nedergaard, J. UCP1 is essential for adaptive adrenergic nonshivering thermogenesis. *Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab.* **291**, 350–357 (2006).
103. Kazak, L. *et al.* A Creatine-Driven Substrate Cycle Enhances Energy Expenditure and Thermogenesis in Beige Fat. *Cell* **163**, 643–655 (2015).
104. 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).
105. Ryan, C. R. *et al.* Creatine monohydrate supplementation increases white adipose tissue

- mitochondrial markers in male and female rats in a depot specific manner. *Nutrients* **13**, (2021).
106. Shaw, A. *et al.* Bmp7 increases ucp1-dependent and independent thermogenesis with a unique gene expression program in human neck area derived adipocytes. *Pharmaceuticals* **14**, (2021).
107. Ikeda, K. *et al.* UCP1-independent signaling involving SERCA2b-mediated calcium cycling regulates beige fat thermogenesis and systemic glucose homeostasis. *Nat. Med.* **23**, 1454–1465 (2017).
108. Lončar, D. Convertible adipose tissue in mice. *Cell Tissue Res.* **266**, 149–161 (1991).
109. Altshuler-Keylin, S. *et al.* Beige Adipocyte Maintenance Is Regulated by Autophagy-Induced Mitochondrial Clearance. *Cell Metab.* **24**, 402–419 (2016).
110. Hill, B. G. Insights into an adipocyte whitening program. *Adipocyte* **4**, 75–80 (2015).
111. Axe, E. L. *et al.* Autophagosome formation from membrane compartments enriched in phosphatidylinositol 3-phosphate and dynamically connected to the endoplasmic reticulum. *J. Cell Biol.* **182**, 685–701 (2008).
112. Turco, E., Fracchiolla, D. & Martens, S. Recruitment and Activation of the ULK1/Atg1 Kinase Complex in Selective Autophagy. *J. Mol. Biol.* **432**, 123–134 (2020).
113. Kim, B. W. *et al.* The C-terminal region of ATG101 bridges ULK1 and PtdIns3K complex in autophagy initiation. *Autophagy* **14**, 2104–2116 (2018).
114. Romanov, J. *et al.* Mechanism and functions of membrane binding by the Atg5-Atg12/Atg16 complex during autophagosome formation. *EMBO J.* **31**, 4304–4317 (2012).
115. Harada, K. *et al.* Two distinct mechanisms target the autophagy-related e3 complex to the pre-autophagosomal structure. *Elife* **8**, 1–17 (2019).
116. Peng, H. *et al.* Ubiquitylation of p62/sequestosome1 activates its autophagy receptor function and controls selective autophagy upon ubiquitin stress. *Cell Res.* **27**, 657–674 (2017).
117. Narendra, D. P. *et al.* PINK1 is selectively stabilized on impaired mitochondria to activate Parkin. *PLoS Biol.* **8**, (2010).
118. Hung, C. M. *et al.* AMPK/ULK1-mediated phosphorylation of Parkin ACT domain mediates an early step in mitophagy. *Sci. Adv.* **7**, 1–15 (2021).
119. Geisler, S. *et al.* PINK1/Parkin-mediated mitophagy is dependent on VDAC1 and p62/SQSTM1. *Nat. Cell Biol.* **12**, 119–131 (2010).
120. Kotzbeck, P. *et al.* Brown adipose tissue whitening leads to brown adipocyte death and adipose tissue inflammation. *J. Lipid Res.* **59**, 784–794 (2018).
121. Lu, X. *et al.* Mitophagy controls beige adipocyte maintenance through a Parkin-dependent and UCP1-independent mechanism. *Sci. Signal.* **11**, 1–10 (2018).
122. Cui, C. *et al.* PINK1-Parkin alleviates metabolic stress induced by obesity in adipose tissue and in 3T3-L1 preadipocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **498**, 445–452 (2018).
123. Szatmári-Tóth, M. *et al.* Thermogenic activation downregulates high mitophagy rate in human masked and mature beige adipocytes. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 1–21 (2020).
124. Singh, R. *et al.* Autophagy regulates adipose mass and differentiation in mice. *J. Clin. Invest.*

- 119, 3329–3339 (2009).
125. Zhang, Y. *et al.* Adipose-specific deletion of autophagy-related gene 7 (atg7) in mice reveals a role in adipogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 19860–19865 (2009).
  126. Settembre, C. *et al.* TFEB Links Autophagy to Lysosomal Biogenesis. *Science (80-. )*. **332**, 1429–1433 (2011).
  127. Sass, F. *et al.* TFEB deficiency attenuates mitochondrial degradation upon brown adipose tissue whitening at thermoneutrality. *Mol. Metab.* **47**, 101173 (2021).
  128. Adina Turcu, Joshua M. Smith, R. A. and W. E. R. Adrenal androgens and androgen precursors: definition, synthesis, regulation and physiologic actions. *Compr Physiol* **4**, 139–148 (2015).
  129. Rey, R. A. The role of androgen signaling in male sexual development at puberty. *Endocr. Soc.* **166**, bqaa215 (2021).
