

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA



TESIS DOCTORAL

Papel de los mecanismos de dinámica y control de calidad mitocondriales
en la termogénesis adaptativa

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

Beatriz Jiménez García

DIRIGIDA POR

Manuel Benito de las Hera

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

Programa de Doctorado en Bioquímica, Biología Molecular y Biomedicina



TESIS DOCTORAL

**PAPEL DE LOS MECANISMOS DE DINÁMICA Y
CONTROL DE CALIDAD MITOCONDRIALES EN LA
TERMOGÉNESIS ADAPTATIVA**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

BEATRIZ JIMÉNEZ GARCÍA

DIRECTOR

MANUEL BENITO DE LAS HERAS

A todas esas personas que me han visto crecer.

***“La vida es como un viaje sin destino.
Lo que cuenta es el camino.”***

Isabel Allende

AGRADECIMIENTOS

***“Para abrir nuevos caminos, hay que inventar, experimentar, crecer,
correr riesgos, romper reglas, equivocarse... Y divertirse.”***

Mary Lou Cook

Profesora y escritora

“Un nuevo comienzo es siempre también una despedida.”

Esta tesis sólo podía comenzar de la manera más bonita posible: agradeciendo. Puedo asegurar que durante estos 5 años he crecido en todos los sentidos y, lo más importante, es que detrás de cada esfuerzo y sacrificio que he hecho siempre ha estado un grupo de personas increíbles apoyándome.

Gracias al laboratorio 21, que se ha convertido prácticamente en familia para mí.

A **Manuel**, por permitirme estar en este laboratorio realizando mi tesis doctoral y darme la oportunidad de crecer profesionalmente en la investigación básica.


Carlos, gracias por ser mi mentor. No te imaginas lo cautivador que es hablar contigo de ciencia. No puedo más que darte las gracias por todo el tiempo que has invertido en mí, pero sobre todo tengo que darte infinitas gracias por toda la confianza que has depositado en mí. Sin ti, esta tesis no hubiera podido escribirse. A **Gema** por enseñarme a trabajar con animales sin perder nuestra humanidad. Nunca olvidaré nuestros fríos, no por las 14 horas del experimento, sino por nuestros momentos a solas. Nos empezaron a gustar tanto que empezamos a instaurar el turno de noche en el laboratorio. Durante todos estos años te has convertido en mi confidente, en la voz de mi conciencia y en una de mis mejores amigas. Será difícil empezar en otro sitio sabiendo que cuando llegue al laboratorio no estarás tú para hablar de cualquier cosa que nos ha pasado o de lo loco que está el mundo. Es más, mientras escribo estas palabras me doy cuenta de que ya me está sucediendo y es que encontrarse con alguien como tú en la vida se siente como ganar el premio Gordo de la Navidad. A ti, Gema, te debo esta tesis entera y mi evolución personal. **Elena**, lo diré siempre y no me equivocaré, sin ti el laboratorio se hunde. Gracias por haberme quitado tanto trabajo de encima y por ayudarme con la burocracia que esto conlleva, que no es poca y no es fácil. Millones de gracias por haber hecho que esta última etapa fuera más amena y por haberme enseñado a que siempre hay dos formas de ver la vida y que hay que luchar por lo que uno quiere. A **Ana**, la persona que cuando pasaba por la puerta del laboratorio lo inundaba de felicidad. Gracias por dejarte inculcar el vocabulario *millennial*/generación Z, me has hecho pasar muy buenos ratos viendo cómo decías esas frases en los momentos oportunos. Siempre es un placer poder compartir historietas contigo y poder ver tu alegría en esos ojos tan profundos.

A mis -docs. **Jesús**, no te imaginas la felicidad que conlleva tu presencia por tu cariño y dulzura. Siempre me he sentido arropada por ti y has conseguido sacarme una carcajada en momentos tensos durante esta época de absoluta locura. Siempre nos quedarán nuestros Cibers. Parecía que no sabíamos lo que hacíamos, pero supimos. ¡Vaya que sí supimos! **Patri**, no hay palabras para describir todo lo que hemos vivido. Tú me has enseñado a conseguir todo lo que me proponga y has visto en mí que soy una verdadera científica, que a veces desde dentro cuesta verlo. Pese a que encontrar los 6 rollos de papel que están

encima de las estanterías no se te dé muy bien, considero que eres una persona más que capaz de arrasar en la ciencia. Aquello que quieras descubrir, lo descubrirás. **Carlos**, es un placer haber coincidido contigo durante estos años, desde los primeros meses en los que no teníamos ninguna interacción hasta la última etapa en la que prácticamente todos los fines quedábamos. No te imaginas lo feliz que me hace pensar en haberte conocido. Desde luego, no creo que haya nadie con el desarrollo de personaje principal que has vivido. Estoy deseando ver cuál es el próximo destino en tu vida porque sé que llegarás lejos. Carlos, calienta que eres el siguiente y tienes que cerrar nuestro ciclo por todo lo alto. Y aunque no seas una -doc, es imposible no pensar en ti, **Heleni**. Te has convertido en una persona esencial en mi vida y es sorprendente que en menos de un año forjáramos esta amistad, que siempre está. Para mí, entrar al laboratorio y que estuvieras tú en la poyata de detrás me dio la vida pero que después de todos estos años sigas aquí tan presente, le da todavía más sentido a mi vida. Gracias por abrazar todas mis rarezas, por inculcarme el mundo friki y engancharme a series de amor inefable pero también ficticio, por compartir los mismos hobbies y hacer muy bien de una barda un poco loca e insegura. Eres un rayito de luz en tiempos de oscuridad.

Además, no se puede hablar del laboratorio 21 sin mencionar a sus pollitos. **César**, qué tarde viniste. Tu decisión de elegir nuestro laboratorio, y sobre todo el tema de obesidad, para realizar tus prácticas externas fue una bendición para mí. Siempre he visto en ti las características necesarias para realizar una tesis doctoral: la resiliencia, las ganas de aprender, la humildad y la empatía. Para mí, eres una persona increíble. Gracias por haber aparecido este último año. A **Sarai** y **Ángela**, ha sido un placer conocerlos y haber compartido con vosotras momentos inolvidables. Además de saber que el laboratorio tiene nuevas estudiantes predoctorales cuya ambición va a hacer que siga a flote, estoy segura de que todos vuestros objetivos los cumpliréis y que en unos años os podré llamar *doctoras*. Disfrutad mucho de esta etapa. **Daniela**, gracias por haberte dejado enseñar este tiempo que has estado en el laboratorio, no dejes tus sueños de lado y estoy segura de que lo próximo que te espera va a ser mejor que lo que dejas atrás.

Por supuesto, quiero agradecer al Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Farmacia. **Paula**, qué bonita coincidencia vivir en Estocolmo a la vez y poder disfrutar de los *fikas* a tu lado en nuestro prestigioso Kladdkakkan. Has sido un gran descubrimiento en 2023. Gracias por dejarme conocerte más esta última etapa y espero que el destino nos vuelva a juntar más a menudo. A **Andrea**, recuerdo cuando empezamos a hacer la tesis y siempre nos apuntábamos a todo para poder rellenar el RAPI cuanto antes. Hace ya unos años que leíste tú y, por fin, ha llegado mi turno. Gracias porque el primer año me hiciste sentir incluida en este mundo. A todos los que han pasado y están en el laboratorio 15 y allegados, **Nerea**, **Cris**, **María**, **Minerva**, **Mateo**, **Carlos**, **Juan**, **Paula**, muchas gracias por las conversaciones en los pasillos, por sonreírme



siempre que pasaba por vuestro lado y por invitarme a vuestros planes. A todos los demás componentes del departamento, en especial a **Almudena, Ángel, Lola, Paloma, Álvaro, Elisa, Óscar, Fernando, Toño, Tamara, Mariola y Paloma** porque siempre habéis tenido buenas palabras para mí y me habéis dedicado tiempo cuando lo he necesitado. Para finalizar, agradezco a **Mercedes**, que antes de que te cambiasen de pabellón, alegrabas todas nuestras mañanas sólo con tu momentánea presencia en el laboratorio.

También, gracias a esta tesis doctoral he podido realizar 2 estancias. La primera fue en Barcelona, donde conocí a un grupo de personas especiales. **Antonio**, gracias por dejarme hacer esta breve estancia en tu laboratorio y dedicar tiempo a mis problemas científicos para encontrar una solución. **Alba**, mi mentora, ojalá podamos volver a juntarnos de nuevo. Lo nuestro fue un flechazo a primera vista, hiciste que me sintiera cómoda en todo momento y me enseñaste el maravilloso mundo del cultivo de adipocitos marrones. Puedo decir que me llevé una amiga de aquí y sé que vayas donde vayas, ya sea Barcelona o Rotterdam, vas a estar petándolo. A todos los jovenazos, **Paula, Jia, Josep, Nico** y las que fueron nuevas doctoras **Isa y Andrea**, gracias por haberme hecho un hueco en vuestro grupo y haberme acogido con los brazos abiertos. Por supuesto, también al resto del laboratorio, **Juan Pablo, Olga, Montse, Saska y David**, fue un placer ver cómo trabajáis allí y poder aprender de vosotros. Pese haber estado un mes allí, es imposible olvidarlo. Después, pasé 5 meses en el país nórdico por excelencia: Suecia. I would like to thank **Jan** and **Barbara** for letting me be part of your lab and including me in all your non-professional meetings. Thank you for allowing me to learn from your experience. I won't forget your kindness and your wisdom. Also, **Irina**, thanks for being my mentor and teaching me the mitochondria's world. **Rudá**, I can say I made a friend in Stockholm and that person is you. You are amazing and I know that wherever you are, doing whatever you want, you'll be rocking. Thank you for including me in your life and showing me the city. At last, but not least, I would like to appreciate **Natasa, Hamad, Naren, Jiaping, Anastasia** and those that I encountered in this journey in the **F3** of the Wenner-Green Department! Por supuesto, tengo que agradecer a **Pamela**, que lo que unió una sesión de fotos *random*, no lo separe la distancia. Gracias por siempre contar conmigo, por hacer que Estocolmo fuera más hogar y permitirme conocerte. Sé que no volverás pronto de allí y que vas a arrasarse, pero aquí te estaré esperando.

A los que conocí en el año 2012, cuando comenzó esta locura de hacer una carrera de ciencias. A mis amigos de la uni con los que compartí tanto en 4 años que nunca fue suficiente y todavía sigo compartiendo mi vida con ellos.


A mis artistas chanchulleras y melocotoneras, que siempre sabéis cómo sacarme una sonrisa sin necesidad de una tarde dibujando árboles pochos. **Ali**, eres bondad hecha persona. Recuerdo nuestras andanzas por el laboratorio cuando todavía no estábamos graduadas y decidimos hacer de nuestros TFGs nuestra excusa para vernos. Siempre serás mi primera compi de lab y la persona más adorable que

conozco. **Cris**, churri, gracias por hacer que la distancia no exista entre nosotras y por compartir tu pasión por los animales conmigo. Contigo siempre es aprender. Y diversión. Pero, sobre todo, memeces. Me podría quedar con muchas experiencias que he vivido contigo pero, sin duda, la más bonita fue hacerme tu amiga. A la que no podía faltar en este grupo, **Raqui**, no sólo me has enseñado a sobrevivir en Suecia sino que has hecho de tu hogar, mi hogar. Estoy segura de que esta etapa doctoral, dura y a veces aterradora, te hará verte con los mismos ojos que te veo yo: buena científica, amiga y persona.

A mis roleros brutales y nuestros domingos de Discord. **Jaime**, master, algún día jugaré a Mass Effect pero, por ahora, tendrá que esperar. Gracias por compartir conmigo tu alegría y tu tristeza, por hacer que tenga ganas de leer, escuchar y jugar todo lo que me propones. Espero que esa pasión no se apague nunca y puedas seguir pegándomela. **Rox**, gracias porque hasta “roleando” me haces feliz, porque contigo las risas siempre están aseguradas, incluso cuando nos abrimos para contarnos nuestras nuevas increíbles anécdotas. Qué afortunada fui al preguntarte por el equipo de voleibol.

Por supuesto, a mi garbanzo, **Pat**. Qué suerte ver que esa conexión instantánea sigue perdurando en el tiempo y que no importa cuántas tempestades vengan que siempre sabremos reunirnos, aunque sea para pintar tazas. Gracias por ser la luz en mi camino cuando todo se ve oscuro. A **Silvia**, mi segoviana leonesa, que también haces que el tiempo pase muy deprisa hasta la siguiente vez que nos volvemos a ver. Contigo no importa no hablar todos los días porque cuando lo hacemos, vuelvo a tener 20 años y siento que nunca te has ido. Gracias por seguir estando y que parezca que nunca te has ido. A **Sara**, mi compi de viaje desde el sur. Desde que el primer día de presentación hasta hoy, en diferentes lugares pero siempre poniéndonos al día y cotilleando. Qué bueno sentir contigo la madurez que hemos alcanzado. Gracias por siempre incluirme en tu vida y tener esa ilusión por mis grandes pasos. A **Miki**, que aunque seas un poco quinquí a veces, eres una gran persona siempre. Gracias por confiar en mí como yo confío en ti y que hagas de nuestras quedadas un motivo de alegría. **Andrea**, gracias por siempre acogerme en tus casas y enseñarme tus nuevas etapas, por tener esa gracia irónica que te hace tan especial y por tenerme en tus pensamientos de vez en cuando en esa vida tan ajetreada que tienes. También a **Mario** y **Víctor**, gracias porque siempre es un placer veros las caras y saber que apenas ha cambiado nada.

A mis amigas de siempre, las que siempre están y hacen que mis días sean más bonitos. **Lourdes**, mi tesoro de la adolescencia. Gracias por aparecer y nunca irte, porque cuando pienso en los momentos destacados de mi vida, siempre estás ahí. Es un regalo disfrutar de tus tontunas y tus cambios de personalidad hasta convertirte en una niña de 5 años, pero lo es más estar acompañada de tu inteligencia, resiliencia, empatía y sensibilidad. Como bien me escribiste una vez: “lo malo de escribirte es que contigo tengo la sensación de que ya está dicho todo.”



Silvia, vas a flipar pero el tiempo pasa y cada vez nos hacemos más mayores. Sorprendentemente, contigo el paso del tiempo se detiene. Gracias a ti puedo ver todo lo que hemos madurado, hasta donde hemos llegado y todo lo que hemos conseguido por el camino, pero lo más bonito es sentir que nunca hemos perdido nuestra esencia y que compartir contigo crecer se hace menos pesado. Después de que consigamos eliminar destinos de nuestra larga lista, iremos mirando residencias. **Vero**, gracias por ser tan tú y dejarme ser tan yo. Cada hit del verano nuevo no se siente tan especial desde que ya no los cantamos juntas a pleno pulmón en las fiestas pero lo que siempre sigue siendo especial es nuestra amistad. No importa a dónde vayamos, dónde trabajemos, qué estamos haciendo en ese momento que todos los grandes cambios, y no los tan pequeños, los hacemos acompañadas. Gracias porque después de tantos años sigues haciendo mi vida más amena. **Moni**, está claro que desde la infancia hasta la vejez vamos a estar juntas. Gracias por complementar mi vida con tu paciencia, creatividad y positividad, pero lo que más quiero destacar es tu perseverancia porque sin tenerte cerca me hubiera costado llegar hasta aquí. No es fácil conseguir lo que uno se propone pero tú lo haces ver sencillo. Contigo es fácil aprender cosas nuevas todos los días y me siento súper orgullosa de lo que has logrado desde que nos conocemos. Os quiero mucho, chicas.

A las personas que me habéis presentado a lo largo de estos años y ahora son parte de nuestro grupo. **Javi**, desde el primer momento te convertiste en una más y todos sabemos que ahora, oficialmente, no tienes escapatoria. Gracias por deleitarme con tu presencia en los momentos más buenos, y los más duros también, y por dejarme ser parte de tu vida. **Rober**, el relaciones públicas, gracias por tus tortillas de patatas y tu buen gusto por los videojuegos, contigo es imposible aburrirse. Y a **Jorge**, gracias porque siempre eres capaz de hacer bromas mientras hablamos seriamente de cómo arreglar el mundo y sólo por eso la sociedad no se ve tan mal. Muchas gracias a los tres por toda la atención que habéis prestado en esta locura.

A mi familia, a mis **tíos** y mis **primos** que siempre que me veáis os interesabais por mi trabajo y siempre que habéis podido me habéis ayudado con esta aventura. A mi **yaya**, que aunque nunca has entendido que esto también era un trabajo, tus ojos siempre estaban llenos de orgullo.

A mi núcleo familiar, porque no sólo habéis soportado estos 5 años conmigo sino también todo el tiempo anterior. Hemos vivido tantas cosas que en lo único que puedo pensar es en todo el cariño, la amabilidad, la protección, la independencia y, sobre todo, todo el amor que he recibido y me habéis enseñado a dar. **Jota**, para que no te sientas muy mayor, como te dije el día de tu boda, siempre has sido mi ejemplo a seguir y aunque sea el “cerebrito” de la casa como tú dices, todos sabemos la persona tan inteligente y buena que eres. Para mí, es más importante ser humilde y amable que cualquier título universitario. No podría pensar en un hermano mejor que tú. A **Sheila**, mi cuñada favorita y no porque sea la única. Gracias porque siempre me has incluido en tu vida y tus grandes pasos

profesionales, porque cuando yo he dado los míos has estado siempre apoyándome. Contigo siempre es bonito intercambiar anécdotas cotidianas y criticar lo loco que está el mundo ahora. **Cristian**, mi sobrino pelotero. Muchas gracias porque siempre que nos vemos o hablamos, me iluminas la vida. Ojalá ser un poco más niña para ver el mundo con tus ojos. Al pequeño **Manu**, que tu sonrisa sea como la de tu hermano, que nunca se apague. Gracias porque escucharte reír me hace feliz. Y a nuestros perretes, **Elvis** y **Fujur**, cuyo amor incondicional es un regalo que ilumina nuestros días. Os adoro y os quiero infinito.

Mamá, siempre presente con amor y cariño. Tu ternura ha sido mi refugio y tu presencia mi mayor regalo. A ti, mi fuente inagotable de energía y optimismo, te dedico no sólo esta tesis doctoral sino también todos mis pasos en la vida. Sobran las palabras cuando todos los días nos demostramos todo lo que sentimos. Yo también estoy orgullosa de ti y te quiero mucho.

Por último, tengo que agradecer a una de las personas más importantes que he tenido en mi vida. A ti, **papá**, porque aunque no puedas leer esto estoy segura de que estarías muy orgulloso de mí. Probablemente hubieras sido la única persona que se hubiera leído esta tesis entera sin apenas tener idea de qué trata y me habrías ayudado a diseñar los dibujos que aparecen en ella. También estoy segura de que estarías presumiendo de hija con tus amigos como siempre hacías con nosotros cuando éramos pequeños. Tu curiosidad fue la que hizo que fuera una persona que se preguntase todo, desde bien pequeña, y eso me ha hecho llegar hasta donde he llegado. Todos estos años te imaginaba sentado en la mesa del salón con esta tesis impresa y cotilleándola mientras silbabas, como si de un periódico se tratase. Siempre me has apoyado, fuera cual fuera el desenlace, y ahora sólo puedo decir que este es el resultado de todo el amor y cariño que recibí cuando te pregunté si debía meterme a esto. Gracias por no haberte ido del todo.

Por último, gracias a todos por vuestra aportación artística en esta tesis.

Hay personas que son tu lugar seguro y el mío sois todos vosotros.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	11
ÍNDICE	19
ÍNDICE DE TABLAS	25
ÍNDICE DE FIGURA	25
RESUMEN	29
ABSTRACT	35
ABREVIATURAS	41
INTRODUCCIÓN.....	47
1.1 OBESIDAD: UNA PANDEMIA DEL SIGLO XXI.....	49
1.1.1 La obesidad en la actualidad	49
1.1.2 Clasificación de la obesidad.....	50
1.1.2.1 Índice de Masa Corporal (IMC).....	50
1.1.2.2 Medidas antropométricas.....	51
1.1.2.3 Localización de la grasa	52
1.1.2.4 Metabolismo.....	52
1.1.3 Fisiopatología de la obesidad.....	53
1.1.4 Complicaciones asociadas a la obesidad.....	56
1.1.4.1 Resistencia a insulina	56
1.1.4.2 Diabetes Mellitus tipo 2.....	58
1.1.4.3 Síndrome metabólico.....	59
1.1.4.4 Dislipidemia.....	59
1.1.4.5 Hígado graso no alcohólico.....	60
1.1.4.6 Hipertensión y riesgo cardiovascular.....	60
1.1.4.7 Cáncer	60
1.1.4.8 Trastornos y enfermedades mentales	61
1.1.5 Terapias anti-obesidad.....	62
1.1.5.1 Estilo de vida.....	62
1.1.5.2 Farmacoterapia	63
1.1.5.3 Cirugía bariátrica	64
1.2 EL ÓRGANO ADIPOSO	66
1.2.1 Adipogénesis	66
1.2.1.1 Fase de compromiso.....	66
1.2.1.2 Fase de diferenciación	68
1.2.1.3 Moduladores de la señalización de adipogénesis: insulina e IGF1	70
1.2.2 Tejido adiposo blanco	72
1.2.1.1 Morfología.....	72

1.2.1.2	Localización	73
1.2.1.3	Funcionalidad.....	73
1.2.3	Tejido adiposo marrón	75
1.2.3.1	Morfología.....	75
1.2.3.2	Localización	76
1.2.3.3	Funcionalidad.....	77
1.2.4	Adipocitos <i>beige/brite</i>.....	79
1.3	TERMOGÉNESIS ADAPTATIVA: PAPEL DE LA MITOCONDRIA	81
1.3.1	Cadena respiratoria mitocondrial y UCP-1	83
1.3.2	El ciclo de la mitocondria: balance mitocondrial	87
1.3.2.1	Biogénesis mitocondrial.....	87
1.3.2.2	Dinámica mitocondrial.....	89
1.3.2.2.1	<i>Fusión</i>	90
1.3.2.2.2	<i>Fisión</i>	91
1.3.2.3	Mecanismo de control de calidad mitocondrial: Mitofagia.....	92
1.3.3	Modulación del balance mitocondrial por disponibilidad de nutrientes y su relación con el estado energético	96
1.4	EL TEJIDO ADIPOSO MARRÓN COMO TERAPIA CONTRA LA OBESIDAD	98
	HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	101
2.1	HIPÓTESIS.....	103
2.2	OBJETIVOS.....	104
	MATERIALES Y MÉTODOS.....	107
3.1	EXPERIMENTACIÓN CON ANIMALES.....	109
3.1.1	Trabajo con modelos animales	109
3.1.2	Diseño experimental de los modelos animales	110
3.1.2.1	Modelo BATIGF1RKO.....	110
3.1.2.2	Modelo BATOPA1KO	111
3.1.2.3	Modelo BATMFN1KO	112
3.1.2.4	Modelo UCP1-KO.....	112
3.1.3	Caracterización genética y proteica de los modelos animales.....	113
3.1.4	Técnicas empleadas en los modelos animales	114
3.1.4.1	Prueba de tolerancia a la glucosa (GTT).....	114
3.1.4.2	Prueba de tolerancia a la insulina (ITT)	114
3.1.4.3	Experimento de exposición al frío.....	115
3.1.4.4	Sacrificio de los animales de experimentación.....	115

3.2	TÉCNICAS MOLECULARES	116
3.2.1	Análisis de expresión de proteínas.....	116
3.2.1.1	Obtención y cuantificación de extractos proteicos.....	116
3.2.1.2	Western Blot (WB)	116
3.2.1.2.1	<i>Preparación de muestras y geles SDS-PAGE</i>	<i>116</i>
3.2.1.2.2	<i>Electroforesis en geles de SDS-PAGE.....</i>	<i>117</i>
3.2.1.2.3	<i>Transferencia a membranas de PVDF</i>	<i>117</i>
3.2.1.2.4	<i>Bloqueo e incubación con anticuerpos.....</i>	<i>117</i>
3.2.1.2.5	<i>Detección de anticuerpos por quimioluminiscencia</i>	<i>117</i>
3.2.1.2.6	<i>Borrado de membranas de PVDF.....</i>	<i>118</i>
3.2.2	Estudio de la respiración mitocondrial.....	118
3.2.2.1	Aislamiento de mitocondrias	118
3.2.2.2	Respirometría por tecnología O2k-Oroboros System	119
3.2.2.3	Potencial de membrana por tecnología O2k-Oroboros System	119
3.3	ESTUDIO HISTOLÓGICO	120
3.3.1	Preparación de los tejidos.....	120
3.3.1.1	Fijación, inclusión en parafina y obtención de cortes de tejido	120
3.3.1.2	Inclusión de tejidos en fresco en OCT y obtención de cortes de tejido ..	121
3.3.2	Tinciones histológicas	121
3.3.2.1	Hematoxilina y eosina	121
3.3.2.2	Inmunohistoquímica de tejidos adiposos (IHQ).....	122
3.3.2.3	Tinción de lípidos celulares con Oil-Red O.....	122
3.4	TÉCNICAS DE IMAGEN.....	123
3.4.1	Microscopía de campo claro.....	123
3.4.2	Microscopía electrónica de transmisión (TEM).....	123
3.4.3	Resonancia magnética nuclear (RMN).....	123
3.5	CUANTIFICACIÓN	124
3.6	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	125
3.7	MATERIALES	125
3.7.1	Listado de anticuerpos primarios	125
3.7.2	Listado de anticuerpos secundarios	126
3.7.3	Agentes farmacológicos	126
3.7.4	Reactivos comunes	126

RESULTADOS	127
4.1 ESTUDIO DE LA CONTRIBUCIÓN DE LA DINÁMICA MITOCONDRIAL Y LA MITOFAGIA EN LA CAPACIDAD TERMOGÉNICA DE RATONES CARENTES DEL RECEPTOR DE IGF-1 EN EL TEJIDO ADIPOSO MARRÓN	129
4.1.1 Estado mitocondrial en el modelo murino BATIGF1RKO en una situación basal.....	129
4.1.2 Capacidad termogénica y estudio proteico en el modelo BATIGF1RKO tras la exposición al frío.....	132
4.1.3 Análisis del estado y respiración mitocondrial del modelo BATIGF1RKO tras la exposición al frío.....	137
4.1.4 Estudio del mecanismo de control mitocondrial mitofagia en el modelo BATIGF1RKO tras la exposición al frío.....	140
4.1.5 Proceso de <i>browning</i> o marronización en los compartimentos de tejido adiposo blanco en el modelo BATIGF1RKO tras la exposición al frío.....	145
4.2 CONTRIBUCIÓN DE LA FUSIÓN MITOCONDRIAL EN LA TERMOGÉNESIS ADAPTATIVA	155
4.2.1 Perfil glucídico y análisis de la grasa corporal del modelo BATOPA1KO.....	155
4.2.2 Capacidad termogénica y estudio proteico en el modelo BATOPA1KO tras la exposición al frío.....	156
4.2.3 Análisis del estado mitocondrial y del mecanismo de control mitocondrial mitofagia en el modelo BATOPA1KO tras la exposición al frío	159
4.2.4 Proceso de <i>browning</i> o marronización en los compartimentos de tejido adiposo blanco en el modelo BATOPA1KO tras la exposición al frío.....	161
4.2.5 Evaluación de la activación prolongada vía farmacológica de la termogénesis adaptativa en el modelo BATOPA1KO	164
4.2.6 Efecto de la delección de MFN1 en la termogénesis adaptativa: estudio preliminar.....	172
4.3 EVALUACIÓN DE DIFERENTES COMPUESTOS DESACOPLANTES MITOCONDRIALES COMO NUEVOS ACTIVADORES SUGERIDOS DE UCP-1	175
4.3.1 Acción dependiente de UCP-1 de oleato en la respiración mitocondrial y el potencial de membrana	176
4.3.2 Acción independiente de UCP-1 de FCCP en la respiración mitocondrial y el potencial de membrana.....	180
4.3.3 Acción parcialmente dependiente de UCP-1 de DNP en la respiración mitocondrial y el potencial de membrana	183
4.3.4 Efecto de metil- β -ciclodextrina (M β CD) en la respiración de mitocondrias aisladas	189
DISCUSIÓN	191
CONCLUSIONES	201

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1 Clasificación de la obesidad en 6 grupos dependiendo del IMC presente en el individuo.....	50
Tabla 1.2 Fármacos anti-obesidad aprobados por la Agencia Europea del Medicamento (EMA).	64
Tabla 3.1 Cebadores utilizados para el genotipado de los modelos animales.	113
Tabla 3.2 Listado de anticuerpos primarios utilizados.	125
Tabla 3.3 Listado de anticuerpos secundarios utilizados.	126

ÍNDICE DE FIGURAS

INTRODUCCIÓN

Figura 1.1 Mapa mundial que muestra la prevalencia de la obesidad.	49
Figura 1.2 Remodelación del tejido adiposo cuando el balance energético es positivo y es mantenido en el tiempo como sucede en una situación de sobrealimentación y/o en la obesidad	56
Figura 1.3 Vía canónica de señalización Wnt/ β -catenina.	68
Figura 1.4 Linaje de adipocitos blancos, beige y marrones desde una célula madre mesenquimal y los marcadores moleculares involucrados en el desarrollo.....	69
Figura 1.5 (A) Esquema simplificado de la diferenciación de preadipocitos a adipocitos donde se indican los diferentes estadios y procesos involucrados. (B) Modelo secuencial del control transcripcional durante la adipogénesis	70
Figura 1.6 Cascada de señalización de insulina.....	71
Figura 1.7 Morfología del adipocito blanco	72
Figura 1.8 Localizaciones del órgano adiposo en el ratón (A) y en el humano (B).	73
Figura 1.9 Estructura del tejido adiposo marrón	76
Figura 1.10 Morfología del adipocito beige/brite.....	79
Figura 1.11 Circuito neuronal y reflejo de estiramiento implicado en el tiriteo	82
Figura 1.12 Esquema de la cadena de transporte de electrones (CTE) situada en la membrana mitocondrial interna	84
Figura 1.13 Plasticidad metabólica de la termogénesis	86
Figura 1.14 Cascadas de señalización implicadas en la biogénesis mitocondrial.....	88
Figura 1.15 Esquema general de los procesos de fusión y fisión mitocondrial	89
Figura 1.16 Vías principales de control de calidad mitocondrial	93
Figura 1.17 Mitofagia mediada por PINK-1/Parkina	94
Figura 1.18 Mecanismo de degradación común entre la mitofagia y autofagia.....	95
Figura 1.19 Estado energético de las mitocondrias dependiendo de la disponibilidad de nutrientes.	97

MATERIALES Y MÉTODOS

Figura 3.1 Tecnología Cre-recombinasa tejido-específica de BAT mediante el uso del promotor UCP-1 para la generación de los modelos murinos utilizados en esta tesis doctoral.	109
Figura 3.2 Diseños experimentales en el modelo BATIGF1RKO	111
Figura 3.3 Diseños experimentales en el modelo BATOPA1KO	111

Figura 3.4 Diseño experimental en el modelo BATMFN1KO	112
Figura 3.5 Diseño experimental en el modelo UCP1-KO	112
Figura 3.6 Ejemplo representativo de los resultados de las PCR y western blots obtenidas para genotipar a los modelos	114

RESULTADOS

Figura 4.1 Perfil glucídico basal del modelo BATIGF1RKO	130
Figura 4.2 Parámetros de adiposidad y peso corporal en el modelo BATIF1RKO	130
Figura 4.3 Análisis proteico de la dinámica mitocondrial en el iBAT del modelo BATIGF1RKO en una situación basal	131
Figura 4.4 Análisis proteico de la dinámica mitocondrial en los compartimentos de WAT del modelo BATIGF1RKO en una situación basal	132
Figura 4.5 Adaptación termogénica del modelo BATIGF1RKO	133
Figura 4.6 Aproximación del número de células en iBAT en el grupo control y en el modelo BATIGF1RKO tras la exposición al frío	134
Figura 4.7 Activación de la termogénesis adaptativa mediante el mecanismo canónico de UCP-1 en el modelo BATIGF1RKO tras la exposición al frío	135
Figura 4.8 Estudio proteico del contenido mitocondrial en el modelo BATIGF1RKO tras la exposición al frío	136
Figura 4.9 Evaluación de la actividad lipolítica en el modelo BATIGF1RKO tras la exposición al frío	137
Figura 4.10 Análisis proteico de la dinámica mitocondrial en el modelo BATIGF1RKO tras la exposición al frío	138
Figura 4.11 Estudio mitocondrial en el modelo BATIGF1RKO tras la exposición al frío	139
Figura 4.12 Respiración mitocondrial del modelo BATIGF1RKO tras la exposición al frío	140
Figura 4.13 Análisis proteico de la mitofagia en el modelo BATIGF1RKO tras la exposición al frío	141
Figura 4.14 Estudio del papel de la mitofagia en la termogénesis adaptativa del modelo BATIGF1RKO	142
Figura 4.15 Análisis proteico de la dinámica mitocondrial en el modelo BATIGF1RKO tras el tratamiento con cloroquina (CQ) y después de la exposición al frío o de la situación en termoneutralidad	143
Figura 4.16 Análisis proteico de la mitofagia en el modelo BATIGF1RKO tras la exposición al frío	144
Figura 4.17 Estudio proteico de la activación termogénica y de contenido mitocondrial en iWAT del modelo BATIGF1RKO tras la exposición al frío	146
Figura 4.18 Estudio proteico de la dinámica mitocondrial y mitofagia en iWAT del modelo BATIGF1RKO tras la exposición al frío	147
Figura 4.19 Estudio proteico de la activación termogénica y de contenido mitocondrial en eWAT del modelo BATIGF1RKO tras la exposición al frío	148
Figura 4.20 Estudio proteico de la dinámica mitocondrial y mitofagia en eWAT del modelo BATIGF1RKO tras la exposición al frío	149
Figura 4.21 Estudio proteico de la activación termogénica y de contenido mitocondrial en rWAT del modelo BATIGF1RKO tras la exposición al frío	150
Figura 4.22 Estudio proteico de la dinámica mitocondrial y mitofagia en rWAT del modelo BATIGF1RKO tras la exposición al frío	151

Figura 4.23 Estudio proteico de la activación termogénica y de contenido mitocondrial en mWAT del modelo BATIGF1RKO tras la exposición al frío.....	152
Figura 4.24 Estudio proteico de la dinámica mitocondrial en mWAT del modelo BATIGF1RKO tras la exposición al frío.....	152
Figura 4.25 Estudio proteico aproximado de la lipólisis en WAT del modelo BATIGF1RKO tras la exposición al frío.	153
Figura 4.26 Perfil glucídico basal del modelo BATOPA1KO	155
Figura 4.27 Parámetros de adiposidad y peso corporal en el modelo BATIF1RKO.....	156
Figura 4.28 Adaptación termogénica del modelo BATOPA1KO	157
Figura 4.29 Aproximación del número de células en iBAT en el grupo control y en el modelo BATOPA1KO tras la exposición al frío	158
Figura 4.30 Activación de la termogénesis adaptativa mediante el mecanismo canónico de UCP-1 en el modelo BATOPA1KO tras la exposición al frío	158
Figura 4.31 Estudio proteico del contenido mitocondrial en el modelo BATOPA1KO tras la exposición al frío.....	159
Figura 4.32 Análisis proteico de la dinámica mitocondrial y mitofagia en el modelo BATOPA1KO tras la exposición al frío	160
Figura 4.33 Estudio proteico de la activación termogénica y de contenido mitocondrial en iWAT del modelo BATOPA1KO tras la exposición al frío	161
Figura 4.34 Estudio proteico de la dinámica mitocondrial y mitofagia en iWAT del modelo BATOPA1KO tras la exposición al frío	162
Figura 4.35 Estudio proteico de la activación termogénica, biogénesis mitocondrial y de contenido mitocondrial en eWAT del modelo BATOPA1KO tras la exposición al frío	163
Figura 4.36 Estudio proteico de la dinámica mitocondrial y mitofagia en eWAT del modelo BATOPA1KO tras la exposición al frío	164
Figura 4.37 Estudio proteico de la activación termogénica y de contenido mitocondrial en iBAT del modelo BATOPA1KO tras el tratamiento con el agonista β 3-adrenérgico CL-316243.....	165
Figura 4.38 Estudio proteico de la dinámica mitocondrial y mitofagia en iBAT del modelo BATOPA1KO tras el tratamiento con el agonista β 3-adrenérgico CL-316243.....	167
Figura 4.39 Estudio mitocondrial en el modelo BATOPA1KO tras el tratamiento con el agonista β 3-adrenérgico CL-316243.....	168
Figura 4.40 Evaluación de la actividad lipolítica en el modelo BATIGF1RKO tras el tratamiento con el agonista β 3-adrenérgico CL-316243.....	169
Figura 4.41 Estudio proteico de la activación termogénica y de contenido mitocondrial en iWAT del modelo BATOPA1KO tras el tratamiento con el agonista β 3-adrenérgico CL-316243.....	170
Figura 4.42 Estudio proteico de la dinámica mitocondrial y mitofagia en iWAT del modelo BATOPA1KO tras el tratamiento con el agonista β 3-adrenérgico CL-316243.....	171
Figura 4.43 Perfil glucídico basal del modelo BATMFN1KO.....	172
Figura 4.44 Adaptación termogénica del modelo BATMFN1KO	173
Figura 4.45 Estudio proteico de la activación termogénica y del contenido mitocondrial en iBAT del modelo BATMFN1KO tras la exposición al frío.....	174
Figura 4.46 Estudio proteico de la dinámica mitocondrial y mitofagia en iBAT del modelo BATMFN1KO tras la exposición al frío	174

Figura 4.47 Parámetros de calidad mitocondrial en el modelo UCP1-KO	176
Figura 4.48 Respiración de mitocondrias aisladas en el modelo UCP1-KO ante el estímulo del ácido graso oleato	177
Figura 4.49 Respiración de mitocondrias aisladas en el modelo UCP1-KO y el grupo WT ante el estímulo del ácido graso oleato	178
Figura 4.50 Evaluación del potencial de membrana de mitocondrias aisladas en el modelo UCP1-KO ante el estímulo del ácido graso oleato	179
Figura 4.51 Evaluación del potencial de membrana de mitocondrias aisladas en el modelo UCP1-KO y el grupo WT ante el estímulo del ácido graso oleato.....	180
Figura 4.52 Respiración de mitocondrias aisladas en el modelo UCP1-KO ante el estímulo de FCCP	181
Figura 4.53 Respiración de mitocondrias aisladas en el modelo UCP1-KO y el grupo WT ante el estímulo de FCCP	182
Figura 4.54 Evaluación del potencial de membrana de mitocondrias aisladas en el modelo UCP1-KO ante el estímulo de FCCP.....	182
Figura 4.55 Evaluación del potencial de membrana de mitocondrias aisladas en el modelo UCP1-KO y el grupo WT ante el estímulo de FCCP.....	183
Figura 4.56 Respiración de mitocondrias aisladas en el modelo UCP1-KO ante el estímulo de DNP	184
Figura 4.57 Respiración de mitocondrias aisladas en el modelo UCP1-KO y el grupo WT ante el estímulo de DNP	185
Figura 4.58 Evaluación del potencial de membrana de mitocondrias aisladas en el modelo UCP1-KO ante el estímulo de DNP.....	186
Figura 4.59 Evaluación del potencial de membrana de mitocondrias aisladas en el modelo UCP1-KO y el grupo WT ante el estímulo de DNP	186
Figura 4.60 Estudio comparativo de respiración y potencial de membrana de mitocondrias aisladas en el modelo UCP1-KO y el grupo WT ante el estímulo dependiente de UCP-1 oleato para determinar el mecanismo de acción de DNP	187
Figura 4.61 Estudio comparativo de respiración y potencial de membrana de mitocondrias aisladas en el grupo WT ante el estímulo dependiente de UCP-1 oleato a diferentes concentraciones de GDP para determinar el mecanismo de acción de DNP	188
Figura 4.62 Respiración mitocondrial y despolarización de membrana de mitocondrias aisladas en el grupo WT y el modelo UCP1-KO ante diferentes desacoplantes	189
Figura 4.63 Respiración mitocondrial de mitocondrias aisladas en el grupo WT y el modelo UCP1-KO en un medio con M β CD.....	190

RESUMEN

PAPEL DE LOS MECANISMOS DE DINÁMICA Y CONTROL DE CALIDAD MITOCONDRIALES EN LA TERMOGÉNESIS ADAPTATIVA

INTRODUCCIÓN

La obesidad es un problema sanitario de carácter pandémico con complicaciones tales como la resistencia a insulina o la diabetes. El tejido adiposo marrón (BAT) es protagonista en la regulación de la adiposidad y peso corporal a través de la termogénesis sin tiriteo (TST). Su papel en el adulto ha sido desconsiderado, pero gracias a la aparición de una serie de estudios PET-CT, se ha demostrado que el BAT está presente y es funcional en los adultos, estableciéndose una correlación inversa entre el índice de masa corporal y la presencia de depósitos de grasa marrón. Por ello, la activación del gasto energético a través del BAT se ha convertido en una terapia anti-obesidad en la actualidad.

La mitocondria juega un papel central en la energética de las células eucarióticas, siendo clave su biogénesis en la TST. Tradicionalmente, la termogénesis del BAT se ha basado en la actividad de la proteína desacoplante UCP-1 a través de la inhibición del gradiente protón-motriz implicado en la conservación de la energía asociada a la cadena respiratoria mitocondrial. Sin embargo, actualmente se ha comprobado que la dinámica mitocondrial participa activamente en la amplificación del gasto energético durante la adaptación a situaciones de restricción calórica, activando la fusión mitocondrial, o de exceso de disponibilidad energética, activando la fisión.

No obstante, la contribución tanto de la dinámica mitocondrial como de los mecanismos de control de la integridad mitocondrial a la termogénesis del BAT es casi desconocida.

Por ello, la hipótesis planteada en esta tesis doctoral fue:

“La dinámica mitocondrial, además de desempeñar su función sobre la plasticidad de las mitocondrias, contribuye en la termogénesis adaptativa de ratones mediante la generación de calor durante el proceso de fisión mitocondrial, con el consiguiente aumento del gasto energético tisular.”

OBJETIVOS

Los principales objetivos del presente trabajo fueron:

1. Valoración del efecto de la dinámica mitocondrial y mitofagia en la capacidad termogénica de ratones carentes del receptor de IGF-1 en el tejido adiposo marrón.
2. Estudio de la contribución de la fusión mitocondrial en la termogénesis adaptativa.

3. Evaluación de diferentes compuestos desacoplantes mitocondriales (FCCP y DNP) como nuevos activadores sugeridos de UCP-1

MATERIAL Y MÉTODOS


Para el desarrollo de los objetivos se han utilizado diferentes modelos animales los cuales fueron generados mediante la técnica de la Cre-recombinasa bajo el promotor de UCP-1, salvo en el caso del último objetivo que derivó del generado previamente por Enerbäck *et al.*, 1997.

En el caso del primer objetivo se usó un modelo murino carente del receptor de IGF-1 (IGF-1R) específicamente en el BAT recibiendo el nombre de BATIGF1RKO, mientras que para el segundo objetivo se generaron dos modelos animales carentes de diferentes proteínas de fusión: de membrana interna OPA-1 (BATOPA1KO) y de membrana externa MFN-1 (BATMFN1KO), también específicos de BAT. Por último, el modelo UCP1-KO fue el objeto de estudio para la realización del tercer objetivo.

En los modelos BATIGF1RKO, BATOPA1KO y BATMFN1KO se estudiaron las vías implicadas en la termogénesis adaptativa, analizando el efecto de diferentes estímulos como el frío o la activación farmacológica β 3-adrenérgica en la dinámica mitocondrial y en los mecanismos de autofagia, a través del estudio de expresión de proteínas mediante Western Blot, respirometría, técnicas de microscopía electrónica e histológicas. Además, se utilizó una diversidad metodológica para evaluar su estatus metabólico, como son los test de tolerancia a la glucosa/insulina o la resonancia magnética nuclear, llevándose a cabo experimentos de exposición al frío. Finalmente, se evaluó la acción de diferentes desacoplantes químicos (oleato sódico, FCCP y DNP) en la respiración de mitocondrias aisladas del modelo UCP1-KO.

RESULTADOS

Los resultados de la primera parte sugieren que la fisión mitocondrial en BAT mejora la adaptación termogénica del modelo BATIGF1RKO, el cual presentó mitocondrias fragmentadas y mostró un aumento en la respiración basal y máxima de las mismas. Además, existió un ligero incremento de la expresión de UCP-1 acompañado de un aumento de la masa mitocondrial, y la lipólisis se encontró activa en BATIGF1RKO tras la exposición al frío, considerándose procesos fundamentales en la termogénesis. El impedimento de la autofagia por la administración de cloroquina (CQ) demostró la importancia de la mitofagia en la adaptación al frío y planteó la fusión mitocondrial como mecanismo protector de la misma. Asimismo, el análisis del pardeamiento de diferentes compartimentos de tejido adiposo blanco indicó una activación aumentada de este proceso en los animales BATIGF1RKO tras la exposición al frío.



En cuanto al modelo murino BATOPA1KO, se determinó un menor porcentaje de grasa corporal que no afectó a la homeostasis glucídica ni al peso corporal de los animales. Además, la delección de OPA-1 en BAT no alteró la adaptación termogénica de dichos animales y promovió una hipertrofia del tejido adiposo marrón como mecanismo compensatorio. No obstante, el tratamiento farmacológico con el agonista β 3-adrenérgico CL-316243 incrementó la expresión de UCP-1 y favoreció la fusión mitocondrial en BAT de los animales *knock-out*, que exhibieron una tendencia al estado fisionado cuando no fueron tratados con este fármaco. Por otro lado, la delección de MFN-1 en BAT conllevó una adaptación termogénica inadecuada al frío. Dicha severa inadaptación al frío sugiere que la fusión previa de las mitocondrias es necesaria para que la fisión pueda tener lugar.

Por último, el estudio de la acción diferentes compuestos químicos en las mitocondrias aisladas de ratones WT y UCP1-KO propuso vías independientes de UCP-1 en el desacoplamiento de la respiración mitocondrial, apoyando que UCP-1 no es el único mecanismo termogénico en BAT.

CONCLUSIONES

La dinámica mitocondrial juega un papel fundamental en la termogénesis adaptativa, considerándose la fisión mitocondrial como un mecanismo generador de calor durante la exposición al frío mientras que la fusión mitocondrial desempeña una función protectora del daño ocasionado en el mantenimiento de la temperatura corporal, contribuyendo así a la propia termorregulación del organismo.

Además, algunos de los agentes desacoplantes mitocondriales más potentes como el FCCP y el DNP actúan sin necesidad de que UCP-1 se encuentre activa, lo que resalta la importancia de los mecanismos independientes de UCP-1 en la termogénesis adaptativa.

Palabras clave: Termogénesis adaptativa, tejido adiposo marrón, modelos murinos, *knock-out*, dinámica mitocondrial, mitofagia y respiración mitocondrial.

ABSTRACT



ROLE OF MITOCHONDRIAL DYNAMICS AND QUALITY CONTROL MECHANISMS IN ADAPTIVE THERMOGENESIS

INTRODUCTION

Obesity stands as a widespread health issue, bringing complications like insulin resistance and diabetes to the forefront. Brown adipose tissue (BAT) plays a leading role in the regulation of adiposity and body weight through non-shivering thermogenesis (NST). While the role of BAT in adults has been somewhat overlooked, PET-CT studies have revealed its presence and functionality in adults. These studies establish an inverse correlation between body mass index and the presence of brown fat depots. Consequently, activating energy expenditure via BAT has become a favoured approach in anti-obesity therapy.

Mitochondria play a pivotal role in the energetics of eukaryotic cells, with their biogenesis during NST being crucial. Traditionally, BAT thermogenesis has been linked to the expression and anchoring of the uncoupling protein UCP-1, inhibiting the proton-motor gradient involved in conserving energy associated with the mitochondrial respiratory chain. However, recent knowledge indicates that mitochondrial dynamics actively contribute to amplifying energy expenditure during caloric restriction. This involves activating mitochondrial fusion during excess energy availability and promoting fission.

Despite this, the contribution of both mitochondrial dynamics and mitochondrial integrity control mechanisms to BAT thermogenesis remains relatively unknown.

Therefore, the hypothesis presented in this thesis is:

"Mitochondrial dynamics, beyond their role in mitochondrial plasticity, contribute to the adaptive thermogenesis of mice by generating heat during the mitochondrial fission process, resulting in an increase in tissue energy expenditure."

OBJECTIVES

The main objectives of this work were:

1. Assess the impact of mitochondrial dynamics and mitophagy on the thermogenic capacity of mice lacking the IGF-1 receptor in brown adipose tissue.
2. Analyze the contribution of mitochondrial fusion to adaptive thermogenesis.
3. Evaluate different mitochondrial uncoupling compounds (FCCP and DNP) as potential new activators of UCP-1

MATERIAL AND METHODS

For the development of the objectives, different animal models were utilized, which were generated using the Cre-recombinase technique under the UCP-1 promoter, except for the case of the last objective, which derived from the model previously generated by Enerbäck *et al.*, 1997.


In the case of the first objective, a murine model lacking the IGF-1 receptor (IGF-1R) specifically in BAT was used, named BATIGF1RKO. For the second objective, two animal models were generated lacking different fusion proteins: OPA-1 for the inner membrane (BATOPA1KO) and MFN-1 for the outer membrane (BATMFN1KO), both specific to BAT. Finally, the UCP1-KO model was the object of study for the accomplishment of the third objective.

In the BATIGF1RKO, BATOPA1KO, and BATMFN1KO models, the pathways involved in adaptive thermogenesis were studied, analyzing the effect of different stimuli such as cold or β 3-adrenergic pharmacological activation on mitochondrial dynamics and autophagy mechanisms. This was done through the study of protein expression using Western Blot, respirometry, electron microscopy, and histological techniques. In addition, a variety of methodologies were used to assess their metabolic status, such as glucose/insulin tolerance tests or nuclear magnetic resonance imaging, and cold exposure experiments were carried out. Finally, the action of different chemical uncouplers (sodium oleate, FCCP and DNP) on the respiration of mitochondria isolated from the UCP1-KO model was evaluated.