  130. BARRY R. ZIRKIN, ROSEMARY SANTULLI, CALEB A. AWONIYI, A. L. L. E. Maintenance of Advanced Spermatogenic Cells in the Adult Rat Testis: Quantitative Relationship to Testosterone Concentration within the Testis. *Endocrinology* **124**, 1217–1223 (1989).
  131. Baniahmad, A. & Hessenkemper, W. Chaperones for proper androgen action - a plethora of assistance to androgen receptor function. *Horm. Mol. Biol. Clin. Investig.* **11**, 321–328 (2012).
  132. Zoubeidi, A. *et al.* Cooperative interactions between androgen receptor (AR) and heat-shock protein 27 facilitate AR transcriptional activity. *Cancer Res.* **67**, 10455–10465 (2007).
  133. Georget, V., Térouanne, B., Nicolas, J. C. & Sultan, C. Mechanism of antiandrogen action: Key role of hsp90 in conformational change and transcriptional activity of the androgen receptor. *Biochemistry* **41**, 11824–11831 (2002).
  134. Davey, R. A. & Grossmann, M. Androgen Receptor Structure, Function and Biology: From Bench to Bedside. *Clin. Biochem. Rev.* **37**, 3–15 (2016).
  135. Grino, P. B., Griffin, J. E. & Wilson, J. D. Testosterone at high concentrations interacts with the human androgen receptor similarly to dihydrotestosterone. *Endocrinology* **126**, 1165–1172 (1990).
  136. Ojeda, S. R. & Skinner, M. K. Puberty in the rat. *Knobil Neill's Physiol. Reprod.* 2061–2126 (2006) doi:10.1016/B978-012515400-0/50043-9.
  137. Marty, M. S., Chapin, R. E., Parks, L. G. & Thorsrud, B. A. Development and Maturation of the Male Reproductive System. *Birth Defects Res. Part B - Dev. Reprod. Toxicol.* **68**, 125–136 (2003).
  138. Bell, M. R. Comparing postnatal development of gonadal hormones and associated social behaviors in rats, mice, and humans. *Endocrinology* **159**, 2596–2613 (2018).
  139. Tchernof, A. & Després, J. P. Pathophysiology of human visceral obesity: An update. *Physiol. Rev.* **93**, 359–404 (2013).
  140. Blouin, K. *et al.* Effects of androgens on adipocyte differentiation and adipose tissue explant metabolism in men and women. *Clin. Endocrinol. (Oxf)*. **72**, 176–188 (2010).
  141. Ibrahim, M. M. Subcutaneous and visceral adipose tissue: Structural and functional differences. *Obes. Rev.* **11**, 11–18 (2010).

142. Shahul S, Tung A, Minhaj M, Nizamuddin J, Wenger J, Mahmood E, Mueller A, Shaefi S, Scavone B, Kociol R D, Talmor D, Rana S, 2017. Testosterone Inhibits Adipogenic Differentiation in 3T3-L1 Cells: Nuclear Translocation of Androgen Receptor Complex with  $\beta$ -Catenin and T-Cell Factor 4 May Bypass Canonical Wnt Signaling to Down-Regulate Adipogenic Transcription Factors. *Physiol. Behav.* **176**, 139–148 (2017).
143. Singh, R., Artaza, J. N., Taylor, W. E., Gonzalez-Cadavid, N. F. & Bhasin, S. Androgens Stimulate Myogenic Differentiation and Inhibit Adipogenesis in C3H 10T1/2 Pluripotent Cells through an Androgen Receptor-Mediated Pathway. *Endocrinology* **144**, 5081–5088 (2003).
144. Rice, S. P. L. *et al.* Dehydroepiandrosterone (DHEA) treatment in vitro inhibits adipogenesis in human omental but not subcutaneous adipose tissue. *Mol. Cell. Endocrinol.* **320**, 51–57 (2010).
145. Huang, C. K. *et al.* Loss of androgen receptor promotes adipogenesis but suppresses osteogenesis in bone marrow stromal cells. *Stem Cell Res.* **11**, 938–950 (2013).
146. Frankenberg, E. Androgens inhibit adipogenesis during human adipose stem cell commitment to preadipocyte formation. *Bone* **23**, 1–7 (2012).
147. Heinlein, C. A., Ting, H. J., Yeh, S. & Chang, C. Identification of ARA70 as a ligand-enhanced coactivator for the peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$ . *J. Biol. Chem.* **274**, 16147–16152 (1999).
148. Jansen, J., Greither, T. & Behre, H. M. Androgen-regulated microRNAs (Andromirs) as novel players in adipogenesis. *Int. J. Mol. Sci.* **20**, (2019).
149. Ling, H. Y. *et al.* MicroRNA-375 promotes 3T3-L1 adipocyte differentiation through modulation of extracellular signal-regulated kinase signalling. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **38**, 239–246 (2011).
150. Kraus, M. *et al.* Inhibition of adipogenic differentiation of human SGBS preadipocytes by androgen-regulated microRNA miR-375. *Mol. Cell. Endocrinol.* **414**, 177–185 (2015).
151. Greither, T. *et al.* MiR-130a in the adipogenesis of human SGBS preadipocytes and its susceptibility to androgen regulation. *Adipocyte* **9**, 197–205 (2020).