RESULTS

The results of the first part suggest that mitochondrial fission in BAT improves the thermogenic adaptation of the BATIGF1RKO model, which presented fragmented mitochondria and showed an increase in basal and maximal respiration of the mitochondria. In addition, there was a slight increase in UCP-1 expression accompanied by an increase in mitochondrial mass, and lipolysis was found active in BATIGF1RKO after exposure to cold, being considered fundamental processes in thermogenesis. The inhibition of autophagy by the administration of chloroquine (CQ) demonstrated the importance of mitophagy in adaptation to cold and proposed mitochondrial fusion as a protective mechanism for it. Likewise, the analysis of the *browning* of different compartments of white adipose tissue concluded an increased activation of this process in the animals BATIGF1RKO after exposure to cold.

As for the BATOPA1KO murine model, a lower percentage of body fat was determined, which did not affect the glucose homeostasis or body weight of the animals. In addition, the deletion of OPA-1 in BAT did not alter the thermogenic adaptation of these animals and promotes a hypertrophy of brown adipose tissue as a compensatory mechanism. However, pharmacological treatment with the β 3-



adrenergic agonist CL-316243 increased UCP-1 expression and favoured mitochondrial fusion in BAT in *knock-out* mice, which exhibited a tendency to the fragmented state when not treated with this drug. On the other hand, the deletion of MFN-1 in BAT led to an inadequate thermogenic adaptation to cold. Such severe inadaptation to cold suggests that prior fusion of mitochondria is necessary for fission to take place.

Finally, the study of the action of different chemical compounds on mitochondria isolated from WT and UCP1-KO mice proposed UCP-1-independent pathways in the uncoupling of mitochondrial respiration, supporting that UCP-1 is not the only thermogenic mechanism in BAT.

CONCLUSIONS

Mitochondrial dynamics emerge as pivotal in adaptive thermogenesis, with mitochondrial fission considered a heat-generating mechanism during cold exposure, while mitochondrial fusion serves a protective function in maintaining body temperature, contributing to the body's thermoregulation.

Notably, potent mitochondrial uncouplers such as FCCP and DNP act independently of UCP-1, underscoring the importance of UCP-1-independent mechanisms in adaptive thermogenesis.

Keywords: Adaptive thermogenesis, brown adipose tissue, murine models, *knock-out*, mitochondrial dynamics, mitophagy and mitochondrial respiration.

ABREVIATURAS



ADP adenosín difosfato

ADRB3 receptor β 3-adrenérgico

AGL ácidos grasos libres

AKT proteína quinasa B

AMPc adenosín monofosfato cíclico

APC adenomatosis poliposis coli

ATP adenosín trifosfato

BAT tejido adiposo marrón

BMPs factores morfogénéticos óseos

BMPr receptor de factores morfogénéticos óseos

BNIP3 proteína 3 de interacción con Bcl2 y proteínas de adenovirus E1B de 19kDa

C/EBPs proteínas potenciadoras de unión a CCAAT

CATR carboxiatractilósido

CC circunferencia de la cadera

CQ cloroquina

CREB factor de transcripción de unión a elementos de respuesta a AMPc

CTE cadena de transporte de electrones o cadena respiratoria mitocondrial

Dio2 deiodinasa 2

DNP 2,4-dinitrofenol

DRP-1 proteína relacionada con la dinamina 1

EHGNA enfermedad de hígado graso no alcohólico

EMA Agencia Europea del Medicamento

eWAT tejido adiposo blanco epididimal

FCCP carbonilcianida-4trifluorometoxifenilhidrazona

FGF2/21 factor de crecimiento de fibroblastos 1/21

FIS-1 proteína homóloga a la fisión 1

FOXOs proteínas O de la familia “*forkhead*” con dominios tipo caja

FZD receptores “*frizzled*”

GLUT4 transportador de glucosa 4

GSK-3 β glucógeno sintasa quinasa 3 β

HDL lipoproteínas de alta densidad

HIF-1 α factor de transcripción inducido por hipoxia 1 α

HIIT entrenamientos de intervalos de alta intensidad

iBAT tejido adiposo marrón interescapular

ICC índice cintura-cadera

ICT índice cintura-talla

IGF1-R receptor del factor de crecimiento insulínico 1

IGFs/1 factores de crecimiento insulínico/1

IL-1/6 interleuquina 1/6

IMC índice de masa corporal

IR receptor a insulina

IRS1 sustratos del receptor de insulina

iWAT tejido adiposo blanco inguinal

JNK c-Jun N-terminal quinasa

Kcal/g kilocalorías por gramo

Kg kilogramos

KO “*knock-out*”

LDL lipoproteínas de baja densidad

LRP5/6 receptor de LDL 5/6

MAM membranas asociadas a mitocondrias

MFF factor de fisión mitocondrial

MFN-1/2 mitofusinas 1/2

MiD49/51 proteínas dinámicas mitocondriales de 49/51 kDa


mtADN ADN mitocondrial

mTORC1 complejo 1 de la diana de rapamicina en células de mamífero

mWAT tejido adiposo blanco mesentérico

MX1 myxovirus 1

M β CD metil- β -ciclodextrina



NE norepinefrina

NF- κ B factor nuclear κ B

NGF factor de crecimiento nervioso

NIX proteína X de tipo Nip-3

NO óxido nítrico

NRF1/2 factores nucleares de respiración

NRG-4 neuregulina 4

ObMA obesidad metabólicamente anormal

ObM-PN obesidad metabólicamente anormal con peso normal

ObMS obesidad metabólicamente sana

OCT “*optimum cutting temperature*”

OctCar octanoil-l-carnitina

OMS Organización Mundial de la Salud

OXPHOS fosforilación oxidativa

p38/MAPK proteína quinasa activada por mitógenos p38

PCr fosfocreatina

PDGFR α/β receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas- α/β

PDH piruvato deshidrogenasa

PET-CT tomografía de emisión de positrones y computarizada

PGC-1 α coactivador del receptor γ activado por el proliferador de peroxisomas 1- α

PI3K fosfatidilinositol-3 quinasa

PPAR- γ receptor activado por proliferadores de peroxisomas γ

PRDM16 factor de transcripción PR/SET *Domain* 16

RBP-4 proteína de unión al retinol 4

RE retículo endoplasmático

ROS especies reactivas de oxígeno

rWAT tejido adiposo blanco retroperitoneal

RyR2 receptor de rianodina 2

SAT tejido adiposo blanco subcutáneo

SDS dodecilsulfato sódico

SERCA2b ATPasa 2b de Ca²⁺ del retículo sarco/endoplásmico

SNS sistema nervioso simpático

subBAT tejido adiposo marrón subescapular

supraBAT tejido adiposo marrón supraclavicular

T3 triiodotironina

TAC tomografía axial computarizada

TAGLN transgelina

TCA ciclo del ácido tricarbóxico o ciclo de Krebs

TCF/LEF-1 factor potenciador linfoide 1

TCT termogénesis con tiriteo

TDHA déficit de atención con hiperactividad

TFAM factor de transcripción mitocondrial A

TID termogénesis inducida por dieta

TIF termogénesis inducida por frío

TLR2/4 receptores “*toll-like*” 2/4

TMRM éster metílico de tetrametilrhodamina

TNF- α factor de necrosis tumoral α

TST termogénesis sin tiriteo

UCP-1 proteína desacoplante 1

VAT tejido adiposo blanco visceral

VEGFA factor de crecimiento endotelial vascular

VLDL lipoproteínas de muy baja densidad

WAT tejido adiposo blanco

WT “*wild type*”

WT1 factor tumorigénico Wilms 1

INTRODUCCIÓN

***“Lo que haces marca la diferencia, y tienes que decidir
qué tipo de diferencia quieres marcar.”***

Jane Goodall

Etóloga

1.1 OBESIDAD: UNA PANDEMIA DEL SIGLO XXI

1.1.1 La obesidad en la actualidad

La obesidad es una enfermedad de etiología multifactorial caracterizada por una acumulación excesiva o una distribución anormal de grasa en el organismo. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), en el año 2022 más de mil millones de personas en el mundo padecían esta enfermedad; entre ellas, 650 millones eran adultos; 340 millones, adolescentes; y 39 millones, niños.

Desde los años 70, la prevalencia de esta enfermedad hasta ahora ha ido en aumento en sociedades occidentales alcanzando un valor actual aproximado entre 20-30% en Europa (**Figura 1.1**). Esto se ha debido a un aumento en el consumo de dietas hipercalóricas y a la implantación de un estilo de vida sedentario ya sea causado por la urbanización de nuevas zonas como de la creación de nuevos medios de transporte o puestos de trabajos que acentúan este estilo de vida.

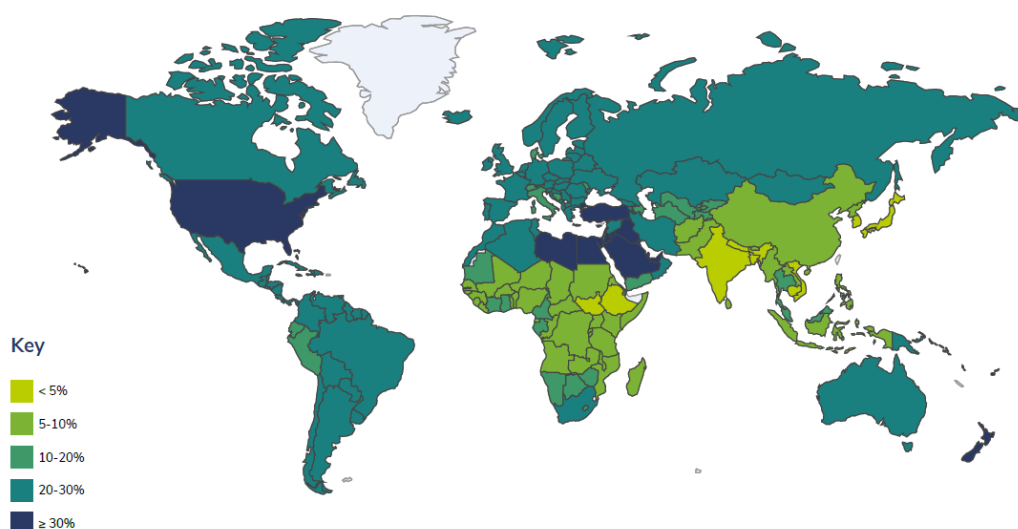


Figura 1.1 Mapa mundial que muestra la prevalencia de la obesidad. Los países del primer mundo presentan altos porcentajes de personas que padecen obesidad con un valor indicativo del Índice de Masa Corporal $\geq 30\text{kg/m}^2$. Fuente: Global Health Observatory Data Repository (OMS, 2023).

Respecto a su etiología variada, se han descrito varios factores que están involucrados en el desarrollo de la obesidad: genéticos, ambientales y socioeconómicos, existiendo una relación entre ellos (Pérez-Campos Mayoral *et al.*, 2020; Hill, Catenacci & Wyatt, 2005; Cawley, 2004). Por ejemplo, se ha descrito que la dieta, la falta de ejercicio, la comida rápida y/o la microbiota, pueden alterar la expresión génica (Muñoz Yáñez, García-Vargas & Pérez-Morales, 2017). Además, estos factores ambientales se relacionan a su vez con un diferente estatus socioeconómico individual. Los productos ultraprocesados o aquellos con un alto contenido en azúcares y grasas son los más baratos de encontrar así como las diferentes situaciones personales, como por ejemplo hacer deporte en un gimnasio, que afectan al presupuesto económico (Popkin, 2012; Cawley, 2004).

Uno de los grandes problemas asociados a la obesidad es la amplia variedad de complicaciones que pueden aparecer y que se explicarán en el **apartado 1.1.4** más detalladamente. Por ello, se han desarrollado diferentes planes de acción para combatir esta patología, en los que se encuentran como primera línea de acción cambios en los hábitos alimenticios y/o aumento en la actividad física diaria. No obstante, en algunas ocasiones se requieren terapias farmacológicas o recurrir a alguna de las cirugías bariátricas para tratar esta enfermedad.

1.1.2 Clasificación de la obesidad

Debido a la gran complejidad que conlleva la obesidad, existen varias clasificaciones cuyos criterios difieren entre sí dependiendo del método de análisis utilizado.

1.1.2.1 Índice de Masa Corporal (IMC)

La primera clasificación se basa en el parámetro más usado en la clínica: el Índice de Masa Corporal (IMC). El IMC se calcula a partir del peso y la altura del individuo siendo esta su ecuación: **IMC = Peso (kg)/altura²(m)**

Según el resultado, la OMS describe 6 grupos (**Tabla 1.1**):

Estatus nutricional	IMC (kg/m ²)
Bajo peso	< 18.5
Normopeso	18.5-24.9
Sobrepeso	25.0-29.9
Obesidad Clase I	30.0-34.9
Obesidad Clase II	35.0-39.9
Obesidad Clase III	> 40

Tabla 1.1 Clasificación de la obesidad en 6 grupos dependiendo del IMC presente en el individuo. El IMC se calcula a partir del peso corporal en kilogramos y la altura en metros. Fuente: OMS, 2023.

Puesto que el IMC no mide específicamente la grasa corporal de un individuo y es un parámetro matemático, han surgido varios estudios enfocados en su precisión en cuanto a la evaluación de la obesidad (Romero-Corral *et al.*, 2008; Romero-Corral *et al.* 2007; Blew *et al.*, 2002; Smalley *et al.*, 1990). En ellos, se concluye que el IMC es una herramienta de diagnóstico limitada para identificar correctamente aquellos individuos con alto porcentaje de grasa corporal, especialmente los que pertenecen a los grupos de IMC por debajo de 30 kg/m². Aunque el IMC está correlacionado directamente con el porcentaje de grasa corporal, no diferencia entre masa grasa o grasa adiposa y masa magra, siendo la última la mayoritaria en el cuerpo humano. Por ejemplo, un atleta que presenta bajo porcentaje de masa grasa y mayor masa magra puede clasificarse como una persona con sobrepeso o, incluso, obesa si sólo se utiliza el IMC como criterio. Además, utilizando sólo el IMC como marcador de obesidad, se clasifica erróneamente más del 50% de pacientes

con exceso de grasa corporal como normopeso o con sobrepeso (Romero-Corral *et al.*, 2008).

1.1.2.2 Medidas antropométricas

Estos parámetros se suelen utilizar junto al IMC para una clasificación más adecuada de la obesidad puesto que nos permiten calcular la cantidad de grasa del paciente.

❖ Índice Cintura-Cadera (ICC)

Gracias a esta medida, se puede estimar la grasa abdominal de un individuo. Este índice es la relación entre el perímetro de la cintura y la cadera, siendo su ecuación la siguiente:

$$\text{ICC} = \text{perímetro de la cintura (cm)} / \text{perímetro de la cadera (cm)}$$

Según la OMS, valores entre 0.96-0.99 en hombres y 0.81-0.84 en mujeres se consideran normales. Aquellos valores por encima de estos estarían indicando una acumulación de grasa abdominal que podría estar asociada a un mayor riesgo de síndrome metabólico. Es el segundo parámetro más utilizado en las clasificaciones de la obesidad, después del IMC.

❖ Circunferencia de la cintura (CC)

Este parámetro es el perímetro abdominal medido en centímetros, en una posición relajada y a la altura del ombligo. La OMS estipula que el valor máximo saludable de CC es 88 cm para mujeres y 102 cm para hombres.

Según el Consenso SEEDO 2007 para la evaluación del sobrepeso y la obesidad, el perímetro de la cintura es mejor indicador de la grasa visceral y de sus cambios con la pérdida de peso que el ICC.

❖ Índice Cintura-Talla (ICT)

El ICT se define como el cociente entre CC y la altura en centímetros. Valores por encima de 0.50 se asocian a la obesidad.

Varios estudios han concluido que este parámetro permanece estable durante el crecimiento, pudiéndose utilizar en la niñez o en la edad adulta sin cambiar los valores normales (Mihalopoulos *et al.*, 2010). Además, tiene un mayor éxito en la detección del síndrome metabólico que otras medidas antropométricas como el ICC (Freedman *et al.*, 2009; Schwandt, Bertsch & Haas, 2010).

1.1.2.3 Localización de la grasa

Dependiendo de la localización mayoritaria del tejido adiposo, la obesidad se puede clasificar en dos tipos (Lee, Wu & Fried, 2013):

❖ Obesidad androide o con forma de manzana

Se caracteriza por la acumulación de grasa en la zona abdominal, por lo que también recibe el nombre de obesidad visceral o central. Se suele asociar con un incremento en el riesgo de padecer complicaciones metabólicas.

❖ Obesidad ginecoide o con forma de pera

La principal localización de acumulación de grasa en este tipo es en la región gluteofemoral y en las caderas, por lo que también se denomina obesidad periférica. En este caso, el riesgo metabólico se ve reducido.

1.1.2.4 Metabolismo

Dentro del grupo de pacientes con obesidad, se pueden distinguir varios fenotipos enfocados en el metabolismo del individuo:

❖ Obesidad metabólicamente sana (ObMS)

Aunque este grupo ha sido estudiado ampliamente, no existe una definición clara del mismo. También llamado como obesidad metabólicamente benigna, se caracteriza por un IMC > 30 kg/m² pero sin presentar ningún componente de riesgo metabólico como dislipidemia, resistencia a insulina o hipertensión (Wildman *et al.*, 2008). Aproximadamente, la prevalencia de este fenotipo varía entre el 10-40% entre los pacientes con obesidad, siendo mayoritario en mujeres. (Bosello, Donataccio & Cuzzolaro, 2016; Pérez-Campos Mayoral *et al.*, 2020; Bluher, 2010; Boonchaya-anant & Apovian, 2014). Por lo general, los pacientes de este subgrupo presentan valores similares a la población no obesa en cuanto a niveles de insulina, índice de resistencia a insulina por el método de evaluación de la homeostasis (HOMA-IR) y/o niveles de interleuquina 6 (IL-6) (Phillips & Perry, 2013).

Varios trabajos sugieren que este fenotipo metabólicamente sano no es una condición benigna *per se*. Se ha observado que individuos con ObMS presentan mayor riesgo de desarrollar síndrome metabólico, enfermedades cardiovasculares o diabetes cuando se comparan con el grupo sano (Bradshaw, Monda & Stevens, 2013; Aung *et al.*, 2014). Además, la mayoría de los pacientes de este subgrupo acaban desarrollando obesidad metabólica anormal (ObMA), de la que se hablará posteriormente, pudiendo describirse así a la ObMS como un fenotipo transitorio (Kramer, Zinman & Retnakaran, 2013; Bosello, Donataccio & Cuzzolaro, 2016). Por ello, la ObMS ha adquirido gran interés como foco de estudio en los últimos años ya que se puede ser la situación idónea para revertir la obesidad antes del desarrollo de alguna complicación asociada a la misma.

❖ Obesidad metabólicamente anormal (ObMA)

Al igual que en la ObMS, este tipo se caracteriza por un IMC > 30 kg/m² pero, en este caso, la grasa se encuentra localizada en la zona abdominal (obesidad central) y los pacientes han desarrollado síndrome metabólico, diabetes o alguna enfermedad cardiovascular (Bosello, Donataccio & Cuzzolaro, 2016). Este subgrupo correspondería a la descripción generalizada de la obesidad en la que los pacientes presentan parámetros alterados como hipertensión arterial, altos valores de triglicéridos y/o resistencia a insulina.

❖ Obeso metabólicamente de peso normal (ObM-PN)

La primera vez que se introdujo este concepto fue en el año 1981 cuando se describió a un grupo de diabéticos con hipertensión e hipertrigliceridemia que respondían a restricción calórica sin ser obesos (Ruderman, Schneider & Berchtold, 1981). Aunque no existe una definición clara de este grupo, los individuos pertenecientes al mismo se caracterizan por tener un IMC < 25 kg/m² y presentar dos o más complicaciones metabólicas (Aung *et al.*, 2014).

Gracias a esta variedad de parámetros para la clasificación de la obesidad, se puede considerar que el IMC es una herramienta muy útil en su diagnóstico, pero se debería utilizar junto con otros criterios para estimar el riesgo sanitario que supone la acumulación de grasa en el individuo y poder actuar de manera personalizada frente a la misma, así como prevenir aquel grupo que presenta un riesgo de desarrollo de la enfermedad.

1.1.3 Fisiopatología de la obesidad

Un principio fundamental en nutrición y metabolismo es el **balance energético**, que se entiende como un equilibrio entre el número de calorías consumidas y quemadas metabólicamente. Se ha demostrado que un desequilibrio en este está ampliamente relacionado con los cambios en el peso corporal y, por consiguiente, con el desarrollo de la obesidad (Hill, 2006; Hall *et al.*, 2012).

Puesto que la energía ni se crea ni destruye sólo se transforma según la primera ley de la termodinámica, el almacenamiento energético se puede definir como:

$$\text{Almacenamiento energético} = \text{Ingesta calórica} - \text{Gasto energético}$$

donde la **ingesta calórica** es el sumatorio de las distintas densidades energéticas (kcal/g) de los alimentos ingeridos (aproximadamente 4.7 kcal/g de alimento para proteínas, 4.2 kcal/g para carbohidratos y 9.7 kcal/g para grasas); y el **gasto energético** es el sumatorio de la energía consumida por la *tasa metabólica basal*, la *actividad física* y la *termogénesis adaptativa* (Hall, 2012).

La *tasa metabólica basal* corresponde a la energía necesaria para el mantenimiento de los procesos biológicos de un organismo en estado basal, para


el ser humano en ayunas y termoneutralidad, suponiendo un 60-70% del gasto energético total. Por otro lado, la *actividad física* consume energía del individuo y dependiendo del tipo de ejercicio que esté teniendo lugar se quemarán más o menos calorías. Y, por último, la *termogénesis adaptativa* se define como la energía disipada en forma de calor ante una exposición al frío o cambios en la dieta (Spielgeman & Flier, 2001). Este proceso se divide en dos tipos principales: termogénesis inducida por frío (TIF), que, a su vez, se divide en termogénesis con tiriteo (TCT) y sin tiriteo (TST); y la inducida por dieta (TID). Tiene lugar en el tejido adiposo marrón, específicamente la TST y TID; y en el músculo esquelético, encargado de la TCT.

Un balance energético negativo, donde el gasto es mayor que la ingesta, deriva en una pérdida de peso; mientras que un balance positivo como la **obesidad**, en el que el gasto energético es menor, resulta en una **ganancia de peso** (Hill, Catenacci & Wyatt, 2005). A esto hay que añadir que el ser humano está más protegido ante pérdidas de peso que acúmulos de grasa puesto que a lo largo de la historia se han descrito más muertes por hambre (Prentice, 2001).

Otro proceso que se ve afectado en el desarrollo de esta enfermedad es el metabolismo lipídico debido a que el tejido adiposo es el mayor reservorio de energía en nuestro organismo. Durante un balance energético negativo, la lipólisis se ve favorecida, liberando así la reserva de lípidos al torrente sanguíneo hasta llegar al hígado, músculo esquelético y tejido adiposo marrón para ser utilizados en la oxidación de los ácidos grasos y así obtener energía; mientras que cuando el balance es positivo, el exceso de energía es almacenado en el tejido adiposo en forma de triglicéridos debido a la activación de la **lipogénesis**.

En una situación de balance energético positivo o sobrealimentación como sería la obesidad, el tejido adiposo sufre una reestructuración (**Figura 1.2**). Al comienzo, los adipocitos aumentan su tamaño (**hipertrofia**) debido al almacenamiento descontrolado de lípidos, provocando así la expansión del propio tejido. Cuando el tamaño de las células llega a un umbral determinado, que varía dependiendo de la técnica de medición utilizada, se activa la proliferación y diferenciación de los preadipocitos, aumentando así el número de adipocitos (**hiperplasia**) que hay en el tejido y provocando también su expansión (Rosen & Spiegelman, 2014). Debido a que el número de adipocitos en el ser humano se fija en las etapas de infancia/adolescencia y la tasa de reposición de estos es alta (Spalding *et al.*, 2008), la eliminación de las células nuevas se ve dificultada pese a que el tamaño del tejido adiposo se vea reducido ante una pérdida de peso. Por ello, la hiperplasia de este tejido se considera un mecanismo de recuperación de la obesidad.

Llegado a este punto, el tejido adiposo se vuelve extremadamente disfuncional y no consigue almacenar la energía sobrante de manera eficiente. Esto provoca la acumulación ectópica de grasa en otros tejidos que regulan el metabolismo glucídico del organismo, como el hígado y el músculo, alterando así su función



(Longo *et al.*, 2019). Esta **lipotoxicidad** contribuye al desarrollo de complicaciones por la obesidad, específicamente el síndrome metabólico.

Además, cuando los adipocitos ya no pueden controlar la presión anabólica adicional que se produce en esta situación, se inicia una **respuesta inflamatoria** para combatir dicho estrés. El tejido adiposo se considera el depósito principal de almacenamiento de grasa, pero también uno de los órganos endocrinos más importantes del organismo. Es capaz de secretar **adipoquinas**, que participan en varias cascadas de señalización y regulan la señalización de insulina, oxidación de ácidos grasos y la captación de glucosa entre otros procesos metabólicos; y **citoquinas**, que regulan la inflamación y la angiogénesis. Durante la obesidad, el cambio fenotípico que sufre el tejido adiposo provoca la infiltración de células inmunitarias pertenecientes a la fracción vascular del estroma (Hotamisligil, 2006; Hotamisligil, 2017b), y la secreción de citoquinas proinflamatorias por los propios adipocitos y por los macrófagos residentes del tejido, tanto local como sistemáticamente (Hotamisligil, 2017a). Este estado proinflamatorio suele derivar en resistencia a insulina.

En general, la inflamación es un proceso de pérdida de energía que aumenta el gasto energético y reduce la ingesta calórica. Directamente, las citoquinas inflamatorias, como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), interleuquina 1 (IL-1) e interleuquina 6 (IL-6), promueven el gasto energético mediante su interacción con receptores localizados en el sistema nervioso central o en tejidos metabólicamente activos. Por otro lado, la transcripción de leptina es inducida por hipoxia y mediadores de inflamación como TNF- α (Kawai, Autieri & Scalia, 2021). La leptina es una adipoquina que inhibe el apetito y aumenta de manera indirecta el gasto energético (Myers & Olson, 2012). Sin embargo, no existe ningún aumento del gasto energético durante la obesidad que pudiera contrarrestar la inflamación (Carneiro *et al.*, 2016).

Por último, el tejido adiposo es capaz de favorecer su propia vascularización. Durante una situación de sobrealimentación en la cual se produce su expansión, este puede fracasar en la generación de nuevos vasos sanguíneos, pudiendo ocasionar **hipoxia**. El factor de transcripción inducido por hipoxia 1 alfa (HIF1- α) se encuentra activo en los adipocitos de pacientes obesos y se ha observado que una sobreexpresión de este provoca una disfunción metabólica en el tejido adiposo. Además, la expresión de HIF1- α inhibe la angiogénesis y la β -oxidación, disminuye la secreción de adiponectina, promueve la inflamación y, eventualmente, la fibrosis (Rosen & Spiegelman, 2014).

Esta **fibrosis** puede impedir la expansión del tejido adiposo y, a su vez, la generación de nuevos capilares vasculares. Este tejido está formado por varias masas de adipocitos rodeadas por una matriz extracelular, pareciéndose a un racimo de uvas en una malla siendo las uvas los adipocitos y la malla, la matriz (Rosen & Spiegelman, 2014). Cuando la matriz es laxa, la expansión de estas masas se ve favorecida mientras que cuando se vuelve rígida como en la fibrosis, el

tamaño de estas se limita. El impacto en la salud de este proceso depende del depósito de grasa (subcutáneo o visceral) en el que se encuentre. Por ejemplo, la fibrosis visceral puede actuar como un mecanismo de adaptación que contribuye a frenar el efecto negativo de la hipertrofia de los adipocitos, pero la fibrosis subcutánea, pese a ser más abundante clínicamente, puede afectar negativamente a la pérdida de peso tras una cirugía bariátrica o una intervención alimentaria puesto que sería más difícil acceder a la grasa situada en esas masas fibróticas (Sun *et al.*, 2013).

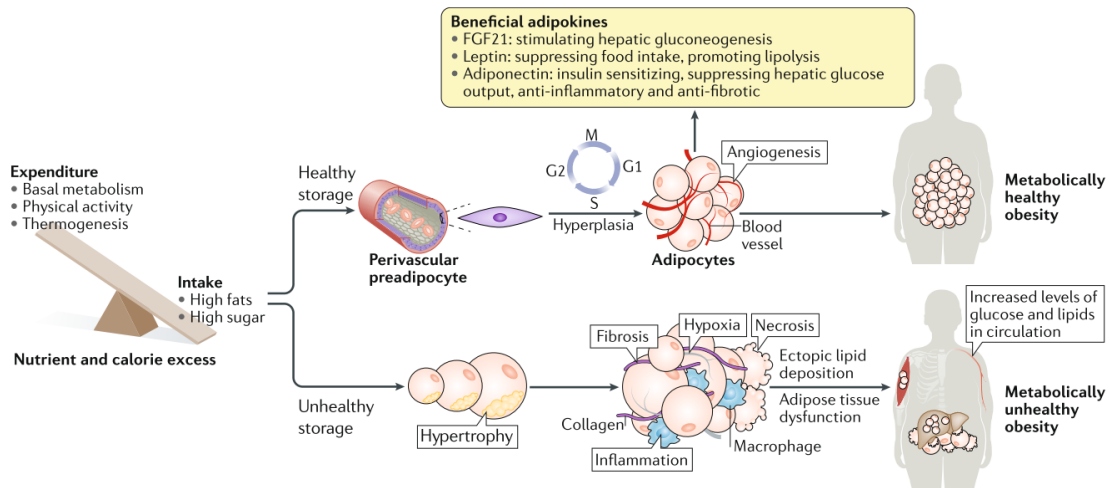



Figura 1.2 Remodelación del tejido adiposo cuando el balance energético es positivo y es mantenido en el tiempo como sucede en una situación de sobrealimentación y/o en la obesidad. El almacenamiento excesivo de grasa conlleva un incremento de la hiperplasia e hipertrofia de los adipocitos blancos. Esta enfermedad se desarrolla cuando se alteran diferentes procesos: activación de la lipogénesis, inhibición de la diferenciación de preadipocitos, generación de un ambiente lipotóxico en otros tejidos por una acumulación de lípidos ectópicos, respuesta proinflamatoria, hipoxia, fibrosis y necrosis de varios tipos celulares. Todo ello deriva en la disfunción del tejido adiposo y en un cambio negativo en la homeostasis glucídica y lipídica. Adaptado de Ghaben & Scherer, 2019.

1.1.4 Complicaciones asociadas a la obesidad

La obesidad se relaciona con condiciones médicas altamente prevalentes en la actualidad. Personas que sufren esta enfermedad son más propensas a desarrollar alguna complicación que puede llegar a suponer un riesgo para su propia salud e, incluso, su muerte.

1.1.4.1 Resistencia a insulina

La consecuencia más conocida de la obesidad es la resistencia a insulina y se observa principalmente en hígado, músculo y tejido adiposo. Al comienzo de esta complicación, el páncreas aún es capaz de producir y secretar insulina, pero el resto de órganos no responden adecuadamente a ella. Por ello, las células β -pancreáticas producen niveles cada vez más altos de insulina hasta que se establece la hiperinsulinemia. Esa alteración metabólica es representativa de la resistencia a insulina. Además, la resistencia a insulina ha sido reconocida como una característica crucial en el síndrome metabólico.



Como se ha mencionado previamente, el tejido adiposo se caracteriza por una hipertrofia e hiperplasia de los adipocitos durante la obesidad. Esto supone la activación de diferentes señales que derivan en muerte celular, hipoxia y estrés causando también la inflamación del tejido. Además, el aumento del tamaño de las células promueve el reclutamiento de macrófagos. Estos son los leucocitos más abundantes en el tejido adiposo y pueden llegar a constituir más de un 40% de las células del tejido durante la obesidad (Weisberg *et al.*, 2003).

Los macrófagos del tejido adiposo se clasifican en dos tipos: M1 o proinflamatorios, y M2 o antiinflamatorios. Generalmente, los macrófagos M2 se encuentran activos y dispersos en el tejido adiposo activando una cascada antiinflamatoria gracias a su interacción con los linfocitos T reguladores. No obstante, en la obesidad, los macrófagos cambian su fenotipo a M1 debido a que la hipertrofia de los adipocitos provoca necrosis y/o apoptosis de las células residentes del tejido adiposo, promoviendo la disfunción tisular e induciendo la inflamación. Estos macrófagos M1 secretan citoquinas proinflamatorias, como las ya mencionadas previamente IL-6, IL-1 y/o TNF- α ; y liberan quimioquinas atrayentes de nuevos monocitos que incrementan la inflamación del tejido y favoreciendo el desarrollo de la resistencia a insulina (Haase *et al.*, 2014).

Varios estudios han asociado el exceso de nutrientes con la activación de la respuesta inmunitaria innata de los órganos encargados de la homeostasis glucídica como el hígado, músculo y tejido adiposo (Lumeng & Saltiel, 2011). Generalmente, los pacientes con obesidad que exhiben resistencia a insulina presentan una inflamación avanzada en el tejido adiposo, mientras que aquellos que son sensibles a la insulina no muestran síntomas de inflamación (Lawler *et al.*, 2016).

Asimismo, la hipertrofia de los adipocitos causa un deterioro en la vascularización del tejido generando hipoxia en el mismo, que a su vez induce inflamación (Wang, Wood & Trayhurn, 2007). También, las células hipertróficas aumentan su lipólisis basal liberando ácidos grasos libres (AGL) a la matriz extracelular. Estos AGL se unen a los receptores *toll-like* 2 y 4 (TLR2 y TLR4) que activan el factor nuclear kappa-beta (NF- κ B) e inician la cascada de señalización mediada por c-Jun N-terminal quinasa (JNK) que resulta en un aumento de la síntesis y secreción de varias quimioquinas proinflamatorias en los adipocitos. Por ello, NF- κ B y JNK están estrechamente relacionados con la resistencia a insulina derivada de la inflamación del tejido adiposo (Shoelson, Lee & Goldfine, 2006).

Por otro lado, la acumulación ectópica de triglicéridos debida, en parte, al fallo en la adipogénesis empeora la sensibilidad a insulina local y sistemáticamente. Cuando existe un exceso de nutrientes, la grasa se acumula en forma de triglicéridos en el tejido adiposo, concretamente en el depósito subcutáneo. En el momento en el que este depósito alcanza su máximo de expansión, los triglicéridos se liberan al torrente sanguíneo y se acumulan en otros órganos como el hígado, músculo, páncreas y/o corazón. Esta capacidad limitada de almacenamiento de

grasa que presenta el tejido adiposo favorece la hipertrofia de los adipocitos, la hipoxia y la respuesta proinflamatoria generando un fenotipo resistente a insulina (Longo *et al.*, 2019).

Como conclusión, una disfunción del tejido adiposo dada por una acumulación de grasa excesiva favorece la inflamación prolongada en el tiempo de este que a su vez promueve la disfunción del propio tejido, y así sucesivamente. Este círculo vicioso deriva en un deterioro de la sensibilidad a insulina.

1.1.4.2 Diabetes Mellitus tipo 2


Actualmente, la diabetes mellitus tipo 2 es otro de los problemas de salud más preocupantes de nuestra sociedad y se estima que aproximadamente 350 millones de personas padecerán esta enfermedad en el año 2030 (Zhang *et al.*, 2023).

Esta afección crónica está estrechamente relacionada con la obesidad, siendo la resistencia a insulina el factor común más importante entre ambas enfermedades. En una situación sana, los niveles de glucosa en sangre del organismo se controlan mediante dos hormonas secretadas por el páncreas: glucagón e insulina. El glucagón es secretado por las células α cuando la glucemia es baja y promueve la glucogenólisis y la gluconeogénesis del hígado para mantener la normoglucemia. Por el contrario, la insulina se secreta por las células β cuando los niveles de glucosa son altos, inhibe los procesos anteriormente mencionados y activa la glucogenogénesis. Además, la insulina aumenta la captación de glucosa por parte del músculo esquelético y del tejido adiposo para disminuir esos valores altos de glucosa en sangre.

En la diabetes, la señalización de insulina se encuentra afectada, lo que favorece el incremento en los niveles de glucosa en sangre. Esta hiperglucemia desencadena alteraciones en el metabolismo de los carbohidratos, las grasas y las proteínas, contribuyendo al desarrollo de las complicaciones diabéticas.

El fallo en la señalización de insulina puede deberse a una deficiencia en la producción de esta hormona por las células β -pancreáticas o a una insensibilidad a la misma en el resto de los órganos. En el caso de la diabetes mellitus tipo 2, esta deriva de la resistencia a insulina. Para combatir la hiperglucemia, las células β -pancreáticas secretan mayores niveles de insulina a la sangre (hiperinsulinemia), lo que supone un sobreesfuerzo para ellas y compromete su funcionalidad y viabilidad. Sin embargo, de nada sirve esa hiperinsulinemia puesto que el resto de tejidos no son capaces de responder adecuadamente a la acción de esa hormona.

Como se ha mencionado previamente, la resistencia a insulina es la complicación más característica de la obesidad y también es clave en el desarrollo de la diabetes tipo 2. Más del 90% de pacientes diabéticos tipo 2 desarrollan resistencia a insulina y aproximadamente un cuarto de la población diabética no está diagnosticado (Andolfi & Fisichella, 2018). Además, niveles bajos de adiponectina y un tejido adiposo visceral aumentado están relacionados con el desarrollo de la resistencia



a insulina y, por tanto, con la disfunción de la célula β -pancreática (Moon *et al.*, 2018). Se ha observado que la obesidad no es causa directa de la diabetes pese a que la resistencia a insulina ocasionada por ella puede promover el progreso de la diabetes siempre y cuando haya factores de predisposición a padecer la enfermedad. No obstante, la evolución de la diabetes tipo 2 sí provoca obesidad (Malone & Hansen, 2019).

1.1.4.3 Síndrome metabólico

El síndrome metabólico se define como un conjunto de afecciones metabólicas que suponen un riesgo para la salud, específicamente cardiovascular (Saklayen, 2018), y su prevalencia va en paralelo a la observada en la diabetes y obesidad. Aunque existen varias definiciones por distintas organizaciones de la salud (OMS 1999; *National Cholesterol Education Program ATP3 2005*; *International Diabetes Federation 2006*), difieren muy poco entre ellas.

El eje fundamental en el desarrollo del síndrome metabólico es la resistencia a insulina. Para diagnosticar el síndrome metabólico se debe dar, además de la resistencia a la insulina, otros como: bajos niveles de lipoproteínas de alta densidad (HDL), hipertensión y aterosclerosis, además de intolerancia a glucosa, obesidad central o visceral e hipertrigliceridemia. Esta compleja alteración metabólica se origina por un desequilibrio entre la ingesta calórica y el gasto energético, pero también por la epigenética, un estilo de vida sedentario y/o la calidad de la alimentación, tal como sucede en la obesidad.

1.1.4.4 Dislipidemia

La obesidad visceral está relacionada estrechamente con altos niveles de triglicéridos en sangre, bajos niveles de HDL y altos de proteínas de baja densidad (LDL). Estas características son clave en el desarrollo de la dislipidemia aterogénica.

La resistencia a insulina activa la lipólisis, liberando ácidos grasos libres al torrente sanguíneo. Estos ácidos grasos libres se utilizan como sustrato para la síntesis de triglicéridos y estabilizan la producción de apo-B que es la lipoproteína mayoritaria en las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL). En condiciones normales, la insulina degrada apo-B a través de la vía dependiente de PI3K, proceso que se ve inhibido cuando la resistencia a insulina está presente. Además, esta hormona también regula la actividad de la lipasa de lipoproteínas. Todo ello concluye en un aumento en los niveles circulantes de VLDL (Huang, 2009).

Estas lipoproteínas se conocen como uno de los “colesteroles malos” que, en exceso, pueden provocar la aparición de placas en las arterias, es decir, favorecen la generación de la aterosclerosis. Las VLDL se metabolizan en lipoproteínas remanentes más pequeñas y en LDL, lo que promueve la formación de la placa de ateroma.

1.1.4.5 Hígado graso no alcohólico

Otra de las complicaciones más conocidas de la obesidad es la enfermedad de hígado graso no alcohólico o EHGNA, cuya prevalencia se ha duplicado en los últimos 20 años y se estima que más de mil millones de personas padecen esta enfermedad (Andolfi & Fisichella, 2018; Loomba, Friedman & Shulman, 2021).

EHGNA es una enfermedad caracterizada por la acumulación intrahepática de grasa en forma de triglicéridos por un desequilibrio entre su síntesis y su utilización; y se define por la presencia de esteatosis en al menos un 5% de hepatocitos sin otra etiología de enfermedad como alcoholismo o hepatitis (Friedman *et al.*, 2018). Además, esta patología puede progresar hasta la esteatohepatitis no alcohólica, un estadio grave que además de mostrar esteatosis, desarrolla inflamación crónica con o sin fibrosis. Esta esteatohepatitis puede derivar en cirrosis hepática y, en última instancia, en carcinoma hepatocelular (Zhang *et al.*, 2023).


1.1.4.6 Hipertensión y riesgo cardiovascular

La enfermedad cardiovascular es la principal causa de muerte en el mundo. El riesgo de complicaciones cardiovasculares relacionadas con la obesidad, como arritmias y/o fallo cardíaco, no depende exclusivamente del peso corporal, también se ve afectado por la distribución de la grasa y la capacidad de expansión del tejido adiposo (Piche *et al.*, 2018). Específicamente, la liberación excesiva de triglicéridos al torrente sanguíneo aumenta la resistencia sistémica y el gasto cardíaco, provocando una hipertrofia de los ventrículos que derivará en una insuficiencia cardíaca (Zhang *et al.*, 2023). Además, la activación de las respuestas proinflamatorias en la obesidad no sólo aumenta la infiltración de macrófagos en el tejido adiposo, sino que también promueve la secreción de mediadores vasoconstrictores (Bhupathiraju & Hu, 2016).

1.1.4.7 Cáncer

Tanto el sobrepeso como la obesidad se han relacionado con hasta 13 tipos diferentes de cáncer, principalmente gastrointestinales: colorrectal, pancreático, gástrico, hepatocarcinoma, de vesícula biliar y adenocarcinoma esofágico. Entre aquellos que no son gastrointestinales podemos encontrar el cáncer de mama, ovárico, endometrial, renal, de tiroides, meningioma y mieloma múltiple (Avgerinos *et al.*, 2019). En el caso de los hombres, el cáncer colorrectal es el más común asociado a obesidad, mientras que en las mujeres es el cáncer de mama (Liu, Pedersen & Halberg, 2021).

A pesar de que el papel de la obesidad en el desarrollo del cáncer no está completamente descrito, se han vinculado algunas rutas metabólicas en su etiopatología. Entre ellas, cabe destacar la resistencia a insulina/hiperinsulinemia y alteraciones en la señalización del factor de crecimiento insulínico 1 (IGF-1).



Los niveles aumentados de insulina en sangre van a promover la síntesis de los factores de crecimiento insulínicos (IGFs) por casi cualquier tejido, aunque principalmente por el hígado, y junto con la insulina van a actuar como mediadores de crecimiento, desarrollo y supervivencia, lo que contribuye en gran medida al proceso tumorigénico (Moschos & Mantzoros, 2002). Es decir, la insulina e IGFs activan diferentes mecanismos promotores de tumores en células diana como son la proliferación, antiapoptosis, angiogénesis y linfangiogénesis.

Además, varios estudios han demostrado que la sobreexpresión del receptor de IGF-1 (IGF-1R) en células cancerosas podría ejercer acciones neoplásicas favoreciendo la progresión del ciclo celular e inhibiendo la apoptosis mediante la interacción con hormonas esteroideas y/o integritas (Avgerinos *et al.*, 2019).

1.1.4.8 Trastornos y enfermedades mentales

Tanto las enfermedades mentales como la obesidad son patologías crónicas prevalentes en la sociedad y, recientemente, se ha establecido una relación entre ambas. Pese a que en 1946 se publicó el primer estudio donde se asoció la obesidad con la tensión emocional y factores psiconeuróticos (Nicholson, 1946), no ha sido hasta hace unos años que este campo de investigación ha emergido con fuerza. La obesidad se ha vinculado con diversas enfermedades psiquiátricas como trastornos del estado de ánimo, ansiedad, trastornos de la personalidad, trastorno por déficit de atención con hiperactividad (TDAH), trastorno por atracón, síndrome posttraumático y esquizofrenia. Además, el aumento de peso y/o acumulación de grasa suele ser un efecto secundario de la mayoría de medicamentos utilizados en el tratamiento de enfermedades mentales (Remington, 2006).

Las personas que sufren de trastornos psiquiátricos tienen un riesgo de padecer obesidad que oscila entre 2-3 veces mayor que el resto de la población. Sin embargo, se ha registrado que el riesgo de desarrollarlos en personas con obesidad varía entre el 30% y el 70% (Avila *et al.*, 2015). Por ello, es importante que tanto el sector sanitario como político tomen medidas para proteger a estas poblaciones vulnerables del desarrollo de otras enfermedades asociadas a las que ya presentan, como la obesidad y los trastornos mentales, puesto que pueden agravar su estado de salud.

Existen más complicaciones derivadas de la obesidad como la apnea del sueño y problemas respiratorios (Dixon & Peters, 2018) o, incluso, esta patología puede agravar otras como el COVID-19 (Zhou *et al.*, 2021). Además, la crisis sanitaria ocasionada por el aumento de la obesidad en la sociedad está impidiendo el incremento de la esperanza de vida conseguido en los últimos años y ocasiona una gran presión en los servicios sanitarios.

1.1.5 Terapias anti-obesidad

La obesidad es una patología crónica y recidivante que está asociada a muchas complicaciones metabólicas, por lo que es importante su prevención y tratamiento.

El mantenimiento de la pérdida de peso a lo largo del tiempo es complicado para la mayoría de los pacientes ya que supone una amplia gama de cambios biológicos duraderos. Algunas de estas alteraciones debidas a la disminución de la grasa corporal son: reducción del gasto energético, aumento del apetito, variación en diferentes hormonas involucradas en las señales de hambre/saciedad y gasto energético, y cambios en la actividad neuronal de varias áreas cerebrales que median en la ingesta de alimentos (Hall & Kahan, 2018).


A ello hay que añadir que el desconocimiento sobre la fisiopatología de la obesidad en nuestra sociedad perpetúa la creencia errónea de que esta condición es causada simplemente por llevar un estilo de vida incorrecto y por una falta de motivación para cambiar esa conducta. Este estigma es frecuente, incluso entre profesionales de la salud, y puede llevar a que las personas que padecen esta patología sean reticentes a buscar tratamiento, lo que a su vez puede afectar negativamente a la calidad de la atención médica que reciben (Phelan *et al.*, 2015).

Actualmente, existen diferentes enfoques en cuanto al tratamiento de la obesidad:

1.1.5.1 Estilo de vida

La estrategia principal para combatir la obesidad se basa en cambios en el estilo de vida. La combinación de una dieta saludable con el ejercicio físico es suficiente para disminuir el exceso de peso corporal, pero, aun así, es común que la mayoría de personas que han conseguido perder grasa sólo con cambios en el estilo de vida, lo recuperen con el paso del tiempo.

Existen diferentes tipos de alimentación que se han propuesto como terapia frente a la obesidad: dietas con bajo contenido de grasas, hidratos de carbono o alto contenido en proteínas; dieta mediterránea; dieta cetogénica hipocalórica; dietas de porción controladas; y/o, la más conocida actualmente, el ayuno intermitente (Chao, Quigley & Wadden, 2021). A corto plazo, la restricción calórica actúa como un determinante en la pérdida inicial de peso más que la composición de la dieta, pero la dieta más eficaz es aquella que el paciente pueda seguir cómodamente. Sorprendentemente, cuando la dieta se selecciona según las preferencias de la persona que sufre obesidad, el efecto de pérdida de peso y la adherencia al plan de alimentación se ve reducido, aunque los pacientes que eligen la dieta parecen sentirse más satisfechos (Yanzy *et al.*, 2015). Además, no sólo habría que tener en cuenta en los métodos de pérdida de peso a considerar en un paciente sus gustos, comodidad y alergias, sino que habría que añadir aquellas dietas que mejoran las diferentes complicaciones asociadas que padezcan también.



Por otro lado, el ejercicio físico también es considerado una estrategia no farmacológica para combatir la acumulación de grasa. Se han descrito varios tipos de ejercicio que promueven la pérdida de peso como entrenamientos de intervalos de sprint, entrenamientos de intervalos de alta intensidad (HIIT) o entrenamientos continuos de actividad moderada. Recientemente se ha observado que la grasa visceral de las mujeres parece responder mejor a la demanda metabólica, lo que provoca una mayor actividad de hormonas lipolíticas y una reducción de compuestos antilipolíticos en los adipocitos viscerales (Zhang *et al.*, 2021).

Sin embargo, no existe una intervención única en el estilo de vida que les sirva por igual a todos los pacientes de obesidad. Además, dependiendo del peso corporal de la persona y los impedimentos en la movilidad que esto le pueda ocasionar podrá adoptar una combinación de dieta y ejercicio o comenzar exclusivamente por cambios en la dieta hasta conseguir un peso que le permita ejercitarse. En cualquier caso, la generación de un déficit de energía que permita la reducción del exceso de grasa visceral, sin importar la elección de la dieta o la rutina de ejercicios, se posiciona como el elemento más crítico para lograr un tratamiento exitoso.