152. Xu, X., Pergola, G. De & Bjorntorp, P. The effects of androgens on the regulation of lipolysis in adipose precursor cells. *Endocrinology* **126**, 1229–1234 (1990).
153. Xu, X., de Pergola, G. & Björntorp, P. Testosterone increases lipolysis and the number of  $\beta$ -adrenoceptors in male rat adipocytes. *Endocrinology* **128**, 379–382 (1991).
154. Bjorntorp, P. E. R. Postreceptor Events Involved in the Up-Regulation of  $\beta$ -Adrenergic Receptor Mediated Lipolysis by Testosterone in Rat White Adipocytes. **132**, (2015).
155. Bolduc, C. *et al.* Effects of dihydrotestosterone on adipose tissue measured by serial analysis of gene expression. *J. Mol. Endocrinol.* **33**, 429–444 (2004).
156. Dicker, A. *et al.* Effect of testosterone on lipolysis in human pre-adipocytes from different fat depots. *Diabetologia* **47**, 420–428 (2004).
157. Zang, H. *et al.* Effects of testosterone and estrogen treatment on lipolysis signaling pathways in subcutaneous adipose tissue of postmenopausal women. *Fertil. Steril.* **88**, 100–106 (2007).
158. Anderson, L. A., McTernan, P. G., Harte, A. L., Barnett, A. H. & Kumar, S. The regulation of

- HSL and LPL expression by DHT and flutamide in human subcutaneous adipose tissue. *Diabetes, Obes. Metab.* **4**, 209–213 (2002).
159. Per, M. & Björntorp, L. Effects of Testosterone on Triglyceride Uptake and Mobilization in Different Adipose Tissues in Male Rats in Vivo. *Obes. Res.* **3**, 113–119 (1995).
160. Santosa, S. & Jensen, M. D. Effects of male hypogonadism on regional adipose tissue fatty acid storage and lipogenic proteins. *PLoS One* **7**, 1–10 (2012).
161. A&IN, P., BIRGITTA ODFIN, A. P. B. & Departments. Assimilation and Mobilization of Triglycerides in Subcutaneous Abdominal and Femoral Adipose in Vivo in Men: Effects of Androgens. (1994).
162. Lijnn, L. Assimilation of Triglycerides in Subcutaneous and Intraabdominal Adipose Tissues in Viuo in Men: Effects of Testosterone. *Endocrinol. Metab.* (1996).
163. Saad, M. F. *et al.* Sexual dimorphism in plasma leptin concentration. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **82**, 579–584 (1997).
164. Rosenbaum, M., Pietrobelli, A., Vasselli, J. R., Heymsfield, S. B. & Leibel, R. L. Sexual dimorphism in circulating leptin concentrations is not accounted for by differences in adipose tissue distribution. *Int. J. Obes.* **25**, 1365–1371 (2001).
165. Yannakoulia, M. *et al.* Body fat mass and macronutrient intake in relation to circulating soluble leptin receptor, free leptin index, adiponectin, and resistin concentrations in healthy humans. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **88**, 1730–1736 (2003).
166. Machinal, F., Dieudonne, M. N., Leneveu, M. C., Pecquery, R. & Giudicelli, Y. In vivo and in vitro ob gene expression and leptin secretion in rat adipocytes: Evidence for a regional specific regulation by sex steroid hormones. *Endocrinology* **140**, 1567–1574 (1999).
167. Jenks, M. Z., Fairfield, H. E., Johnson, E. C., Morrison, R. F. & Muday, G. K. Sex Steroid Hormones Regulate Leptin Transcript Accumulation and Protein Secretion in 3T3-L1 Cells. *Sci. Rep.* **7**, 1–12 (2017).
168. Gui, Y., Silha, J. V. & Murphy, L. J. Sexual dimorphism and regulation of resistin, adiponectin, and leptin expression in the mouse. *Obes. Res.* **12**, 1481–1491 (2004).
169. Kapoor, D., Clarke, S., Stanworth, R., Channer, K. S. & Jones, T. H. The effect of testosterone replacement therapy on adipocytokines and C-reactive protein in hypogonadal men with type 2 diabetes. *Eur. J. Endocrinol.* **156**, 595–602 (2007).
170. Daniel Floryk, Shinji Kurosaka, Ryuta Tanimoto, Guang Yang, Alexei Goltsov, Sanghee Park, and T. C. T. Castration-Induced Changes in Mouse Epididymal White Adipose Tissue. *Bone* **23**, 1–7 (2013).
171. Rodríguez-Cuenca, S. *et al.* Sex steroid receptor expression profile in brown adipose tissue. Effects of hormonal status. *Cell. Physiol. Biochem.* **20**, 877–886 (2007).
172. Rodríguez, A. M., Monjo, M., Roca, P. & Palou, A. Opposite actions of testosterone and progesterone on UCP1 mRNA expression in cultured brown adipocytes. *Cell. Mol. Life Sci.* **59**, 1714–1723 (2002).
173. Monjo, M., Rodríguez, A. M., Palou, A. & Roca, P. Direct Effects of Testosterone, 17 $\beta$ -Estradiol, and Progesterone on Adrenergic Regulation in Cultured Brown Adipocytes: Potential

- Mechanism for Gender-Dependent Thermogenesis. *Endocrinology* **144**, 4923–4930 (2003).