1.1.5.2 Farmacoterapia

Como hemos mencionado previamente, es frecuente que sólo el cambio en el estilo de vida no sea suficiente para el mantenimiento de la pérdida de peso. Por ello, los tratamientos farmacológicos se utilizan como un refuerzo que ayuda a los pacientes con obesidad a que continúen disminuyendo su grasa corporal y, en algunas ocasiones, como alternativa a la terapia no farmacológica. Hasta la fecha, existen múltiples medicamentos para el tratamiento de la obesidad que han sido aprobados en Europa (**Tabla 1.2**). Según las directrices de la Agencia Europea del Medicamento (EMA), estos fármacos se recomiendan para adultos con un $IMC \geq 30 \text{ kg/m}^2$, o con un $IMC \geq 27 \text{ kg/m}^2$ o sobrepeso con al menos una comorbilidad relacionada con la obesidad.

El medicamento más utilizado actualmente es el *Orlistat*, el cual promueve la pérdida de peso mediante la inhibición de lipasas pancreáticas y gástricas para evitar la hidrólisis de los triglicéridos y la absorción posterior de los ácidos grasos (Heck, Yanovski & Calis, 2000). Además, se considera uno de los fármacos más seguros en el tratamiento de la obesidad puesto que no implica una reducción del apetito y/o una baja absorción corporal, y es el único disponible para la población de adolescentes afectada por esta patología.

Por el lado contrario, el fármaco combinado *Bupropion/Naltrexona* inhibe el apetito. El Bupropion aumenta la concentración de neuropéptidos de proopiomelanocortina (POMC) mientras que la Naltrexona inhibe la activación del receptor de cannabinoide 1 (CB1) y la autoinhibición de POMC, todo ello promueve una reducción del apetito (Apovian *et al.*, 2013). También, este fármaco mejora

algunos parámetros cardiometabólicos como el perímetro de la cintura, el perfil lipídico, la sensibilidad a insulina, así como la presión arterial (Zhang *et al.*, 2023).

En el caso de la *Liraglutida* y *Semaglutida* son análogos del péptido similar a glucagón (GLP-1), secretado por el intestino en respuesta a la digestión de grasa y carbohidratos. Estos fármacos interactúan con el receptor de GLP-1 que estimula las neuronas POMC reduciendo así el apetito y la ingesta calórica. Además, la liraglutida puede retrasar el vaciado gástrico y equilibrar la secreción de insulina/glucagón para regular la glucemia (Kastin, Akerstrom & Pan, 2002).

La *Setmelanotida* es un nuevo medicamento utilizado en el tratamiento de la obesidad asociada a trastornos genéticos, como una deficiencia de POMC o del receptor de leptina (Markham, 2021). Esta droga es un octapéptido cíclico que se une al receptor de melanocortina 4 (MC4) y se utiliza sobre todo para el control crónico de peso.

Por último, tanto la *Fentermina*, análogo de la metanfetamina, como el *Topiramato*, antagonista del receptor del ácido gamma-aminobutírico (GABA), se utilizan para suprimir el apetito a corto plazo debido a su acción en el sistema nervioso. Su tratamiento combinado induce una reducción significativa del apetito y promueve la pérdida de peso, además de mejorar la presión sanguínea, la trigliceridemia y la glucemia basal de los pacientes (Smith, Meyer & Trinkley, 2013).


Medicamento	Indicación	Mecanismo de acción
Orlistat	Sobrepeso, obesidad	Inhibidor de lipasas pancreáticas y gástricas
Bupropion/Naltrexona	Sobrepeso, obesidad	Antagonista opiode e inhibidor de la reabsorción de dopamina y norepinefrina
Liraglutida	Obesidad	Agonista del receptor GLP-1
Semaglutida	Sobrepeso, obesidad, diabetes tipo 2	Agonista del receptor GLP-1
Setmelanotida	Obesidad asociada a deficiencia en el receptor de leptina	Agonista del receptor MC-4
Fentermina/Topiramato	Obesidad	Análogo de la metanfetamina y antagonista del receptor GABA

Tabla 1.2 Fármacos anti-obesidad aprobados por la Agencia Europea del Medicamento (EMA).

1.1.5.3 Cirugía bariátrica

Otro de los tratamientos más eficaces contra la obesidad son las intervenciones quirúrgicas bariátricas puesto que ofrecen una pérdida de peso duradera. En la última década, el número de cirugías bariátricas ha aumentado espectacularmente (Zhang *et al.*, 2023).

Existen dos tipos de intervenciones: *gastrectomía vertical o en manga*, que reduce un 25 % el volumen gástrico de los pacientes; y el *bypass gástrico con Y de Roux*, durante la que se genera una pequeña conexión directa entre el estómago y el



intestino delgado. En el último caso, la mayoría de los alimentos ingeridos eluden la mayor parte del estómago, duodeno y yeyuno reduciendo así el aporte energético.

En general, los mecanismos de pérdida de peso tras la cirugía bariátrica se asocian a cambios en el comportamiento alimentario (Le Roux *et al.*, 2006), alteraciones neurológicas que inducen saciedad (Patkar *et al.*, 2019), aumento del gasto energético en reposo (Wilms *et al.*, 2018), así como variaciones en la microbiota intestinal (Liou *et al.*, 2013).

Es importante destacar que las intervenciones quirúrgicas en pacientes que sufren obesidad presentan un mayor riesgo puesto que el exceso de grasa visceral y el engrosamiento de la pared abdominal limitan tanto la visibilidad como el movimiento durante la cirugía.

1.2 EL ÓRGANO ADIPOSO

El tejido adiposo es un órgano increíblemente heterogéneo y flexible. A pesar de que en el pasado se ha descrito como un mero depósito de energía, actualmente comprendemos que este órgano desempeña un papel fundamental en la regulación de diversos aspectos de la fisiología corporal. Estos incluyen la ingesta de alimentos, el mantenimiento de los niveles de energía, la sensibilidad a la insulina, la regulación de la temperatura corporal y las respuestas del sistema inmunológico.

El órgano adiposo en mamíferos placentarios presenta tres tipos de adipocitos funcionales: blancos, *beige* y marrones. Estos se encuentran distribuidos por todo el cuerpo en el tejido adiposo blanco (*white adipose tissue*, WAT) y en el tejido adiposo marrón (*brown adipose tissue*, BAT), de los que posteriormente se hablará en profundidad. Los adipocitos blancos están especializados en el almacenamiento y liberación de lípidos, mientras que los adipocitos *beige* y marrones son células termogénicas capaces de disipar la energía nutricional en forma de calor.

Además, estos adipocitos se encuentran rodeados de una amplia variedad de células: endoteliales, inmunes, fibroblastos, preadipocitos y células madre mesenquimales. Por ello, se estima que el número de adipocitos maduros que conforma el órgano adiposo sólo representa el 20-40% del total, aunque suponen aproximadamente el 90% del volumen total del tejido (Rosen & Spiegelman, 2014).

1.2.1 Adipogénesis


La adipogénesis se define como el proceso por el cual una célula progenitora similar a fibroblastos condiciona su desarrollo al linaje adipocítico convirtiéndose en adipocitos maduros que acumulan nutrientes y almacenan triglicéridos (Ghaben & Scherer, 2019).

Esta transformación se puede dividir en dos fases: *compromiso* y *diferenciación*.

1.2.1.1 Fase de compromiso

Al comienzo, el precursor multipotente mesenquimal expresa el receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas- α (PDGFR α) y/o β (PDGFR β) y se compromete al linaje adipocítico sin variar su morfología. En este momento, el precursor mesenquimal se convierte en un adipoblasto o preadipocito.

Este precursor mesenquimal puede formar tanto mioblastos, condroblastos, osteoblastos o adipoblastos, que son las células primordiales de los tejidos celulares derivados del mesoderma: fibras musculares, cartílago, hueso y tejido adiposo, respectivamente (Pittenger *et al.*, 1999). Cuando el precursor se compromete a una línea celular pierde su capacidad de transformarse en cualquier otro tipo celular.



Estudios recientes han demostrado que pese a que ambos tipos de tejidos adiposos (WAT y BAT) tienen un origen mesodérmico común, proceden de linajes diferentes de células madre mesenquimales y están predeterminados a una única diferenciación (**Figura 1.3**). Es importante resaltar que, dependiendo de la localización de la grasa, los preadipocitos derivarán de distintas subpoblaciones embrionarias y, a su vez, los preadipocitos de un mismo depósito presentan diferentes orígenes embrionarios (Luong, Huang & Lee, 2019). Cada población difiere en cuanto a su capacidad de *browning/beiging*, diferenciación, angiogénesis y propiedades de remodelación.

Respecto al *tejido adiposo blanco*, su formación comienza antes del nacimiento en la mayoría de especies. En el ser humano, los primeros lóbulos de grasa blanca aparecen entre la decimocuarta y decimosexta semana de gestación. Así, el tejido adiposo blanco presenta 3 tipos diferentes de preadipocitos caracterizados por la expresión de los marcadores Wilms tumor 1 (WT1), transgelina (TAGLN) y myxovirus 1 (MX1) (Hafidi *et al.*, 2019), pero el modelo más aceptado es que todas las células progenitoras implicadas en el desarrollo del tejido adiposo blanco son negativas para la expresión del factor miogénico 5 (Myf-5⁻) (Hassan, Latif & Yacoub, 2012).

En el caso del *tejido adiposo marrón*, este se desarrolla principalmente durante la etapa fetal, teniendo así todas las características de un tejido maduro en el momento del nacimiento tanto en roedores como en humanos (Rajan *et al.*, 2014). Los precursores de este tejido exhiben una firma genética miogénica (Myf-5⁺) y varios estudios han demostrado que las células progenitoras del músculo esquelético pueden diferenciarse en adipocitos marrones (Timmons *et al.*, 2007; Enerbäck, 2009). Cuando el factor de transcripción PR/SET Domain 16 (PRDM16) se expresa, el progenitor Myf-5⁺ se diferencia a una célula adiposa marrón; mientras que cuando PRDM16 se silencia, deriva en una célula muscular. Esta divergencia entre miocito y adipocito marrón podría explicar por qué este último se especializa en el catabolismo lipídico en vez de en el almacenaje de energía, perfil similar a la célula muscular y su metabolismo oxidativo (Esteve Ràfols, 2014).

El compromiso de las células madre mesenquimales por un determinado linaje celular viene controlado por distintos grupos de proteínas como la familia de los factores morfogenéticos óseos (BMP) o la ruta de señalización Wnt (Algire, Medrikova & Herzig, 2013). Tanto BMP-2 como BMP-4 juegan un papel fundamental en el desarrollo de adipocitos blancos mientras que BMP-7, en el de los adipocitos marrones. La unión de estos factores a sus receptores (BMP_r1 y BMP_r2), los cuales poseen actividad serina/treonina quinasa, activa las proteínas Smad-1, Smad-5 y Smad-8 dando lugar a la formación de un complejo con Smad-4 que se transloca al núcleo, donde regula la expresión génica. Además, los BMPs regulan el citoesqueleto de las células progenitoras permitiendo los cambios morfológicos necesarios que caracterizan a los preadipocitos.

Por otro lado, la ruta de señalización Wnt es imprescindible tanto en la fase de compromiso como en la diferenciación. La familia de Wnt está compuesta por

varias glicoproteínas secretadas que actúan en la regulación de la proliferación, supervivencia y diferenciación celular (Takada, Kouzmenko & Kato, 2009). La vía canónica de Wnt (**Figura 1.3**) converge en el factor de transcripción β -catenina, que se translocará al núcleo donde se unirá al factor de las células T y al factor potenciador linfoide 1 (TCF/LEF-1) para activar los genes diana de Wnt. En ausencia de Wnt, la β -catenina citoplasmática se recluta en un complejo de degradación formado por la adenomatosis poliposis coli (APC) y la proteína de inhibición del eje 1 (Axin1), lo que facilita su fosforilación por la glucógeno sintasa quinasa 3- β (GSK-3 β). Esta fosforilación marca la β -catenina para su ubiquitinación y degradación por parte del proteasoma. Durante la adipogénesis, la vía canónica se activa en las fases tempranas del compromiso de linaje mediante la unión de los ligandos Wnt, como por ejemplo Wnt1, Wnt3a o Wnt10b, a los receptores “frizzled” (FZD) y a los correceptores de la proteína relacionada con los receptores de LDL 5 y 6 (LRP5 y LRP6). Esta unión promueve la disociación del complejo de degradación, lo que va a permitir la acumulación de la β -catenina y su translocación al núcleo para la regulación de los distintos factores de transcripción derivando en el linaje adipocítico.

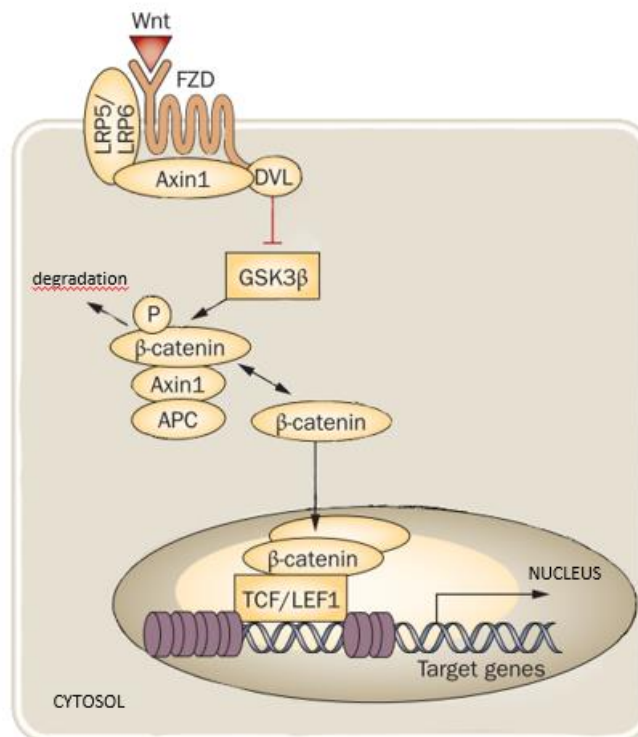


Figura 1.3 Vía canónica de señalización Wnt/ β -catenina. La activación de FZD y LRP5/LRP6 por la unión de los ligandos Wnt conlleva la disociación del complejo de degradación proteasomal de la β -catenina formado por Axin1 y APC, lo que permite la acumulación de la β -catenina citosólica y su translocación al núcleo donde se unirá a los factores de transcripción TCF/LEF-1 que regularán la expresión génica del linaje adipocítico. Adaptado de Takada, Kouzmenko & Kato, 2009.

1.2.1.2 Fase de diferenciación

En esta etapa, los preadipocitos se transforman en adipocitos maduros sensibles a insulina tras varios eventos en los que se incluyen parada de ciclo celular y

acumulación de lípidos. Los preadipocitos son células pequeñas cuya morfología es similar a un fibroblasto y sufren una serie de cambios hasta alcanzar a ser adipocitos funcionales cuando se los estimula correctamente.

Como se ha mencionado previamente, el origen embrionario de los preadipocitos del tejido adiposo blanco y marrón es diferente (**Figura 1.4**), pero comparten su posterior diferenciación. Este proceso se divide en 4 etapas o estadios. Al comienzo, se da una **parada de la proliferación** inducida por una inhibición por contacto cuando los preadipocitos se encuentran confluentes. Una vez que la diferenciación se ha iniciado, varias señales hormonales, como la insulina o la triiodotironina (T3), promueven la **expansión clonal**, representada por una serie de divisiones mitóticas con la finalidad de sincronizar el ciclo celular. En la **diferenciación temprana**, la división celular se detiene y comienza la expresión de genes característicos del adipocito, lo que conlleva a la acumulación de lípidos. Por último, se obtiene la morfología típica del adipocito y se expresan genes típicos del adipocito maduro en la fase de **diferenciación terminal** (Esteve Ràfols, 2014).

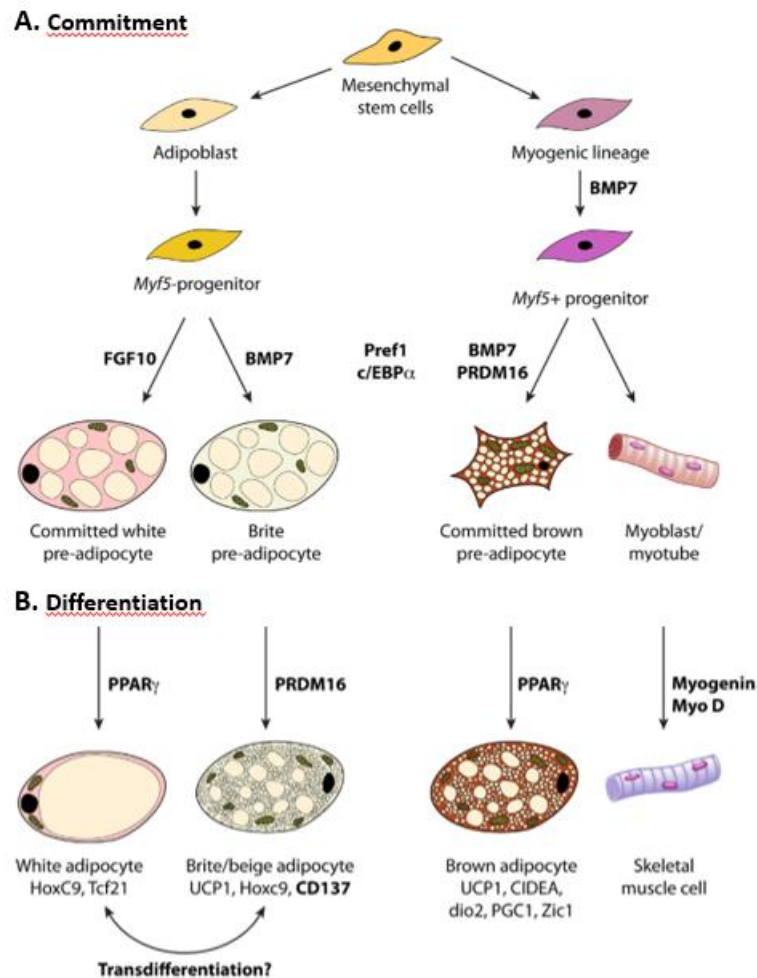


Figura 1.4 Linaje de adipocitos blancos, beige y marrones desde una célula madre mesenquimal y los marcadores moleculares involucrados en el desarrollo. (A) Tanto los adipocitos blancos como las células beige provienen de un progenitor Myf-5⁻ mientras que los marrones derivan de un progenitor miogénico. (B) En este último caso, la célula precursora se

diferenciará en el adipocito marrón al expresar PPAR- γ y PRDM-16, que también funciona como un marcador de las células beige y comprometerá su linaje cuando PRDM-16 se exprese. Además, los adipocitos blancos maduros y los adipocitos beige transitorios pueden sufrir una transdiferenciación cuando el estímulo del frío esté presente y el organismo tenga que adaptar su temperatura corporal. Adaptado de Obregon, 2014.

La cascada transcripcional principal implicada en la diferenciación de los preadipocitos comienza con la activación del receptor activado por proliferadores de peroxisomas γ (PPAR- γ) y proteínas potenciadoras de unión a CCAAT (C/EBPs) (Figura 1.5). PPAR- γ se ha descrito como el factor indispensable en el desarrollo de todos los tipos de adipocitos y en el propio mantenimiento del proceso de diferenciación (Giralt & Villarroya, 2013). Además, varios C/EBPs están implicados en la diferenciación de manera temporal, tales como C/EBP α , C/EBP β , C/EBP γ y C/EBP δ . La expresión temprana de C/EBP β y C/EBP δ induce la expresión de C/EBP α y PPAR- γ , lo que activa la última etapa de la diferenciación. Tanto C/EBP α como PPAR- γ deben actuar en absoluta sinergia, pese a ser este último más importante en el proceso de adipogénesis. Más del 90% de los sitios de unión al ADN de PPAR γ son comunes a C/EBP α y, también, PPAR γ requiere la expresión de C/EBPs para activar completamente la transcripción de genes característicos de los adipocitos maduros, como los que codifican para el receptor de insulina y la adiponectina (Ghaben & Scherer, 2019).

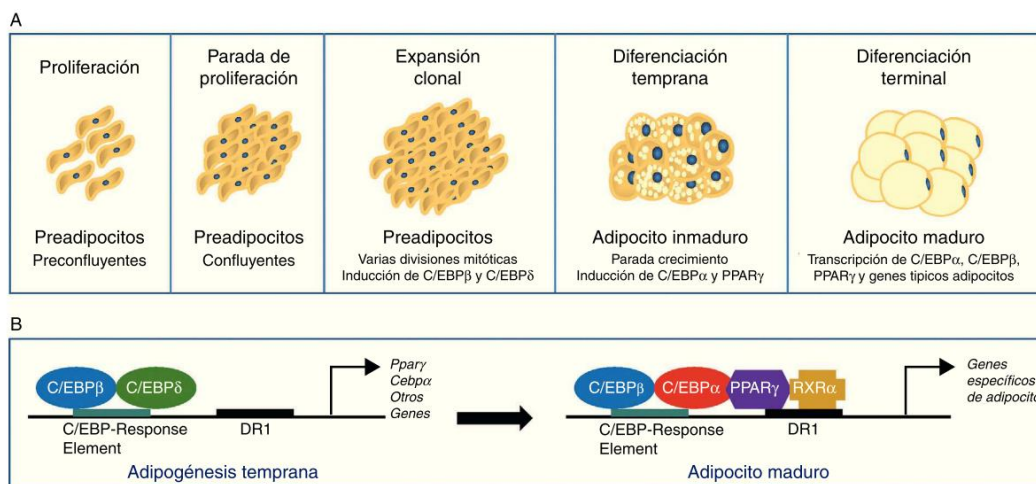


Figura 1.5 (A) Esquema simplificado de la diferenciación de preadipocitos a adipocitos donde se indican los diferentes estadios y procesos involucrados. (B) Modelo secuencial del control transcripcional durante la adipogénesis. Adaptado de Esteve Ràfols, 2014.

1.2.1.3 Moduladores de la señalización de adipogénesis: insulina e IGF1

La insulina, hormona pancreática anabólica secretada en respuesta al aumento de glucosa plasmática, al igual que el IGF-1, promueven la captación de glucosa plasmática en los tejidos periféricos, específicamente en el músculo esquelético y el órgano adiposo.

La insulina es capaz de activar su cascada de señalización tras la unión a los receptores de alta afinidad (IR) en tejidos especializados o su unión a receptores de IGF-1 de menor afinidad (IGF-1R) que se encuentra en todas las células (Figura 1.6).

A nivel intracelular, esta cascada de señalización activa los sustratos del receptor de insulina, principalmente IRS1, y, posteriormente, las fosfatidilinositol-3 quinasas (PI3K) y la proteína quinasa B (AKT). Todo ello conduce a la activación del complejo 1 de la diana de rapamicina en células de mamífero (mTORC1) y de las proteínas O de la familia *forkhead* con dominios tipo caja (FOXOs). Además, AKT activa GSK-3 β que promueve la generación de glucógeno y la proteína activadora de Rab GTPasa TBC1D4 que favorece la translocación de las vesículas de GLUT4 a la membrana plasmática y así, aumentando la captación de glucosa (Haeusler, McGraw & Accili, 2018). Específicamente, la isoforma 1 de AKT es necesaria para la adipogénesis y los factores FOXO regulan los efectos de la insulina en la diferenciación de los adipocitos (Kajno, McGraw & Gonzalez, 2015; Nakae *et al.*, 2003).

Teniendo en cuenta el papel fisiológico que juega la insulina en la homeostasis glucídica, es lógico pensar que esta hormona actúa como un factor permisivo en la diferenciación de los adipocitos. Ante una situación de hiperinsulinemia, que viene dada normalmente por una sobrealimentación, una de las respuestas adaptativas más rápidas es la generación y maduración de nuevos adipocitos para crear nuevos lugares de almacenamiento de lípidos o, lo que es lo mismo, se favorece la hiperplasia del tejido adiposo.

Aun así, puesto que los receptores de IGF-1 se expresan a niveles mucho más altos en los preadipocitos que los receptores de insulina, se necesitarían mayores niveles de insulina para activar la señalización intracelular en los preadipocitos indiferenciados que para los adipocitos maduros (Bäck & Arnqvist, 2009).

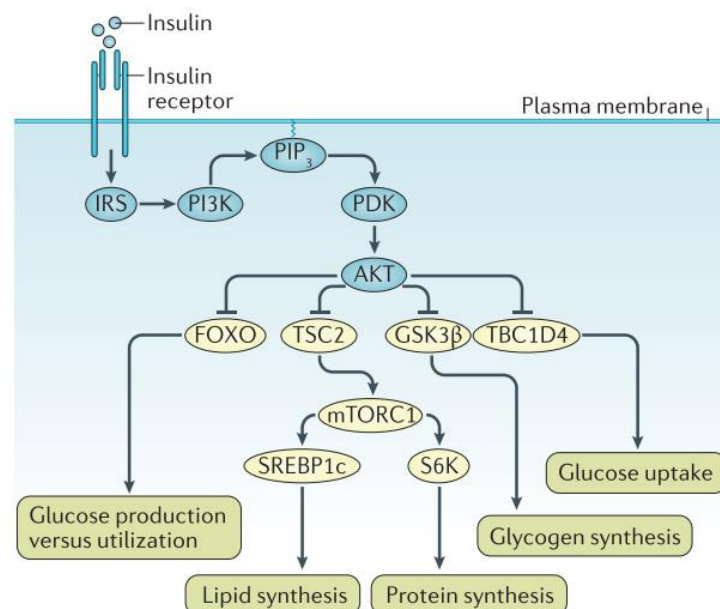


Figura 1.6 Cascada de señalización de insulina. La insulina se une a IR, lo que provoca la fosforilación de tirosina de IR y de IRS. La fosforilación de IRS permite la unión de PI3K que sintetiza PIP₃ (fosfatidil inositol 3,4,5 trifosfato) en la membrana plasmática, reclutando PDK (quinasa dependiente de fosfatidilinositol) que fosforila AKT produciendo su activación. AKT fosforilará diferentes sustratos que derivarán en la inhibición de las vías relacionadas con la síntesis de macromoléculas. Adaptado de Haeusler, McGraw & Accili, 2018.