174. Yuan, X. *et al.* Brown adipose tissue transplantation ameliorates polycystic ovary syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **113**, 2708–2713 (2016).
175. Shorakae, S. *et al.* Brown adipose tissue thermogenesis in polycystic ovary syndrome. *Clin. Endocrinol. (Oxf)*. **90**, 425–432 (2019).
176. Sato, T. *et al.* Late onset of obesity in male androgen receptor-deficient (AR KO) mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **300**, 167–171 (2003).
177. Fan, W. Q. *et al.* Androgen receptor null male mice develop late-onset obesity caused by decreased energy expenditure and lipolytic activity but show normal insulin sensitivity with high adiponectin secretion. *Diabetes* **54**, 1000–1008 (2005).
178. Aaron M. Cypess, S. L. *et al.* Identification and Importance of Brown Adipose Tissue in Adult Humans. *N Engl J Med.* **61**, 515–525 (2009).
179. Ouellet, V. *et al.* Outdoor temperature, age, sex, body mass index, and diabetic status determine the prevalence, mass, and glucose-uptake activity of <sup>18</sup>F-FDG-detected BAT in humans. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **96**, 192–199 (2011).
180. Fletcher, L. A. *et al.* Sexual Dimorphisms in Adult Human Brown Adipose Tissue. *Obesity* **28**, 241–246 (2020).
181. Saito, M. *et al.* High incidence of metabolically active brown adipose tissue in healthy adult humans: Effects of cold exposure and adiposity. *Diabetes* **58**, 1526–1531 (2009).
182. Varlamov, O. *et al.* Androgen effects on adipose tissue architecture and function in nonhuman primates. *Endocrinology* **153**, 3100–3110 (2012).
183. Hashimoto, O. *et al.* Castration induced browning in subcutaneous white adipose tissue in male mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **478**, 1746–1750 (2016).
184. Giovambattista, A., Chisari, A. N., Gaillard, R. C. & Spinedi, E. Food intake-induced leptin secretion modulates hypothalamo-pituitary-adrenal axis response and hypothalamic Ob-Rb expression to insulin administration. *Neuroendocrinology* **72**, 341–349 (2000).
185. Galarraga, M. *et al.* Adiposoft: Automated software for the analysis of white adipose tissue cellularity in histological sections. *J. Lipid Res.* **53**, 2791–2796 (2012).
186. Divakaruni, A. S., Paradyse, A., Ferrick, D. A., Murphy, A. N. & Jastroch, M. *Analysis and interpretation of microplate-based oxygen consumption and pH data. Methods in Enzymology* vol. 547 (2014).
187. Laemmli. cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage t4. *Nat. Publ. Gr.* **228**, 726–734 (1970).
188. Rothwell, N. J. & Stock, M. J. Luxuskonsumtion, diet-induced thermogenesis and brown fat: The case in favour. *Clin. Sci.* **64**, 19–23 (1983).
189. Ruidan Xue, Matthew D. Lynes, Jonathan M. Dreyfuss, Farnaz Shamsi, Tim J. Schulz, Hongbin Zhang, Tian Lian Huang, Kristy L. Townsend, Yiming Li, Hirokazu Takahashi, Lauren S. Weiner, Andrew P. White, Maureen S. Lynes, Lee L. Rubin, Laurie J. Goodyear, A. M. C. and Y.-H. T. Clonal analyses and gene profiling identify genetic biomarkers of human brown and white preadipocyte thermogenic potential. *Physiol. Behav.* **176**, 139–148 (2016).

190. Wang, C. H. *et al.* CRISPR-engineered human brown-like adipocytes prevent diet-induced obesity and ameliorate metabolic syndrome in mice. *Sci. Transl. Med.* **12**, (2020).
191. Pergola, G. De. The adipose tissue metabolism : role of testosterone and dehydroepiandrosterone. 59–63 (2000).
192. Moreira-Pais, A. *et al.* Sex differences on adipose tissue remodeling: from molecular mechanisms to therapeutic interventions. *J. Mol. Med.* **98**, 483–493 (2020).
193. Gentry, R. T. & Wade, G. N. Androgenic control of food intake and body weight in male rats. *J. Comp. Physiol. Psychol.* **90**, 18–25 (1976).
194. JAN W. KAKOLEWSRI, VERNE C. COX, A. E. S. V. SEX DIFFERENCES IN BODY-WEIGHT CHANGE FOLLOWING GONADECTOMY OF RATS. 547–554 (1968).
195. Baik, M. *et al.* Testosterone deficiency caused by castration increases adiposity in male rats in a tissue-specific and diet-dependent manner. *Genes Nutr.* **15**, 1–10 (2020).
196. Turner, R. T., Wakley, G. K. & Hannon, K. S. Differential effects of androgens on cortical bone histomorphometry in gonadectomized male and female rats. *J. Orthop. Res.* **8**, 612–617 (1990).
197. Vanderschueren, D. *et al.* Aromatase inhibition impairs skeletal modeling and decreases bone mineral density in growing male rats. *Endocrinology* **138**, 2301–2307 (1997).
198. Davidyan, A., Pathak, S., Baar, K. & Bodine, S. C. Maintenance of muscle mass in adult male mice is independent of testosterone. *PLoS One* **16**, 1–16 (2021).
199. Axell, A. M. *et al.* Continuous testosterone administration prevents skeletal muscle atrophy and enhances resistance to fatigue in orchidectomized male mice. *Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab.* **291**, 506–516 (2006).
200. Gualillo, O. *et al.* Gender and gonadal influences on ghrelin mRNA levels in rat stomach. *Eur. J. Endocrinol.* **144**, 687–690 (2001).
201. El-Sawy, S. & Hashish, A. Role of Testosterone Replacement Therapy on Plasma Ghrelin Level before and after Orchiectomy in Male Albino Rats. *Bull. Egypt. Soc. Physiol. Sci.* **28**, 213–224 (2008).
202. Ali Abulmeaty, M. M., Almajwal, A. M., ElSadek, M. F., Berika, M. Y. & Razak, S. Metabolic Effects of Testosterone Hormone Therapy in Normal and Orchiectomized Male Rats: From Indirect Calorimetry to Lipolytic Enzymes. *Int. J. Endocrinol.* **2019**, (2019).
203. Lebenthal, Y. *et al.* Effect of sex hormone administration on circulating ghrelin levels in peripubertal children. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **91**, 328–331 (2006).
204. Gambineri, A. *et al.* Short-term modification of sex hormones is associated with changes in ghrelin circulating levels in healthy normal-weight men. *J. Endocrinol. Invest.* **28**, 241–246 (2005).
205. Ali Abulmeaty, M. M., Almajwal, A. M., ElSadek, M. F., Berika, M. Y. & Razak, S. Metabolic Effects of Testosterone Hormone Therapy in Normal and Orchiectomized Male Rats: From Indirect Calorimetry to Lipolytic Enzymes. *Int. J. Endocrinol.* **2019**, (2019).
206. Farooqi, I. S. Leptin and the onset of puberty: Insights from rodent and human genetics. *Semin. Reprod. Med.* **20**, 139–144 (2002).

207. Swerdloff, R. S., Batt, R. A. & Bray, G. A. Reproductive hormonal function in the genetically obese (ob/ob) mouse. *Endocrinology* **98**, 1359–1364 (1976).
208. Rao, P. M., Kelly, D. M. & Jones, T. H. Testosterone and insulin resistance in the metabolic syndrome and T2DM in men. *Nat. Rev. Endocrinol.* **9**, 479–493 (2013).
209. HOLMÄNG, A. & BJÖRNTORP, P. The effects of testosterone on insulin sensitivity in male rats. *Acta Physiol. Scand.* **146**, 505–510 (1992).
210. Harada, N. *et al.* Androgen signaling expands  $\beta$ -cell mass in male rats and  $\beta$ -cell androgen receptor is degraded under high-glucose conditions. *Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab.* **314**, E274–E286 (2018).
211. Xia, F. *et al.* Castration-induced testosterone deficiency increases fasting glucose associated with hepatic and extra-hepatic insulin resistance in adult male rats. *Reprod. Biol. Endocrinol.* **11**, (2013).
212. Amitani, M., Asakawa, A., Amitani, H. & Inui, A. The role of leptin in the control of insulin-glucose axis. *Front. Neurosci.* **7**, 1–12 (2013).
213. Chait, A. & den Hartigh, L. J. Adipose Tissue Distribution, Inflammation and Its Metabolic Consequences, Including Diabetes and Cardiovascular Disease. *Front. Cardiovasc. Med.* **7**, 1–41 (2020).
214. Banks, W. A. *et al.* Triglycerides Induce Leptin Resistance at the Blood-Brain Barrier. *Diabetes* **53**, 1253–1260 (2004).
215. Banks, W. A. *et al.* Triglycerides cross the blood-brain barrier and induce central leptin and insulin receptor resistance. *Int. J. Obes.* **42**, 391–397 (2018).
216. Chen, H. C. *et al.* Increased insulin and leptin sensitivity in mice lacking acyl CoA:diacylglycerol acyltransferase 1. *J. Clin. Invest.* **109**, 1049–1055 (2002).
217. Kersten, S. Physiological regulation of lipoprotein lipase. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* **1841**, 919–933 (2014).
218. MARIN, P. & BIRGITTA ODEN, A. P. B. Assimilation and Mobilization of Triglycerides Subcutaneous Abdominal and Femoral Adipose in Vivo in Men: Effects of Androgens. (2014).
219. Mårin, P. Testosterone and regional fat distribution. *Obes. Res.* **3 Suppl 4**, (1995).
220. Santosa, S., Bush, N. C. & Jensen, M. D. Acute testosterone deficiency alters adipose tissue fatty acid storage. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **102**, 3056–3064 (2017).
221. Staprans, I., Rapp, J. H., Pan, X. M., Ong, D. L. & Feingold, K. R. Testosterone regulates metabolism of plasma chylomicrons in rats. *Arteriosclerosis* **10**, 591–596 (1990).