1.2.2 Tejido adiposo blanco

Todos los eucariotas, desde las levaduras hasta el ser humano, son capaces de almacenar energía en forma de gotas lipídicas, pero sólo los vertebrados presentan células especializadas en esta función: los adipocitos blancos (Ottaviani, Malagoli & Franceschi, 2011).

1.2.1.1 Morfología

Los adipocitos blancos se caracterizan, generalmente, por poseer una única gota lipídica central que desplaza al núcleo a una posición periférica, lo que hace que este último adquiera una configuración de medialuna. Sus mitocondrias, también rodeando a la vacuola, presentan formas alargadas y finas en una red ramificada y sus crestas cortas están orientadas aleatoriamente. En el caso del retículo endoplásmico, la parte lisa está compuesta por pequeñas cisternas que se encuentran en contacto con la superficie de la gota lipídica, lo que sugiere interacciones funcionales entre ambos. Por todo esto, se considera que estos adipocitos son uniloculares y esféricos (**Figura 1.7**).

El tamaño de los adipocitos blancos maduros es variable y depende de la zona en la que se localizan. Así las células más grandes se encuentran en la grasa visceral gonadal y en la grasa subcutánea abdominal mientras que las más pequeñas aparecen dentro de órganos como el músculo, el hígado o el corazón y en otros depósitos viscerales más pequeños (Cinti, 2018a).

Cabe recordar que el tejido adiposo, específicamente el blanco, está formado por varios tipos celulares además de por adipocitos blancos maduros: células inmunitarias, precursores adipocíticos, células endoteliales, etc...

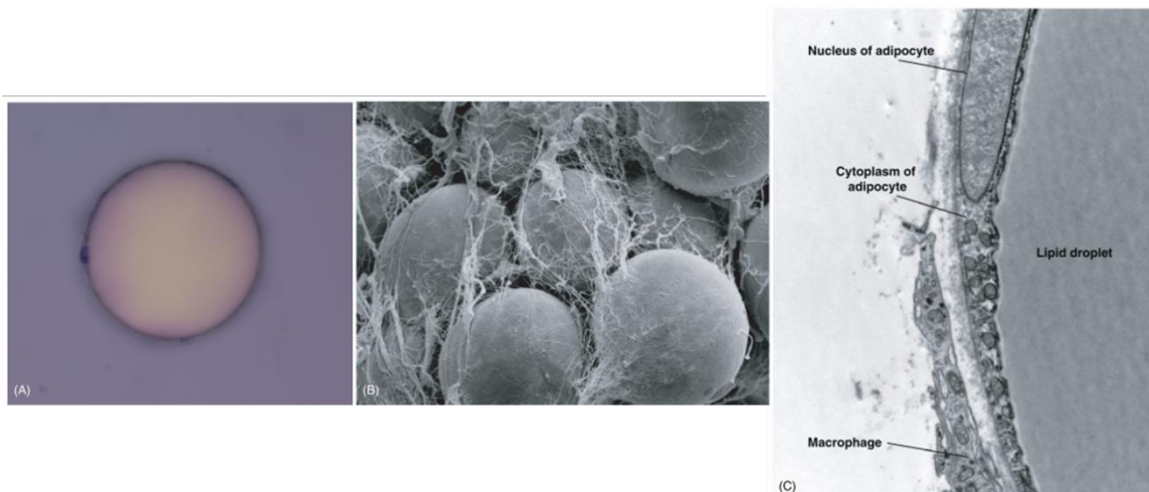


Figura 1.7 Morfología del adipocito blanco. Imágenes de microscopía donde se observa la estructura esférica de un adipocito blanco en humanos (A) y de varios adipocitos en ratones (B). El bajo número de mitocondrias de estos adipocitos se puede observar en la zona periférica junto al núcleo del adipocito en la imagen de microscopía electrónica (C). *Adaptado de Cinti, 2018a.*

1.2.1.2 Localización

La grasa blanca es el tejido más abundante del órgano adiposo y se puede encontrar en casi cualquier zona del organismo. Aun así, los depósitos más grandes se han clasificado dependiendo de su localización anatómica, por lo que encontramos el tejido adiposo blanco visceral (VAT) y subcutáneo (SAT).

En los roedores, el compartimento subcutáneo está formado por los depósitos inguinales, axilares, dorsolumbares y glúteo-femorales. Pese a que la localización principal del tejido adiposo marrón se encuentra entre las escápulas, también existe SAT interescapular. Por otro lado, los compartimentos principales viscerales se pueden dividir en: retroperitoneal, rodeando los riñones; mesentérico, alrededor del intestino; y gonadal, cubriendo los órganos reproductores (Sakers *et al.*, 2022) (Figura 1.8A).

En el humano, VAT se ubica en la cavidad peritoneal correspondiendo a los depósitos omental y mesentérico. No obstante, SAT puede llegar a representar más del 80% de la grasa blanca total y se sitúa justo por debajo de la piel, concentrándose en las zonas abdominal y glúteo-femoral (Chusyd *et al.*, 2016) (Figura 1.8B).

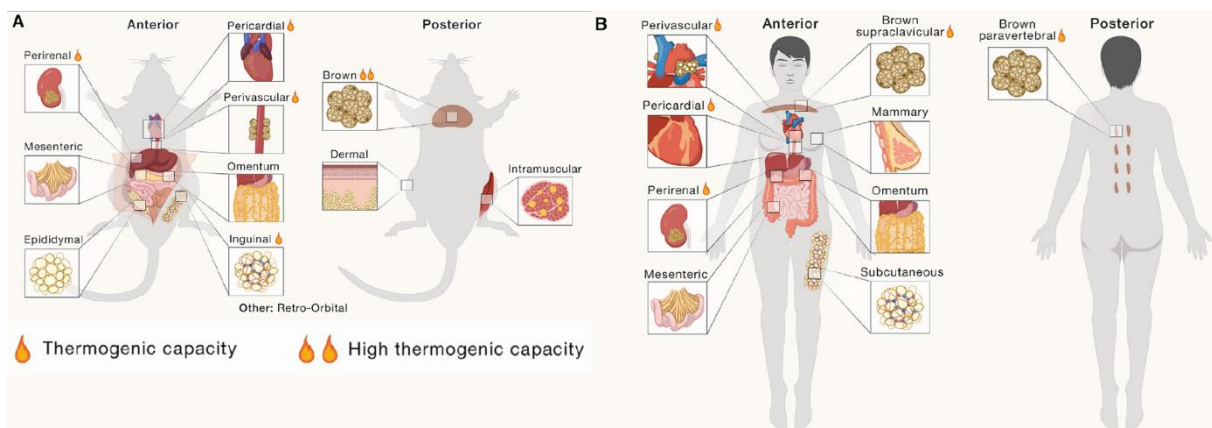


Figura 1.8 Localizaciones del órgano adiposo en el ratón (A) y en el humano (B). La grasa blanca gonadal de ratón es similar al depósito visceral del humano y el tejido inguinal, al subcutáneo. Los símbolos de fuego señalan las localizaciones termogénicas. Adaptado de Sakers *et al.*, 2022.

Además, se pueden encontrar pequeños depósitos de adipocitos blancos que desempeñan funciones de señalización y mecánicas en distintas localizaciones: músculo, médula ósea, ojos, pies/manos, cara y dermis (Zwick *et al.*, 2018). Además, se han descrito unos adipocitos “rosas”, debido al color que adquiere el tejido, que aparecen en las glándulas mamarias durante el periodo de embarazo y que se mantienen durante la lactancia (Cinti, 2018b).

1.2.1.3 Funcionalidad


El tejido adiposo blanco (WAT) es el principal depósito de almacenamiento de energía, pero, además, también es un tejido endocrino capaz de liberar distintas hormonas, citoquinas y adipocinas que regulan el metabolismo de todo el

organismo (Hassan, Latif & Yacoub, 2012). Además, puede actuar como un aislante térmico y proteger los órganos internos de daños mecánicos.

Como ya se ha mencionado previamente, es bien conocido que la función fundamental de este tejido es la de reservar el exceso de calorías en forma de triglicéridos. Los adipocitos responden a señales sistémicas para almacenar o movilizar nutrientes según las necesidades del organismo (Ghaben & Scherer, 2019). Durante un exceso nutricional donde la glucemia aumenta, la insulina inhibe la acción de enzimas lipolíticas y favorece la captación de glucosa y la *lipógenésis de novo*, o síntesis de triglicéridos, que se almacenarán en la vacuola lipídica. En situaciones de ayuno o deprivación, la primera señal que estimula la *lipólisis*, proceso catabólico que permite la movilización de lípidos, es una bajada de la glucosa en sangre. Esto promueve la secreción de diferentes hormonas como el glucagón o la noradrenalina que activan varias lipasas, como la lipasa sensible a hormonas (HSL) o la lipasa adipocítica de triglicéridos (ATGL), que se translocan a la superficie de la gota lipídica para fragmentar los triglicéridos del interior y poder liberar ácidos grasos y glicerol al torrente sanguíneo para su posterior uso en diferentes órganos como el hígado y el músculo esquelético.

Respecto a su función endocrina, el tejido adiposo blanco secreta una amplia variedad de adipoquinas. Estas desempeñan un papel muy importante en la regulación del metabolismo mediante cambios en la sensibilidad de insulina, promovida por la adiponectina y reducida por la resistina; y la inflamación controlada por la secreción de TNF- α , IL-6 y/o IL-1 (Funcke & Scherer, 2019). Algunas de las adipoquinas más importantes secretadas por el tejido adiposo blanco son:

- ***Leptina***: Se secreta en proporción al tamaño total de la grasa, es decir, cuanta más acumulación de lípidos presente una persona, mayores niveles de leptina presentará en sangre. El receptor de esta adipoquina está presente en muchos tejidos y, tras su activación, actúa inhibiendo el neuropéptido Y, estimulante del apetito, y promoviendo la secreción de la melanotropina- α y la corticoliberina, supresores del apetito (Hassan, Latif & Yacoub, 2012). Puesto que en la obesidad existen altos niveles de leptina pero no aparece una supresión del apetito, la resistencia a leptina puede ser un fenómeno común en esta patología.
- ***Adiponectina***: Los niveles de esta adipoquina son, por lo general, inversamente proporcionales al IMC. Actúa mejorando la sensibilidad a la insulina y ejerce efectos antiinflamatorios y antiapoptóticos en distintos tipos celulares (Turer & Scherer, 2012).
- ***Resistina***: Esta adipoquina es conocida por ser un posible vínculo entre la obesidad y el desarrollo de resistencia a la insulina, de ahí su nombre (Steppan *et al.*, 2001). Ejerce efectos pleiotrópicos en el metabolismo de la glucosa y en la sensibilidad a la insulina, y sus niveles en sangre son proporcionales a la insulinemia.



Por último, la función mecánica de este tejido en el organismo permite una amortiguación física, puesto que muchos depósitos blancos se encuentran en talones, nalgas y palmas de las manos; amortiguación interna, ya que la grasa visceral rodea algunos órganos como el corazón, las glándulas suprarrenales, los riñones y los ovarios y los protege de daños corporales; y aislamiento térmico debido, en parte, a la capacidad de *browning* que presenta el tejido ante situaciones de frío, proceso del que se hablará más adelante.

1.2.3 Tejido adiposo marrón

El tejido adiposo marrón (BAT) o grasa parda, pese a representar una fracción pequeña del órgano adiposo total, ejerce un impacto metabólico en el organismo debido a su capacidad termogénica. Cuando este tejido se encuentra activo, puede aumentar el gasto energético entre un 40-80% en humanos (Ouellet *et al.*, 2012).

1.2.3.1 Morfología

Los adipocitos marrones tienen un núcleo redondeado céntrico y gotas lipídicas multiloculares de pequeño tamaño, lo que le da su forma poligonal. La característica más relevante, y por la cual proviene el nombre de “marrón” o “parda”, es que poseen un gran número de mitocondrias de todos los tamaños. Estos orgánulos presentan crestas laminares y contienen una proteína desacoplante de la cadena respiratoria (UCP-1) que se encuentra únicamente en este tipo de célula y se considera un marcador de adipocitos marrones metabólicamente activos puesto que juega un papel fundamental en la termogénesis adaptativa. Además, este tipo de adipocitos poseen un retículo endoplasmático (RE) alargado con el que las mitocondrias forman una red interconectada, estos puntos de unión entre ambos orgánulos recibe el nombre de membranas asociadas a mitocondrias (MAM) (de Meis *et al.*, 2010) (**Figura 1.9**).

Por otro lado, los adipocitos marrones muestran un marcaje proteico específico. Como se ha explicado previamente, *PRDM16* juega un papel fundamental en el desarrollo del tejido adiposo marrón, durante el proceso de diferenciación (Seale *et al.*, 2008). Este factor de transcripción se une y regula *C/EBPβ*, *PPAR-γ* y el coactivador del receptor γ 1- α activado por el proliferador de peroxisomas (*PGC-1α*) para inducir la expresión génica específica de estos adipocitos: *UCP-1*, *deiodinasa 2 (Dio2)* y receptor β 3-adrenérgico (*ADRB3*) (Kajimura, 2015). Además, *PGC-1α* controla la activación de la biogénesis mitocondrial, el metabolismo oxidativo, y por lo tanto, la termogénesis adaptativa.

Cabe destacar que los depósitos marrones se encuentran altamente vascularizados e inervados, tanto los vasos sanguíneos como los nervios rodean acúmulos de adipocitos marrones (Cinti, 2018a).

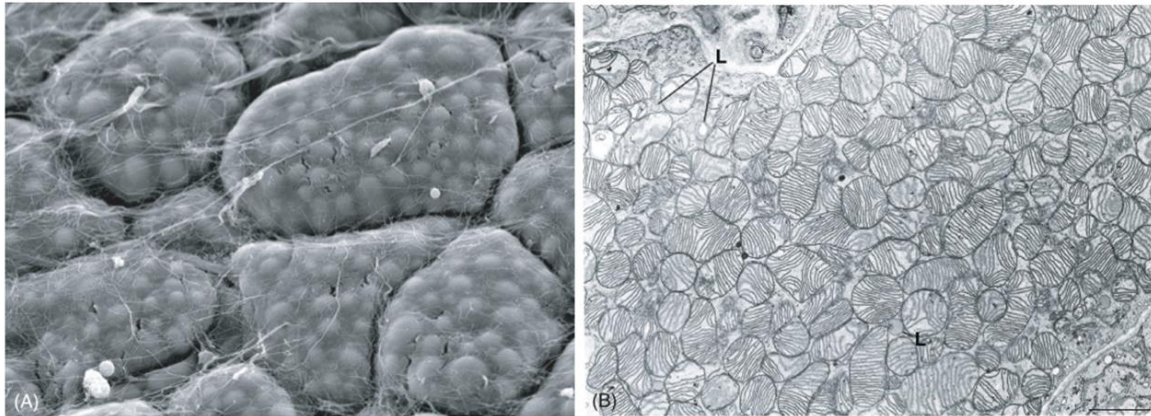



Figura 1.9 Estructura del tejido adiposo marrón. (A) Imagen de microscopía de barrido y (B) microscopía electrónica del tejido adiposo marrón murino. Adaptado de Cinti, 2018a.

1.2.3.2 Localización

Evolutivamente, el tejido adiposo marrón se encuentra en mamíferos placentarios o euterios mientras que el resto de los vertebrados (marsupiales y monotremas) sólo poseen tejido adiposo blanco. A estos animales se les considera también endotermos puesto que son capaces de ajustar su temperatura corporal con la ambiental mediante procesos de actividad interna como jadear o tiritar. Además, este tejido también aparece en animales “protoendotermos”, es decir, aquellos animales cuya temperatura corporal es similar a la ambiental mediante patrones similares a los que tendrían los reptiles (Oelkrug *et al.*, 2013). Probablemente, estos depósitos les permite mantener la endotermia durante etapas como el embarazo o el cuidado de las crías. Por último, cabe destacar que el papel de este tejido es fundamental en animales que hibernan.

Este tejido ha sido ampliamente estudiado en modelos animales de ratón puesto que se creía que no existía en el humano. El mayor depósito de tejido adiposo marrón murino se encuentra en la zona interescapular, que está ampliamente inervada por el sistema nervioso simpático. También aparecen depósitos dispersos en las regiones cervicales, axilares, perivasculares y perirrenales (Zhang *et al.*, 2018) (**Figura 1.8B**).

En humanos, los bebés también presentan depósito interescapular de tejido adiposo marrón y, hasta hace unos años, se pensaba que desaparecía con el desarrollo llegando a no encontrarse en adultos. Gracias a las técnicas de FDG PET-CT utilizadas en los escáneres para pacientes con cáncer, se detectó tejido adiposo marrón funcional en humanos adultos (Nedergaard, Bengtsson & Cannon, 2007). Este procedimiento utiliza un análogo de la glucosa marcado con flúor (^{18}F -FDG; [18F]-2-fluor-D-2-deoxy-D-glucosa) que es absorbido por los tejidos metabólicamente activos, pero no es metabolizado, por lo que queda atrapado dentro de las células. Mientras que la tomografía de emisión de positrones (PET) puede visualizar y cuantificar la captación de este marcador radiactivo, la tomografía axial computarizada (TAC) es necesaria para obtener la información



anatómica, por ello la importancia de que la técnica sea combinada. En los humanos adultos se encuentran depósitos considerables, aunque variables, de BAT en las regiones cervicales, axilares, perirrenales, suprarrenales, perivasculares, a lo largo de la tráquea y, más destacable, en las uniones paravertebrales y supraclaviculares (Ouellet *et al.*, 2011) (**Figura 1.8A**). Diferentes estudios que utilizaron FDG PET-CT observaron que los depósitos funcionales de tejido adiposo marrón son más frecuentes en mujeres y que estos disminuyen con la edad, encontrándose más en jóvenes. Además, el tamaño y número de estos depósitos se correlacionan inversamente con el IMC, así personas que sufren de obesidad o sobrepeso presentan unas menores cantidades de tejido adiposo marrón (Cypess *et al.*, 2009).

1.2.3.3 Funcionalidad

El tejido adiposo marrón está diseñado para mantener la temperatura corporal en situaciones de frío a través de la producción de calor inducida por la *termogénesis adaptativa* o sin tiriteo, proceso del que se hablará con más detalle posteriormente. Esta función específica del BAT está mediada por la proteína UCP-1, cuya expresión supone el desacoplamiento de la producción de ATP (adenosín trifosfato) y la oxidación de sustratos. Así, los adipocitos marrones son capaces de oxidar rápidamente sus reservas de lípidos y los sustratos circulantes, produciendo calor en el proceso y aumentando la tasa metabólica (Marlatt & Ravussin, 2017).

Adicionalmente a la función termogénica, la activación del tejido adiposo marrón mejora la homeostasis glucídica del organismo. Esto se debe a que el BAT es uno de los tejidos que presenta mayor captación de glucosa, generalmente durante la termogénesis o durante procesos anabólicos como los estimulados por la insulina (Cannon & Nedergaard, 2004). En modelos murinos, el trasplante de tejido adiposo marrón en ratones obesos mejoraba la sensibilidad a insulina y disminuía la acumulación de grasa (Liu *et al.*, 2015). Varios estudios probaron que ratones con una mayor actividad de BAT estaban protegidos frente al aumento de peso y, por tanto, a la disfunción metabólica (Harms & Seale, 2013). De igual modo, en humanos se ha visto que un incremento en la actividad de la grasa parda se asocia a efectos metabólicos beneficiosos para el organismo como una mayor movilización de lípidos de las reservas periféricas y la eliminación de moléculas oxidativas (Chondronikola *et al.*, 2016).

Al igual que el WAT, el BAT también presenta una función secretora, aunque no tan importante. Esta característica podría estar contribuyendo también la asociación entre la actividad de la grasa parda y la protección frente a la obesidad, hiperlipidemia e hiperglucemia. La mayoría de las adipocinas secretadas por el tejido adiposo blanco se expresan pobremente en el marrón (Cannon & Nedergaard, 2004). Puesto que el tejido adiposo marrón disipa la energía en forma de calor y utiliza lípidos y glucosa en este proceso, es lógico pensar que las moléculas secretadas por este tejido y que reciben el nombre de *batoquinas* faciliten estas funciones. Algunas moléculas con funciones paracrinas y

autocrinas son el factor de crecimiento nervioso (NGF) y factor de crecimiento de fibroblastos 2 (FGF-2) que aumentan la inervación y el número de adipocitos en el tejido adiposo marrón, así como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFA) que promueve la vascularización del tejido en situaciones en las que la termogénesis se encuentra activa (Villarroya *et al.*, 2017).

Sin embargo, las batoquinas más importantes son aquellas que tienen una función endocrina:

- Factor de crecimiento de fibroblastos (FGF21): Pese a que se secreta mayoritariamente por el hígado y el músculo esquelético, se considera una batoquina. Esta hormona mejora la sensibilidad a insulina mediante la regulación del metabolismo lipídico y, por tanto, la glucemia y lipidemia. En los últimos estudios se ha observado un papel activador del proceso de *browning* en el tejido adiposo blanco (Fisher *et al.*, 2012). Además, puede promover la secreción de adiponectina por el tejido adiposo blanco (Liu *et al.*, 2022). También juega un papel autocrino puesto que promueve la termogénesis y la oxidación metabólica en BAT (Villarroya *et al.*, 2017).
- IL-6: Pese a que esta interleuquina es proinflamatoria, se ha observado que su señalización promueve la activación de los macrófagos M2, cuya función es antiinflamatoria, al sensibilizarlos a la acción de la interleuquina-4 (IL-4) y que se traduce en una mejora en la sensibilidad a insulina (Mauer *et al.*, 2014). También, IL-6 es requerida en el proceso de *browning* de la grasa blanca en respuesta al frío (Knudsen *et al.*, 2014).
- Neuregulina 4 (NRG-4): Esta proteína regula el crecimiento de las neuritas y, también, actúa en el hígado atenuando la señalización lipogénica (Villarroya *et al.*, 2017).
- Proteína de unión al retinol 4 (RBP-4): Este transportador de vitamina A también se considera una adipoquina secretada por el tejido adiposo blanco y se asocia a resistencia a insulina (Yang *et al.*, 2005). Sin embargo, cuando es secretada por BAT se vincula con una mejora en la sensibilidad a la insulina (Bartelt & Heeren, 2014).

Además, existen otras batoquinas con funciones imprescindibles en la señalización del tejido adiposo marrón como el BMP-7 que permite la diferenciación de los preadipocitos en adipocitos marrones, o TNF- α e IL-1 que son liberados en situaciones de sobrealimentación e inducen el *browning* del WAT durante la exposición al frío (Villarroya *et al.*, 2017). Por otro lado, se encuentran otras moléculas implicadas en la funcionalidad del BAT, como el óxido nítrico (NO) cuyos niveles aumentan durante la exposición al frío para garantizar un mayor flujo sanguíneo.

1.2.4 Adipocitos *beige*/*brite*

Durante la última década, se ha descrito un tercer tipo de adipocito parecido en morfología y función a los marrones, pero situados dentro del tejido adiposo blanco. Debido a su apariencia y su localización reciben el nombre de células *beige* o *brite*.

Originalmente, las células *beige* se observaron en roedores tras una exposición prolongada al frío o una estimulación β -adrenérgica (Loncar, Afzelius & Cannon, 1988; Wang *et al.*, 2013). El efecto de estos estímulos desencadena la aparición de un conjunto de adipocitos en el tejido adiposo blanco que presentan cantidades mitocondriales considerables, expresan UCP-1 (UCP-1⁺), y poseen un gran número de gotas lipídicas, morfología similar, aunque no exactamente igual, a los adipocitos marrones (Figura 1.10).