222. Anna Haug, A. T. H. & Eilertsen, O. S. and E. E. Hypercholesterolaemia, hypotriacylglycerolaemia and increased lipoprotein lipase activity following orchidectomy in rats. (1984).
223. Gonzales, A. M. & Orlando, R. A. Role of adipocyte-derived lipoprotein lipase in adipocyte hypertrophy. *Nutr. Metab.* **4**, 1–9 (2007).
224. Schlein, C. *et al.* FGF21 lowers plasma triglycerides by accelerating lipoprotein catabolism in white and brown adipose tissues. *Cell Metab.* **23**, 441–453 (2016).
225. Skurk, T., Alberti-Huber, C., Herder, C. & Hauner, H. Relationship between adipocyte size and

- adipokine expression and secretion. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **92**, 1023–1033 (2007).
226. Nishizawa, H. *et al.* Androgens decrease plasma adiponectin, an insulin-sensitizing adipocyte-derived protein. *Diabetes* **51**, 2734–2741 (2002).
227. Choe, S. S., Huh, J. Y., Hwang, I. J., Kim, J. I. & Kim, J. B. Adipose tissue remodeling: Its role in energy metabolism and metabolic disorders. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. **7**, 1–16 (2016).
228. Fang, L., Guo, F., Zhou, L., Stahl, R. & Grams, J. The cell size and distribution of adipocytes from subcutaneous and visceral fat is associated with type 2 diabetes mellitus in humans. *Adipocyte* **4**, 273–279 (2015).
229. Yu, I. C. *et al.* Hyperleptinemia without obesity in male mice lacking androgen receptor in adipose tissue. *Endocrinology* **149**, 2361–2368 (2008).
230. Nookaew, I. *et al.* Adipose tissue resting energy expenditure and expression of genes involved in mitochondrial function are higher in women than in men. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **98**, (2013).
231. Van Den Beukel, J. C. *et al.* Women have more potential to induce browning of perirenal adipose tissue than men. *Obesity* **23**, 1671–1679 (2015).
232. Jones, T. H. Effects of testosterone on Type 2 diabetes and components of the metabolic syndrome. *J. Diabetes* **2**, 146–156 (2010).
233. Di Nisio, A. *et al.* Testosterone is sequestered in dysfunctional adipose tissue, modifying androgen-responsive genes. *Int. J. Obes.* **44**, 1617–1625 (2020).
234. Maurer, S., Harms, M. & Boucher, J. The colorful versatility of adipocytes: white-to-brown transdifferentiation and its therapeutic potential in man. *FEBS J.* 1–19 (2020) doi:10.1111/febs.15470.
235. Villarroya, F., Cereijo, R., Villarroya, J., Gavaldà-Navarro, A. & Giralt, M. Toward an Understanding of How Immune Cells Control Brown and Beige Adipobiology. *Cell Metab.* **27**, 954–961 (2018).
236. Arrojo E Drigo, R., Fonseca, T. L., Werneck-De-Castro, J. P. S. & Bianco, A. C. Role of the type 2 iodothyronine deiodinase (D2) in the control of thyroid hormone signaling. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* **1830**, 3956–3964 (2013).
237. De Jesus, L. A. *et al.* The type 2 iodothyronine deiodinase is essential for adaptive thermogenesis in brown adipose tissue. *J. Clin. Invest.* **108**, 1379–1385 (2001).
238. Akarsu, E. *et al.* Subcutaneous Adipose Tissue Type II Deiodinase Gene Expression Reduced in Obese Individuals with Metabolic Syndrome. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes* **124**, 11–15 (2015).
239. Cettour-Rose, P., Burger, A. G., Meier, C. A., Visser, T. J. & Rohner-Jeanrenaud, F. Central stimulatory effect of leptin on T3 production is mediated by brown adipose tissue type II deiodinase. *Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab.* **283**, 980–987 (2002).
240. Tai, P. J. *et al.* Direct regulation of androgen receptor-associated protein 70 by thyroid hormone and its receptors. *Endocrinology* **148**, 3485–3495 (2007).
241. Yau, W. W. & Yen, P. M. Thermogenesis in adipose tissue activated by thyroid hormone. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, (2020).

242. Lasar, D., Julius, A., Fromme, T. & Klingenspor, M. Browning attenuates murine white adipose tissue expansion during postnatal development. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* **1831**, 960–968 (2013).
243. BROBECK, J. R. Food intake as a mechanism of temperature regulation in rats. *Fed. Proc.* **7**, 13 (1948).
244. Wei, X. *et al.* NAD<sup>+</sup>/sirtuin metabolism is enhanced in response to cold-induced changes in lipid metabolism in mouse liver. *FEBS Lett.* **594**, 1711–1725 (2020).
245. Dubois, V. *et al.* Androgen deficiency exacerbates high-fat diet-induced metabolic alterations in male mice. *Endocrinology* **157**, 648–665 (2016).
246. Nikolaenko, L. *et al.* Testosterone replacement ameliorates nonalcoholic fatty liver disease in castrated male rats. *Endocrinology* **155**, 417–428 (2014).
247. Jia, Y. *et al.* Testosterone protects high-fat/low-carbohydrate diet-induced nonalcoholic fatty liver disease in castrated male rats mainly via modulating endoplasmic reticulum stress. *Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab.* **314**, E366–E376 (2018).