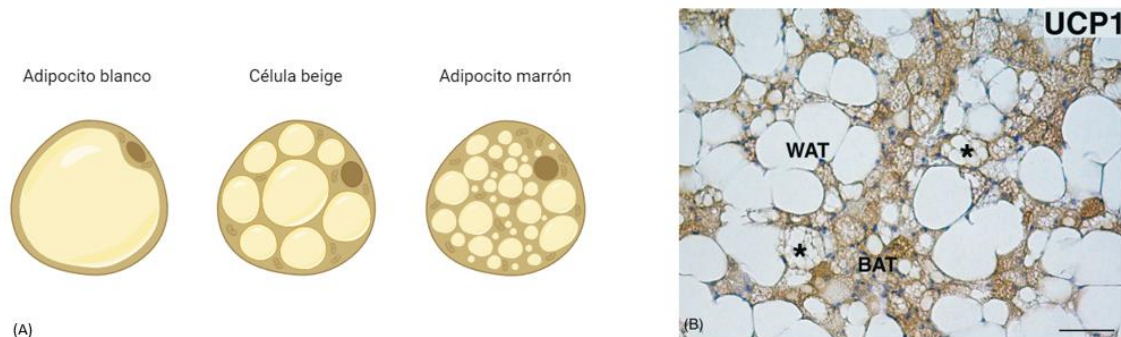


Figura 1.10 Morfología del adipocito beige/brite. (A) Comparativa estructural entre los 3 tipos de adipocitos que existen en el órgano adiposo, esquema generado por Biorender. (B) Inmunohistoquímica de UCP-1 en un área mixta del tejido adiposo blanco en humanos, adaptada de Cinti, 2018a.

La abundancia de estos clústeres de células *beige* en roedores varía entre los depósitos de grasa blanca, habiendo una mayor proporción en las zonas inguinales y retroperitoneales, y en menor medida en las regiones gonadal y mesentérica (Rosen & Spiegelman, 2014).

En humanos, el tejido adiposo marrón interescapular que aparece en recién nacidos es muy similar a la grasa parda característica de roedores (Lidell *et al.*, 2013), pero en los adultos existen diferentes ratios de adipocitos marrón:*beige* dependiendo del depósito a evaluar, así en las regiones del cuello y de la columna vertebral el ratio es mayor mientras que en la zona supraclavicular es menor (Cypess *et al.*, 2013; Jespersen *et al.*, 2013).

Estos adipocitos son considerados transitorios puesto que son células termogénicas inducibles por diferentes estímulos como exposición al frío, ejercicio, agentes farmacológicos como análogos β 3-adrenérgicos, o adipoquinas, pero una vez que estos terminan, este tipo celular desaparece (Pilkington, Paz & Wankhade, 2021). El proceso por el cual aparecen adipocitos *beige* en el tejido adiposo blanco recibe el nombre de “*browning*”, “*beiging*” o marronización.

Durante este proceso, las células *beige* pueden generarse en el tejido adiposo blanco por tres vías: la diferenciación de las células progenitoras en adipocitos *beige* (adipogénesis *beige de novo*), la transdiferenciación de adipocitos blancos maduros en células *beige* por la activación del programa termogénico, y la proliferación de adipocitos *beige* maduros (Shao *et al.*, 2019). El programa termogénico implica la expresión de UCP-1, la activación de la biogénesis mitocondrial y la reestructuración de la morfología a una multilocular de las gotas lipídicas.

La principal diferencia entre la grasa parda y la *beige* es que la primera no es inducible mientras que en el caso de la segunda es estrictamente necesaria su estimulación. Por lo general, el adipocito marrón expresa mayores niveles de UCP-1 que promueven un mayor desacoplamiento de la respiración, pero no es hasta que son estimuladas las células *beige*, cuando activan la misma respuesta que los marrones (Shabalina *et al.*, 2013). Esto sugiere que los adipocitos *beige* son bifuncionales, en ausencia de estímulos termogénicos actúan como reservas de energía acumulando triglicéridos, pero son capaces de generar calor cuando reciben las señales adecuadas.

Gracias a los estudios del órgano adiposo, se ha demostrado que la plasticidad es una característica fundamental del mismo. Ante una exposición al frío, los animales tiemblan al principio y activan su tejido adiposo marrón. Cuando esta exposición se prolonga en el tiempo, aumenta la masa de grasa parda y la expresión de proteínas termogénicas (Cannon & Nedergaard, 2004). Por otro lado, el proceso de *browning* se activa y comienza un remodelado en el tejido adiposo blanco donde se incrementa la angiogénesis y la arborización de las fibras nerviosas (Sakers *et al.*, 2022). Cabe destacar que cuando el frío desaparece, estos cambios en el órgano adiposo revierten, recalcando la plasticidad que presenta dicho tejido.

En los últimos años, se ha observado que UCP-1 no es un marcador necesario de las células *beige*, aunque la mayoría sí expresan esta proteína. Gracias al estudio de estos adipocitos, se han encontrado mecanismos independientes de UCP-1 que también generan calor (Granneman *et al.*, 2003; Ukropec *et al.*, 2006; Kazak *et al.*, 2015). De esta manera, se considera que los adipocitos *beige* pueden ser UCP-1⁺ o UCP-1⁻, pero siempre exhiben un perfil genético diferente a los adipocitos blancos y marrones siendo los principales marcadores de superficie Cd137 y Tmem26 (Wu *et al.*, 2012).

Por otro lado, este tipo de grasa presenta diferentes adipoquinas entre la que destaca FGF-21 que activa PGC-1 α , BMP4 y BMP2. Además, la irisina se considera otra adipoquina que actúa en las células *beige* y se ha relacionado recientemente con la obesidad (Arhire, Mihalache & Covasa, 2019).

1.3 TERMOGÉNESIS ADAPTATIVA: PAPEL DE LA MITOCONDRIA

La termogénesis se refiere a la energía disipada en forma de calor en respuesta a cambios ambientales como exposición al frío o alteraciones en la dieta (Spiegelman & Flier, 2001). Debido a estos estímulos, se han propuesto dos tipos de termogénesis: termogénesis **inducida por frío** (TIF) y la **inducida por dieta** (TID).

La TIF se desencadena principalmente por el sistema nervioso simpático (SNS) (Rosen & Spiegelman, 2014) y está asociada con un incremento en la respiración del tejido adiposo marrón que se atenúa en ausencia de UCP-1. Este tipo de termogénesis es objeto de estudio para el aumento del gasto energético y la mejora del peso corporal mediante la activación del tejido adiposo marrón y/o el proceso de *browning*, considerados tejidos termogénicos.

En el caso de la TID, también llamada termogénesis posprandial, esta se activa a corto plazo por una activación del SNS al igual que TIF y el estímulo que la desencadena es la sobrealimentación (Carpentier *et al.*, 2023). Este proceso parece estar ligado a la disipación del exceso de energía en forma de calor, en vez de almacenarlo, para proteger al organismo de un aumento de peso. Sin embargo, el papel del tejido adiposo marrón en este tipo de termogénesis no es aceptado por todos los investigadores debido a que no se ha podido demostrar en estudios *in vivo* de roedores que un exceso de ingesta calórica active este tejido (Kozak, 2010).

Por otro lado, la termogénesis también se puede clasificar en: **con tiriteo** (TCT) y **sin tiriteo** (TST). Por lo general, la zona de termoneutralidad, aquella temperatura que se considera óptima para los procesos metabólicos haciendo que el gasto energético se mantenga en su mínimo, se acerca a 30°C en mamíferos placentarios.

En una situación aguda de frío, aproximadamente 4-5°C de temperatura ambiental por unas horas, el organismo comenzará a tiritar para generar calor y el principal responsable de esta termogénesis con tiriteo será el músculo esquelético. La epidermis de la piel posee termorreceptores que ante un enfriamiento producen una señal sensorial que asciende hasta el hipotálamo y excita las neuronas que activarán el tiriteo. Estas neuronas estimulan las motoneuronas- γ y motoneuronas- α situadas en el asta ventral de las vértebras, y, al inervar las fibras musculares, estas se contraen y estiran. La generación de un potencial de acción, detectable por electromiograma, da lugar a su propagación a lo largo del sarcolema y del sistema de túbulos transversos de las fibras musculares produciendo el tiriteo. Al igual que el ejercicio, esta termogénesis necesita de la oxidación de carbohidratos, preferentemente glucosa derivada de la glucogenólisis muscular; lípidos y proteínas (Blondin & Haman, 2018) (**Figura 1.11**).

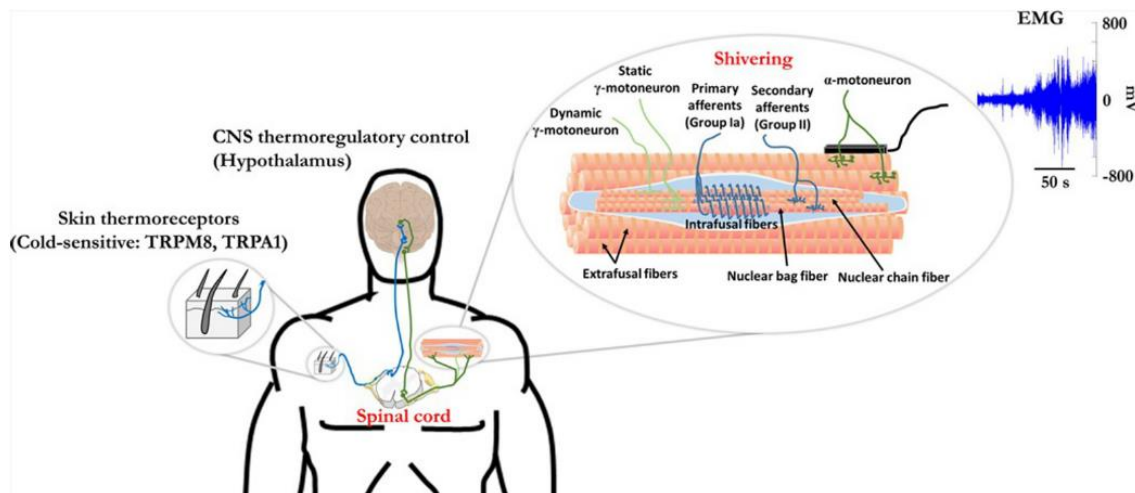


Figura 1.11 Circuito neuronal y reflejo de estiramiento implicado en el tiriteo. El órgano implicado en el proceso de tiriteo es el músculo esquelético, cuya constricción y relajamiento se ven favorecidos por la señal nerviosa generada en los termorreceptores de la piel. Adaptado de Blondin & Haman, 2018.

Por otro lado, cuando la situación de frío se alarga en el tiempo, desde 8 horas hasta semanas, el tiriteo, que es la principal forma de generación de calor, se detiene. No obstante, la tasa metabólica alta se mantiene, lo que se debe a la activación de la termogénesis sin tiriteo o, también llamada, termogénesis adaptativa. Este concepto debe englobar todos los procesos metabólicos y termogénicos que no tengan implicado el tiriteo (Cannon & Nedergaard, 2004). El frío crónico activa el tejido adiposo marrón, por lo que este tejido se considera el principal sitio de termogénesis adaptativa clásica.

Como ya se ha explicado previamente, la grasa parda se caracteriza por un gran número de mitocondrias. Una definición básica de estos orgánulos es que son “hornos” donde, varias moléculas, generalmente derivadas de los lípidos y la glucosa, se oxidan generando energía que puede ser almacenada como ATP o liberada en forma de calor (Spiegelman & Flier, 2001). Las mitocondrias de este tejido se consideran únicas puesto que son extremadamente eficientes en la producción de calor y utilizan los lípidos como fuente preferente de energía. Además, expresan la proteína desacoplante UCP-1, responsable de la fuga de protones (H^+ leak) que genera calor durante la termogénesis adaptativa.

Esta tesis se centra en la termogénesis sin tiriteo clásica, inducida por frío, en la que el tejido adiposo marrón juega un papel fundamental debido a que en los últimos años ha incrementado su interés como diana terapéutica de varias enfermedades metabólicas como la obesidad, la diabetes mellitus tipo 2 o el hígado graso no alcohólico.

1.3.1 Cadena respiratoria mitocondrial y UCP-1

La capacidad termogénica de los adipocitos marrones y *beige* proviene del metabolismo oxidativo. En las células de mamíferos, la energía libre para la vida la proporcionan los sustratos derivados del ciclo del ácido tricarboxílico (TCA) o ciclo de Krebs que entrarán en la fosforilación oxidativa (OXPHOS) que tiene lugar en las mitocondrias. Para entender la producción de ATP en este proceso y el efecto que tiene UCP-1 en él es necesario comprender la cadena de transporte de electrones (CTE) o la cadena respiratoria mitocondrial.

La CTE (**Figura 1.12**) se sitúa en la extensa membrana interna de la mitocondria llamada cresta mitocondrial, cerca de la matriz mitocondrial donde tiene lugar el ciclo de Krebs, y se compone de cuatro complejos proteicos transmembrana (I-IV) y dos portadores de transferencia de electrones móviles (ubiquinona y citocromo c). Tanto NADH como FADH₂, productos de TCA, donan electrones a la cadena a través del Complejo I (NADH deshidrogenasa o NADH:ubiquinona oxidoreductasa) o del Complejo II (succinato deshidrogenasa), respectivamente. Los electrones (e⁻) de NADH del Complejo I pasan a la ubiquinona (CoQ), que se reduce a ubiquinol (QH₂) en el ciclo Q, y gracias a esta transferencia de electrones se bombean 4 protones (H⁺) por el Complejo I desde la matriz al espacio intermembrana. Por otro lado, los e⁻ donados por FADH₂ se transfieren secuencialmente desde el Complejo II hasta CoQ, al igual que sucede en el Complejo I salvo que este transporte de e⁻ no viene acompañado de un bombeo de H⁺. Cabe destacar que el Complejo II también forma parte de TCA oxidando el succinato en fumarato.

Dentro del ciclo Q, los e⁻ son transferidos al Complejo III (coenzima Q: citocromo c reductasa) y, posteriormente, al citocromo c. El QH₂, proveniente de la reducción de CoQ, se une al lado citoplasmático del Complejo III y libera 2 H⁺ al espacio intermembrana. Un e⁻ es transferido de QH₂ al Complejo III y el otro desde el complejo al citocromo c. Posteriormente, una segunda molécula QH₂ se une en el lado de la membrana del Complejo III y experimenta el mismo proceso de oxidación, completando el ciclo Q y bombeando 2 H⁺ más al espacio intermembrana.

Una vez que el citocromo c es reducido, transporta e⁻ desde el Complejo III al Complejo IV (citocromo c oxidasa), donde el oxígeno (O₂) se une y se reduce en agua (H₂O). En este complejo mitocondrial, un total de 8 H⁺ son bombeados desde la matriz: 4 en forma de H₂O y 4 hacia el espacio intermembrana. Este proceso de consumo de oxígeno se denomina respiración mitocondrial.

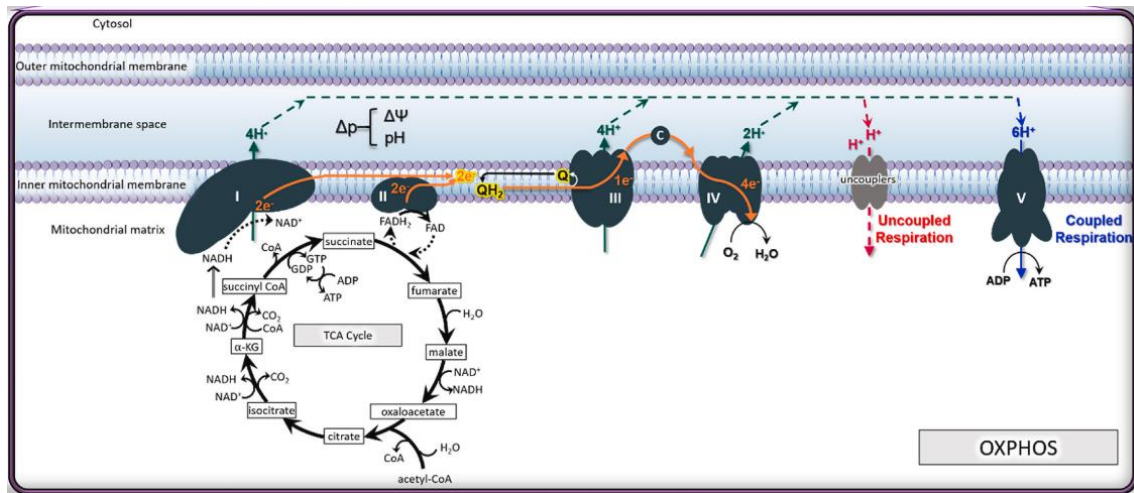



Figura 1.12 Esquema de la cadena de transporte de electrones (CTE) situada en la membrana mitocondrial interna. El transporte de e^- a lo largo de los cuatro complejos implicados en la respiración mitocondrial provoca el bombeo de H^+ en el espacio intermembrana, que serán devueltos a la matriz mitocondrial posteriormente generando ATP por el complejo V (en azul) o produciendo calor por la acción de desacoplantes (en rojo). También se encuentra el esquema de la fuente de sustratos para que la CTE tenga lugar: el ciclo tricarbóxico (TCA) o ciclo de Krebs. Adaptado de Nolfi-Donagan, Braganza & Shiva, 2020.

Como resultado de CTE, un total de 10 H^+ (4 de cada uno de los Complejos I y III, y 2 del Complejo IV) son bombeados desde la matriz al espacio intermembrana, donde se acumulan para generar un gradiente electroquímico de protones conocido como potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi$). El $\Delta\Psi$ combinado con la concentración de protones (pH) genera una fuerza protón-motriz, que es un componente esencial en OXPHOS puesto que acopla el transporte de electrones (Complejos I-IV) y el consumo de oxígeno a la actividad del Complejo V (ATP sintasa), donde los protones vuelven a entrar en la matriz para disipar el gradiente de protones. El Complejo V está formado por varias subunidades y dos dominios principales: uno transmembrana (F_0) y otro que sobresale hacia la matriz (F_1), y funciona como un mecanismo de motor rotacional para permitir la producción de ATP. El movimiento de H^+ a través de F_0 desde el espacio intermembrana está acoplado a esta rotación que resulta de la adición de un adenosín difosfato (ADP) para sintetizar ATP en la región F_1 .

Las mitocondrias de los adipocitos marrones tienen la capacidad única de difundir el gradiente de H^+ de vuelta a la matriz independientemente de la acción de ATP sintasa y su consecuente producción de ATP, lo que deriva en la generación de calor como principal producto de la respiración mitocondrial de estas células. La proteína responsable de que esto suceda es UCP-1, situada en la membrana interna mitocondrial, y supone el desacoplamiento de la respiración mitocondrial. Esta proteína pertenece a la superfamilia de proteínas transportadoras mitocondriales, aunque sólo se han propuesto modelos de su estructura tridimensional (Nedergaard & Cannon, 2018). A pesar de su identificación molecular, todavía no se comprenden varias características básicas de UCP-1: qué transporta realmente, cómo se transporta y cómo se regula su función.



Cuando el tejido no está estimulado por el frío, UCP-1 se encuentra en un estado de “cierre” provocado por la unión de un nucleótido de purina di- o trifosfato (ADP, GDP, ATP o GTP) en el lado citoplasmático. Probablemente ATP sea el nucleótido que más se une a la proteína debido a su alta concentración.

En una situación de frío, UCP-1 se activa para producir calor y poder contribuir a la homeotermia del organismo (**Figura 1.13A**). La termogénesis clásica dirigida por el tejido adiposo marrón y las células *beige* es impulsada por la señalización adrenérgica del sistema nervioso simpático que estimula la lipólisis en los adipocitos. Los ácidos grasos, más concretamente los de cadena larga, generados por esta lipólisis son los activadores alostéricos más aceptados de UCP-1. Se ha propuesto un modelo de activación en el que estos ácidos grasos compiten directamente por el sitio de unión con los nucleótidos de purina desplazándolos y provocando el cambio de conformación activo de UCP-1 (Shabalina *et al.*, 2004). Además, la asociación entre ácidos grasos de cadena larga y UCP-1 puede formar alternativamente grupos carboxilato protonables en la matriz mitocondrial (Carpentier *et al.*, 2023).

Tras el descubrimiento de UCP-1, se consideró que esta proteína desacoplante era estrictamente necesaria para la termogénesis adaptativa y sólo el tiriteo era capaz de compensar su ausencia (Golozoubova *et al.*, 2001). Sin embargo, gracias al hallazgo de células *beige* UCP-1⁻ en el humano y a la adaptación al frío del modelo animal UCP-1 KO, estudios recientes han demostrado que esta proteína no es el único mecanismo de termogénesis, aunque sí el principal. Las dos vías termogénicas independientes de UCP-1 (**Figura 1.13B**) más descritas son:

- ❖ Ciclo del sustrato dependiente de la creatina: La creatina y la hidrólisis de ATP mediada por creatina estimulan el ciclo de la producción de ATP y su consumo dentro de la mitocondria. Al liberar un exceso molar de ADP, con respecto a la cantidad de creatina añadida, las mitocondrias de los adipocitos *beige* potencian la respiración y mantienen la síntesis de ATP, como demostró el aumento de la tasa de consumo de oxígeno cuando el ADP era limitante. Lo más probable es que la creatina facilite la regeneración de ADP a través de la hidrólisis fútil de la fosfocreatina (PCr). Esto podría ocurrir en un único paso enzimático, en el que la PCr sería el sustrato directo de una denominada fosfatasa de PCr (Kazak *et al.*, 2015). Además, se ha sugerido que el metabolismo de la creatina regula el gasto energético tanto en la grasa *beige* como en la marrón.
- ❖ Ciclo fútil del Ca²⁺: En una situación de frío estimulado por norepinefrina (NE), en las membranas asociadas a mitocondrias (MAM) de las células *beige*, el ciclo de Ca²⁺ dependiente de ATP aumenta debido a la activación de la ATPasa 2b de Ca²⁺ del retículo sarco/endoplásmico (SERCA2b) y del receptor de rianodina 2 (RyR2). El Ca²⁺ es transportado de vuelta al retículo endoplasmático y, posiblemente, al interior de la mitocondria. La generación de calor se produce cuando el transporte de Ca²⁺ se desacopla

de la hidrólisis de ATP por SERCA2b. Este incremento de Ca^{2+} en la mitocondria activa el complejo de piruvato deshidrogenasa (PDH), necesaria para la oxidación de la glucosa transformando el piruvato en acetil-CoA, y la síntesis de ATP (Ikeda *et al.*, 2017). Por ello, el principal sustrato de este mecanismo es la glucosa.

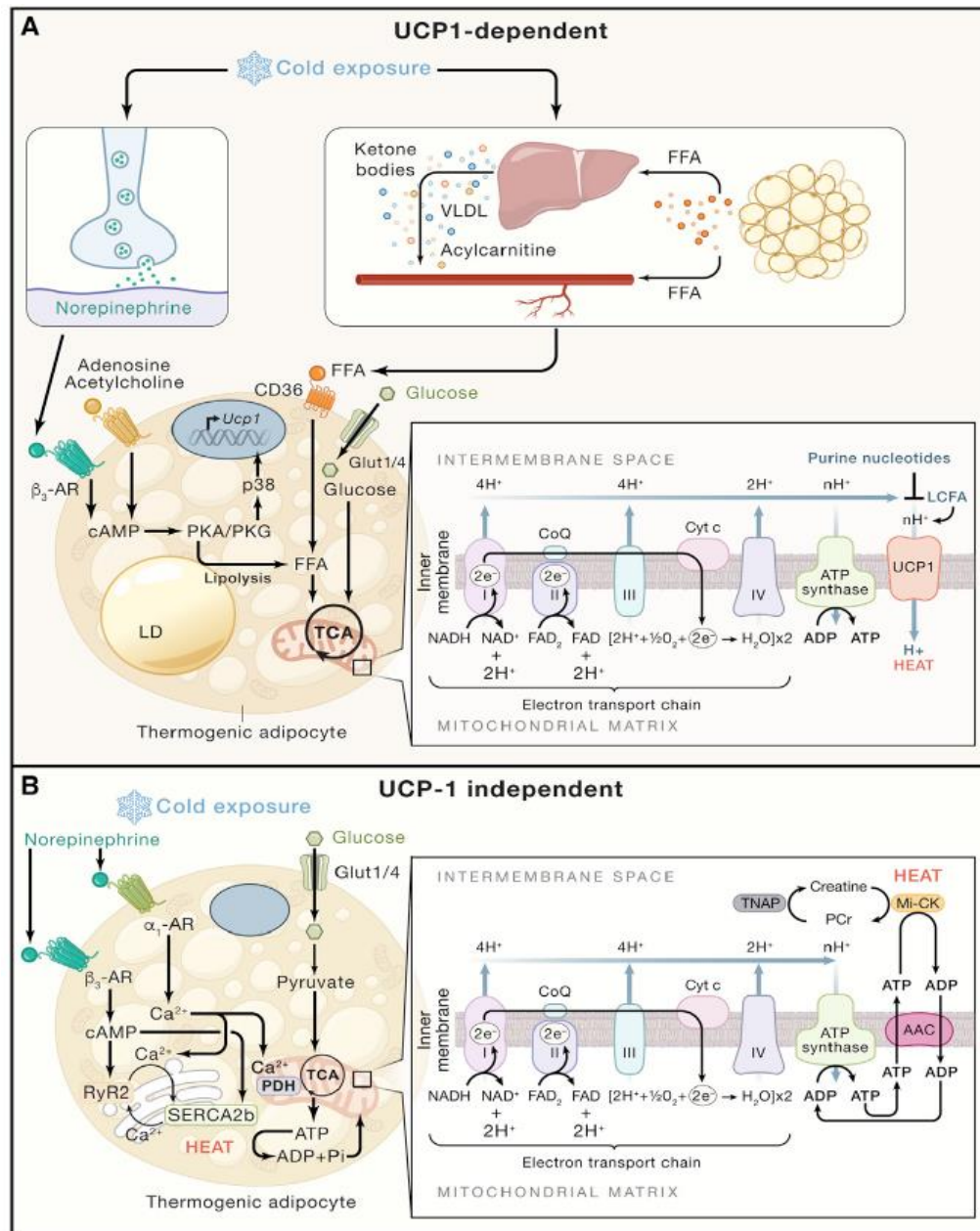


Figura 1.13 Plasticidad metabólica de la termogénesis. (A) Mecanismo dependiente de UCP-1. La exposición al frío o la estimulación adrenérgica aumentan los niveles de AMPc, lo que impulsa la activación de la señalización de PKA/PKG y la lipólisis. P38MAPK a su vez promueve la activación de reguladores transcripcionales que impulsan la biogénesis mitocondrial y la expresión de genes termogénicos. Cuando se activa, UCP1 impulsa la fuga de H⁺ en las mitocondrias, lo que lleva a desacoplar la respiración mitocondrial de la síntesis de ATP y generar un mayor consumo de combustibles como glucosa y ácidos grasos libres. **(B) Mecanismos independientes de UCP-1.** Generalmente se encuentran en las células beige que pueden utilizar el ciclo fútil de Ca²⁺ a través de la vía SERCA2b-RyR2 en el retículo endoplásmico, o el ciclo de la creatina en las mitocondrias para producir calor independientemente de la expresión de UCP-1 durante la exposición al frío.