248. Comas, F. *et al.* Neuregulin 4 is a novel marker of beige adipocyte precursor cells in human adipose tissue. *Front. Physiol.* **10**, (2019).
249. Pfeifer, A. NRG4: An endocrine link between brown adipose tissue and liver. *Cell Metab.* **21**, 13–14 (2015).
250. Nedergaard, J. *et al.* UCP1: The only protein able to mediate adaptive non-shivering thermogenesis and metabolic inefficiency. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* **1504**, 82–106 (2001).
251. Gordon, K. *et al.* Seven days of cold acclimation substantially reduces shivering intensity and increases nonshivering thermogenesis in adult humans. *J. Appl. Physiol.* **126**, 1598–1606 (2019).
252. Ueta, C. B. *et al.*  $\beta$ 1 Adrenergic receptor is key to cold-and diet-induced thermogenesis in mice. *J. Endocrinol.* **214**, 359–365 (2012).
253. Emorine, L. J. *et al.* Molecular characterization of the human  $\beta$ 3-adrenergic receptor. *Science (80-. )*. **245**, 1118–1121 (1989).
254. Sacco, E. *et al.* Discovery history and clinical development of mirabegron for the treatment of overactive bladder and urinary incontinence. *Expert Opin. Drug Discov.* **9**, 433–448 (2014).
255. Finlin, B. S. *et al.* Human adipose beiging in response to cold and mirabegron. *JCI insight* **3**, 1–15 (2018).
256. Finlin, B. S. *et al.* The  $\beta$ 3-adrenergic receptor agonist mirabegron improves glucose homeostasis in obese humans. *J. Clin. Invest.* **130**, 2319–2331 (2020).
257. Hao, L. *et al.* Beneficial metabolic effects of mirabegron in vitro and in high-fat diet-induced obese mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **369**, 419–427 (2019).
258. Frühbeck, G. & Gómez-Ambrosi, J. Expression of the  $\beta$ 3-adrenergic receptor in human white adipose tissue. *Encycl. Hum. Nutr.* 1–14 (2005) doi:10.1016/B0-12-226694-3/00002-8.
259. Saulnier-Blache, J. S., Bouloumie, A., Valet, P., Devedjian, J. C. & Lafontan, M. Androgenic regulation of adipocyte  $\alpha$ 2-adrenoceptor expression in male and female syrian hamsters:

- Proposed transcriptional mechanism. *Endocrinology* **130**, 316–327 (1992).
260. Anne Bouloumie, P. V. et al. Adipocyte alpha 2a-adrenoceptor is the only alpha 2-adrenoceptor regulated by testosterone. *Eur. J. Pharmacology* **54**, 488–495 (1994).
261. Pecquery, Rene, M. N. D. et al. Enhancement of the expression of the alfa2 adrenoceptor protein and mna by a direct effect of a in white adipocytes. 112–118 (1995).
262. Kelly, L. J. et al. Peroxisome Proliferator-Activated Receptors  $\alpha$  and  $\beta$  Mediate in Vivo Regulation of Uncoupling Protein (UCP-1, UCP-2, UCP-3) Gene Expression LINDA. *Society* **139**, 4920–4927 (2008).
263. Guardiola-Diaz, H. M. et al. Rat peroxisome proliferator-activated receptors and brown adipose tissue function during cold acclimatization. *J. Biol. Chem.* **274**, 23368–23377 (1999).
264. Nedergaard, J., Petrovic, N., Lindgren, E. M., Jacobsson, A. & Cannon, B. PPAR $\gamma$  in the control of brown adipocyte differentiation. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* **1740**, 293–304 (2005).
265. Kühlbrandt, W. Structure and function of mitochondrial membrane protein complexes. *BMC Biol.* **13**, 1–11 (2015).
266. Sutherland, L. N., Capozzi, L. C., Turchinsky, N. J., Bell, R. C. & Wright, D. C. Time course of high-fat diet-induced reductions in adipose tissue mitochondrial proteins: Potential mechanisms and the relationship to glucose intolerance. *Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab.* **295**, 1076–1083 (2008).
267. Deveaud, C., Beauvoit, B., Salin, B., Schaeffer, J. & Rigoulet, M. Regional differences in oxidative capacity of rat white adipose tissue are linked to the mitochondrial content of mature adipocytes. *Mol. Cell. Biochem.* **267**, 157–166 (2004).
268. Tiraby, C. et al. Acquisition of brown fat cell features by human white adipocytes. *J. Biol. Chem.* **278**, 33370–33376 (2003).
269. Kaushik, S. & Kaur, J. Chronic cold exposure affects the antioxidant defense system in various rat tissues. *Clin. Chim. Acta* **333**, 69–77 (2003).
270. Chouchani, E. T. et al. Mitochondrial ROS regulate thermogenic energy expenditure and sulfenylation of UCP1. *Nature* **532**, 112–116 (2016).
271. Yau, W. W. et al. Chronic cold exposure induces autophagy to promote fatty acid oxidation, mitochondrial turnover, and thermogenesis in brown adipose tissue. *iScience* **24**, 102434 (2021).
272. Bajpai, P., Koc, E., Sonpavde, G., Singh, R. & Singh, K. K. Mitochondrial localization, import, and mitochondrial function of the androgen receptor. *J. Biol. Chem.* **294**, 6621–6634 (2019).
273. Chella Krishnan, K. et al. Sex-specific genetic regulation of adipose mitochondria and metabolic syndrome by Ndufv2. *Nat. Metab.* **3**, 1552–1568 (2021).
274. Ventura-Clapier, R. et al. Mitochondria: A central target for sex differences in pathologies. *Clin. Sci.* **131**, 803–822 (2017).
275. Capllonch-Amer, G., Llado, I., Proenza, A. M., García-Paimer, F. J. & Gianotti, M. Opposite effects of 17- $\beta$  estradiol and testosterone on Mitochondrial biogenesis and adiponectin synthesis in white adipocytes. *J. Mol. Endocrinol.* **52**, 203–214 (2013).

276. Rodríguez-Cuenca, S., Monjo, M., Gianotti, M., Proenza, A. M. & Roca, P. Expression of mitochondrial biogenesis-signaling factors in brown adipocytes is influenced specifically by 17 $\beta$ -estradiol, testosterone, and progesterone. *Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab.* **292**, 340–346 (2007).
277. Lerner, A. *et al.* Androgen reduces mitochondrial respiration in mouse brown adipocytes: A model for disordered energy balance in polycystic ovary syndrome. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, 1–15 (2021).
278. Liu, C. *et al.* Testosterone deficiency caused by castration modulates mitochondrial biogenesis through the AR/PGC1 $\alpha$ /TFAM pathway. *Front. Genet.* **10**, 1–16 (2019).
279. Liao, R. S. *et al.* Androgen receptor-mediated non-genomic regulation of prostate cancer cell proliferation. *Transl. Androl. Urol.* **2**, 187–196 (2013).
280. Peterziel, H. *et al.* Rapid signalling by androgen receptor in prostate cancer cells. *Oncogene* **18**, 6322–6329 (1999).
281. O'Reilly, M. W., House, P. J. & Tomlinson, J. W. Understanding androgen action in adipose tissue. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **143**, 277–284 (2014).
282. Fuller-Jackson, J. P., Dordevic, A. L., Clarke, I. J. & Henry, B. A. Effect of sex and sex steroids on brown adipose tissue heat production in humans. *Eur. J. Endocrinol.* **183**, 343–355 (2020).
283. Vaziri, C. & Faller, D. V. Down-regulation of platelet-derived growth factor receptor expression during terminal differentiation of 3T3-L1 pre-adipocyte fibroblasts. *J. Biol. Chem.* **271**, 13642–13648 (1996).
284. Wang, B. *et al.* Maternal Retinoids Increase PDGFR $\alpha$ + Progenitor Population and Beige Adipogenesis in Progeny by Stimulating Vascular Development. *EBioMedicine* **18**, 288–299 (2017).
285. Shan, B. *et al.* Multilayered omics reveal sex- and depot-dependent adipose progenitor cell heterogeneity. *Cell Metab.* 1–17 (2022) doi:10.1016/j.cmet.2022.03.012.
286. Klusóczki, Á. *et al.* Differentiating SGBS adipocytes respond to PPAR $\gamma$  stimulation, irisin and BMP7 by functional browning and beige characteristics. *Sci. Rep.* **9**, 1–12 (2019).
287. Kroon, T. *et al.* PPAR $\gamma$  and PPAR $\alpha$  synergize to induce robust browning of white fat in vivo. *Mol. Metab.* **36**, 1–14 (2020).
288. Siersbaek, M. S. *et al.* Genome-Wide Profiling of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor in Primary Epididymal, Inguinal, and Brown Adipocytes Reveals Depot-Selective Binding Correlated with Gene Expression. *Mol. Cell. Biol.* **32**, 3452–3463 (2012).
289. Ishibashi, J. & Seale, P. Functions of Prdm16 in thermogenic fat cells. *Temperature* **2**, 65–72 (2015).
290. Varlamov, O. *et al.* Androgen effects on adipose tissue architecture and function in nonhuman primates. *Endocrinology* **153**, 3100–3110 (2012).
291. Santos, R. S. *et al.* Activation of estrogen receptor alpha induces beiging of adipocytes. *Mol. Metab.* **18**, 51–59 (2018).
292. Lapid, K., Lim, A., Berglund, E. D. & Lu, Y. Estrogen receptor inhibition enhances cold-induced adipocyte beiging and glucose tolerance. *Diabetes, Metab. Syndr. Obes. Targets Ther.* **12**,

*Bibliografía*

- 1419–1436 (2019).
293. Benrick, A. *et al.* Adiponectin protects against development of metabolic disturbances in a PCOS mouse model. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **114**, E7187–E7196 (2017).
294. Spalding, K. L. *et al.* Dynamics of fat cell turnover in humans. *Nature* **453**, 783–787 (2008).
295. Rigamonti, A., Brennand, K., Lau, F. & Cowan, C. A. Rapid cellular turnover in adipose tissue. *PLoS One* **6**, (2011).