Ambas vías requieren tener activas la glucólisis y síntesis de ATP mitocondrial para proporcionar sustratos para estos ciclos fútiles. Adaptado de Sakers *et al.*, 2022.

1.3.2 El ciclo de la mitocondria: balance mitocondrial

No sólo el estudio de la función mitocondrial sino también de su morfología ha concluido la importancia que estos orgánulos poseen en la regulación de la termogénesis y de la glucemia basal.

En respuesta a los cambios en cuanto a la demanda y el suministro de energía, el organismo se adapta ajustando tanto su capacidad así como su eficiencia con relación a la producción de ATP. La eficiencia bioenergética mitocondrial se define como el ATP producido en las mitocondrias por molécula de nutriente mientras que la capacidad de síntesis de ATP mitocondrial es la velocidad a la que se produce ATP por unidad de tiempo. Como adaptación al exceso de nutrientes, el organismo activa mecanismos para usar los nutrientes primero de almacenamiento y posteriormente de “desecho”, lo que da lugar a la generación de calor. Esta adaptación bioenergética implica la remodelación de la arquitectura mitocondrial, lo que significa que la función mitocondrial es dependiente también de su estructura.

El ciclo de vida mitocondrial representa cambios continuos en la morfología mitocondrial a través de eventos de fusión y fisión, al igual que de los procesos de biogénesis. Estas breves transiciones entre mitocondrias conectadas y separadas permiten la reorganización de los componentes mitocondriales y la eliminación del material dañado, manteniendo así una población mitocondrial sana.

1.3.2.1 Biogénesis mitocondrial

La **biogénesis mitocondrial** se define como el proceso por el cual las células, generalmente sanas, aumentan su número y masa de mitocondrias, e implica la transcripción coordinada de determinados genes codificados en el núcleo y en la mitocondria.

Los marcadores de biogénesis mitocondrial más relevantes son las copias de ADN mitocondrial (mtADN), un ratio elevado mtADN:nADN (nuclear) y el nivel de expresión de genes mitocondriales (Popov, 2020).

Un regulador clave de la respuesta transcripcional termogénica es la proteína PGC-1 α , siendo el eje central de la biogénesis mitocondrial (**Figura 1.14**). En los adipocitos marrones, la expresión de esta proteína está regulada por la exposición al frío, aunque existen otros agentes como el resveratrol o algunos flavonoides que también la promueven (Popov, 2020). PGC-1 α es fosforilada y activada por la proteína quinasa activada por mitógenos p38 (p38/MAPK) en respuesta a la señalización β -adrenérgica o a la vía de señalización AMPc-PKA (proteína quinasa A)-p38/MAPK (Cao *et al.*, 2004). Además, una vez activada PGC-1 α , coactiva varios factores de transcripción como los factores nucleares de respiración (NRF1/2) que

favorecerán la expresión del factor de transcripción mitocondrial A (TFAM) y otras proteínas mitocondriales involucradas en la termogénesis como UCP-1 (Cardanho-Ramos & Morais, 2021). La activación de la vía de señalización PGC-1 α también está mediada por el factor de transcripción de unión a elementos de respuesta a AMPc (CREB), que se une a determinadas secuencias de ADN, generalmente a los elementos de respuesta a AMPc, y posteriormente regula la transcripción de genes (Popov, 2020).

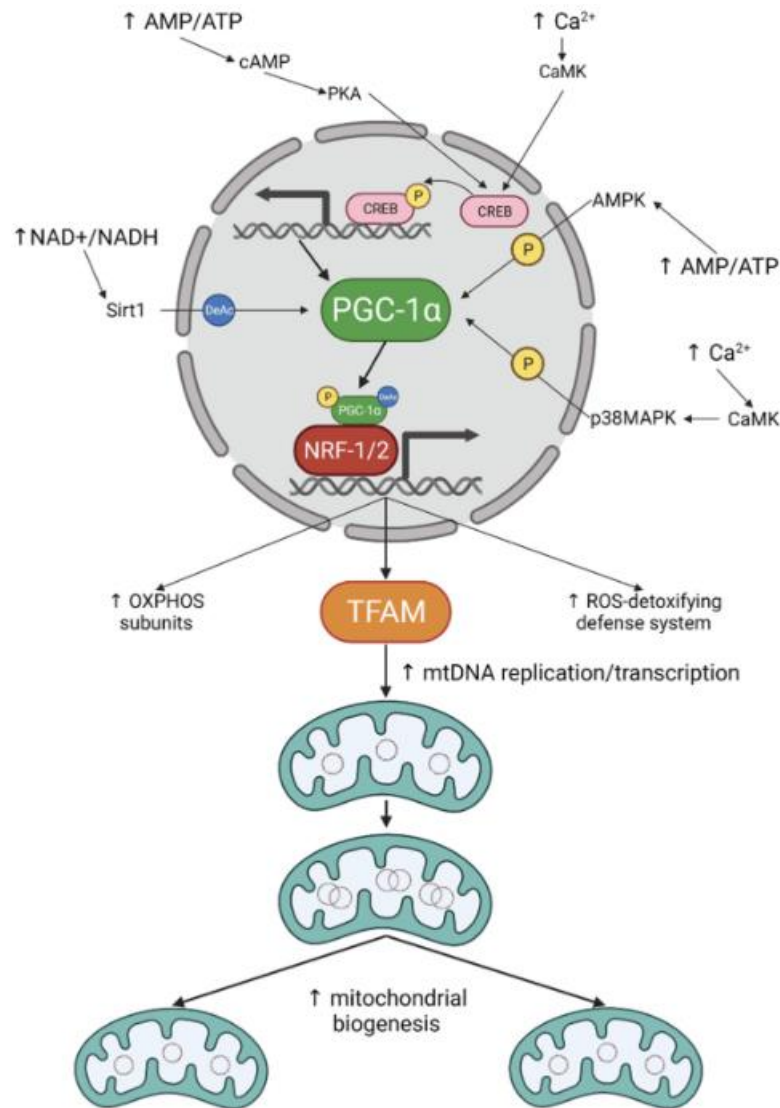


Figura 1.14 Cascadas de señalización implicadas en la biogénesis mitocondrial. Los niveles elevados de Ca²⁺ y AMPc activan diferentes quinazas que pueden fosforilar CREB para promover la expresión de PGC-1 α o fosforilar directamente PGC-1 α , conduciendo a su activación. Una vez activada, PGC-1 α se une a NRF1/2 para promover la expresión de varias proteínas mitocondriales, incluida TFAM, lo que en última instancia resulta en una mayor biogénesis mitocondrial. Adaptado de Cardanho-Ramos & Morais, 2021.

1.3.2.2 Dinámica mitocondrial

La heterogeneidad de las mitocondrias se conoce desde las primeras descripciones de estos orgánulos a mediados del siglo XIX aunque se consideraban estáticos y aislados. No fue hasta finales del siglo XX cuando se consiguió la primera fotografía de la arquitectura de una mitocondria aislada, gracias a las tinciones fluorescentes por marcadores específicos o marcaje proteico (Liesa, Palacín & Zorzano, 2009).

Actualmente, no cabe duda de que las mitocondrias forman una red compleja, interconectada y muy dinámica dentro de las células. Esta plasticidad dinámica se refiere a cambios en la forma del orgánulo y al movimiento de estos a lo largo del citoesqueleto. El conjunto de ambos procesos se denomina **dinámica mitocondrial**, y está fuertemente regulada por los eventos de fusión y fisión mitocondrial que ocurren secuencialmente en un ciclo repetitivo (Figura 1.15). La dinámica mitocondrial no sólo varía la morfología de la mitocondria, sino que también está implicada en múltiples funciones como la estabilidad del mtADN, la capacidad respiratoria, la apoptosis y la respuesta al estrés celular. Estos diversos efectos sugieren que este proceso desempeña un papel central en el control de calidad de las mitocondrias.

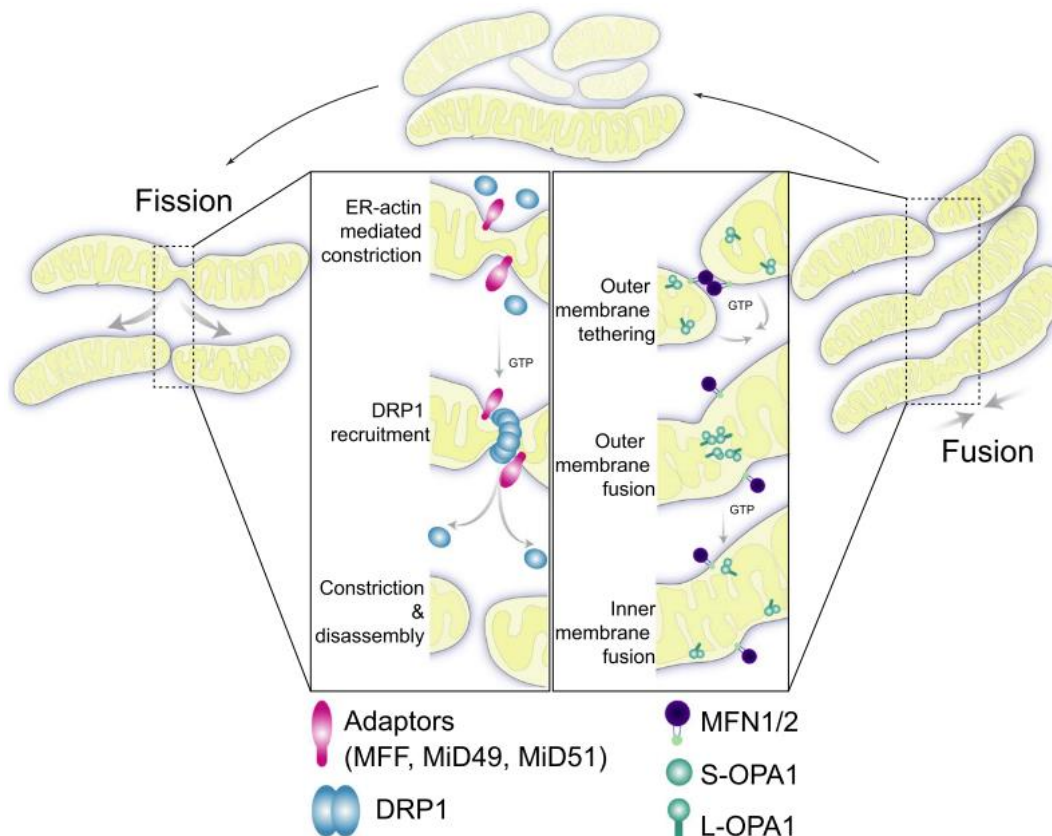


Figura 1.15 Esquema general de los procesos de fusión y fisión mitocondrial. Durante la fisión, DRP-1 se recluta en sitios de constricción con la ayuda de adaptadores de membrana. Allí se polimeriza alrededor de la membrana mitocondrial externa y utiliza hidrólisis de GTP para contraer la mitocondria y provocar su escisión. Por otro lado, en la fusión, las mitofusinas (MFN-1/2) se unen

a las mitocondrias adyacentes por su membrana mitocondrial externa. Después de esto, OPA-1 actúa de manera similar para inducir la fusión de la membrana interna, generando así una única mitocondria. También, es necesaria la hidrólisis de GTP para la fusión. Adaptado de Yapa *et al.*, 2021.

1.3.2.2.1 Fusión

Dos mitocondrias adyacentes pueden unirse formando un único orgánulo elongado por la acción de varias proteínas de fusión. La fusión mitocondrial está regulada en mamíferos por 3 GTPasas: Mitofusinas 1 (MFN-1) y 2 (MFN-2), proteínas transmembrana localizadas en la membrana mitocondrial externa; y el gen de la atrofia óptica 1 (OPA-1), ubicada en la membrana interna y en el espacio intermembrana (Chan, 2012). MFN-2 también se puede encontrar en el retículo endoplasmático y en MAMs (de Brito & Scorrano, 2008; Naon *et al.*, 2016).

Este proceso se divide en dos partes: (1) la fusión de la membrana externa de la mitocondria, y (2) la fusión de la membrana interna de la mitocondria (**Figura 1.15**).

Primero, las mitofusinas forman complejos de homo-oligómeros o hetero-oligómeros que promueven la fusión de la membrana externa, donde es necesaria la hidrólisis de GTP y la cual está mediada por una región de repetición heptada en la región C-terminal (Koshiba *et al.*, 2004). Además, se ha propuesto que estas proteínas pueden adoptar conformaciones permisivas o estrictas para la fusión dependiendo de las interacciones de unión intramoleculares que se estén produciendo (Franco *et al.*, 2016).

Posteriormente, OPA-1 procede a la fusión de la membrana interna. OPA-1 está unida a la membrana interna mitocondrial por un dominio transmembrana N-terminal, con la mayor parte expuesta al espacio intermembrana. Esta proteína se somete a un procesamiento proteolítico parcial antes de ser competente, dando lugar a una forma transmembrana larga (L-OPA-1) y otra corta y soluble (S-OPA-1). Esta regulación post-transcripcional y post-traducciona produce ocho variantes alternativas en humanos y cuatro en ratones, que también están mediadas por escisión proteolítica (Ishihara *et al.*, 2006). Este splicing alternativo de OPA-1 genera varias formas L-OPA-1, que son escindidas en diferentes S-OPA-1 por proteasas mitocondriales específicas: la metaloproteasa de zinc OMA-1 y la metaloproteasa de zinc dependiente de ATP YME-1L (Anand *et al.*, 2014). Además, OPA-1 regula la forma de las crestas mitocondriales (Gao & Hu, 2021). Por último, tanto la inducción de la apoptosis como la disipación específica del potencial de membrana mitocondrial inducen la escisión de OPA-1 a isoformas cortas y provocan la degradación de las isoformas largas, lo que promueve la fragmentación mitocondrial o fisión (Duvezin-Caubet *et al.*, 2006).

En general, la acción coordinada de las mitofusinas y las isoformas largas de OPA-1 conduce a la elongación de la red mitocondrial.

1.3.2.2.2 Fisión

Una mitocondria puede escindirse en dos más pequeñas, generando una mitocondria con un potencial de membrana alto y otra con un potencial bajo. Esta última puede recuperar su potencial de membrana y fusionarse con otra mitocondria, o permanecer despolarizada, tras lo cual será eliminada por mitofagia, proceso de eliminación que se explicará en el **apartado 1.3.2.3**.

El mediador principal de la fisión mitocondrial es la proteína relacionada con la dinamina 1 (DRP-1), una GTPasa que se recluta en la membrana mitocondrial externa desde el citosol uniéndose a las proteínas adaptadoras que formarán estructuras punteadas situadas en los lugares de escisión. Estas proteínas adaptadoras son la proteína homóloga a la fisión 1 (FIS-1), el factor de fisión mitocondrial (MFF), y las proteínas dinámicas mitocondriales de 49 y 51 kDa (MiD49/MiD51) (Yapa *et al.*, 2021).

Tras su reclutamiento en la membrana mitocondrial externa por sus adaptadores, DRP-1 se autopolimeriza alrededor de ella gracias a la hidrólisis de GTP, consiguiendo constreñir el orgánulo. Una vez rodeada la mitocondria, DRP-1 efectúa la constricción y la posterior ruptura de la membrana mitocondrial externa (**Figura 1.15**).

Cabe destacar que la fisión mitocondrial puede ser regulada por numerosos factores como el retículo endoplásmico (Friedman *et al.*, 2011), los lisosomas (Wong, Ysselstein & Krainc, 2018) o el aparato de Golgi (Nagashima *et al.*, 2020). Además, la actividad de DRP-1 está modulada por modificaciones post-traduccionales como la fosforilación, que generalmente induce su reclutamiento en la membrana, así como la sumoilación.

Tanto la exposición al frío como la estimulación adrenérgica en los adipocitos marrones se traducen en una rápida fragmentación mitocondrial que precede a la despolarización asociada a la producción de calor (Wikstrom *et al.*, 2014). Esto implica la fosforilación dependiente de PKA de la proteína de fisión DRP1 en el residuo específico serina-600 (Ser600).

Por otro lado, cuando se fuerza un estado fisionado de las mitocondrias inhibiendo la maquinaria de fusión, existe un aumento en la susceptibilidad al desacoplamiento inducido por ácidos grasos. Esta reorganización mitocondrial y la liberación de ácidos grasos libres actúan en sinergia para facilitar el desacoplamiento y, por tanto, la producción de calor. En el tejido adiposo marrón esto puede representar un mecanismo de seguridad para evitar la pérdida de nutrientes (Wikstrom *et al.*, 2014).

1.3.2.3 Mecanismo de control de calidad mitocondrial: Mitofagia

Como se ha mencionado previamente, el mantenimiento de una población sana de mitocondrias está regulado por la acción de dos fuerzas contrapuestas, por un lado, la biogénesis mitocondrial y, por otro, la eliminación eficiente de las mitocondrias dañadas.

La fusión y fisión mitocondrial no son suficientes para equilibrar las propiedades bioenergéticas de la población sana de mitocondrias, pero sí están conectadas con el mecanismo de degradación de mitocondrias disfuncionales. Cuando el número de mitocondrias es excesivo, o están envejecidas, o se vuelven defectuosas, se activa el proceso de eliminación de estos orgánulos principalmente a través de la *autofagia*. Este proceso puede ser aleatorio o selectivo, se denomina **mitofagia** en el segundo caso. La degradación mitocondrial puede formar parte de un programa de autofagia generalizado activado por el estado metabólico de la célula o puede darse por la mitofagia, proceso que sólo elimina mitocondrias dañadas completas manteniendo así una población sana de estos orgánulos.

Además de la mitofagia, existen dos tipos de mecanismos de calidad mitocondrial (**Figura 1.16**):

- ❖ Estos orgánulos poseen su propio sistema proteolítico formado por 2 complejos de proteasas de tipo AAA que se encargan de la eliminación de proteínas mal plegadas pertenecientes a la membrana interna mitocondrial (Langer *et al.*, 2001).
- ❖ Existe una vía lisosomal en la que las vesículas surgen de los túbulos mitocondriales secuestrando diferentes y determinadas regiones mitocondriales para posteriormente dirigirlos hacia el interior del lisosoma para su degradación (Soubannier *et al.*, 2012).

El eje del mecanismo de control de calidad de las mitocondrias se centra en el evento de fisión puesto que genera dos mitocondrias bioenergéticamente diferentes: una con un potencial de membrana mayor y otra, más bajo. La mitocondria hija con un potencial de membrana más bajo tiene dos opciones: (1) recuperar su potencial de membrana y recuperar la capacidad de reconectarse con la red o (2) permanecer despolarizada. Si el potencial de membrana no se restablece durante este último periodo, OPA-1 se degradará. Así, estas mitocondrias dañadas no podrán volver a conectarse con la red al no poder fusionarse con ninguna otra mitocondria y serán degradadas por mitofagia (Twig *et al.*, 2008).

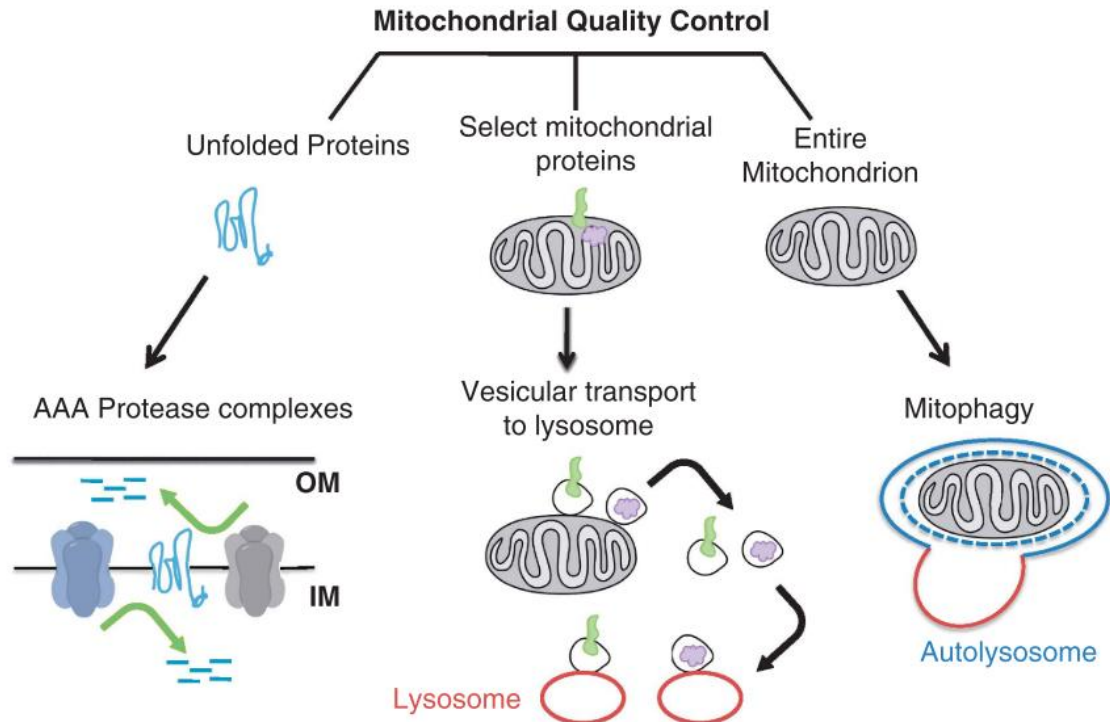


Figura 1.16 Vías principales de control de calidad mitocondrial. Las proteínas de la membrana mitocondrial mal plegadas pueden degradarse mediante dos complejos de proteasa AAA. Además, las proteínas mitocondriales también pueden degradarse transfiriéndolas a lisosomas a través de vesículas que brotan de los túbulos mitocondriales. La tercera vía, conocida como mitofagia, implica la envoltura de una mitocondria dañada completa dentro de una vesícula de doble membrana llamada autofagosoma, que se fusionará con un lisosoma degradando su interior. Adaptado de Ashrafi & Schwarz, 2013.

La principal vía de señalización que regula la mitofagia es *PINK-1/Parkina* (Eiyama & Okamoto, 2015) (**Figura 1.17**). PINK-1 es una proteína que contiene una secuencia N-terminal de direccionamiento mitocondrial (MTS, *mitochondrial targeting sequence*), un segmento transmembrana y un dominio serina/treonina quinasa que le da su función. Por otro lado, Parkina es una E3-ubiquitin ligasa capaz de formar un intermediario con la ubiquitina a través de un enlace en el centro activo de la cisteína para transferir posteriormente dicha ubiquitina al sustrato.

En mitocondrias sanas, el nivel de expresión de PINK-1 es bajo pese a tener una localización ubicua. Esta quinasa se transloca parcialmente entre ambas membranas mitocondriales a través de la translocasa de membrana externa (TOM) exponiendo así su región MTS que provocará su activación dependiendo del potencial de membrana. Al no haber cambios en el potencial, PINK-1 es eliminada por la acción de varias peptidasas y proteasas, y del sistema del proteasoma. Como resultado, Parkina se mantiene inactiva en el citosol.

Cuando el potencial de membrana baja, PINK-1 interactúa con TOM formando un complejo hetero-oligomérico donde dos moléculas de PINK-1 se dimerizan y se fosforilan mutuamente para volverse altamente activas. Posteriormente, PINK-1 fosforila Parkina y ubiquitina. La fosforilación de Parkina implica un cambio

conformacional de cerrado a abierto en la proteína y promueve su unión a la ubiquitina fosforilada, volviéndose totalmente activa. Esta Parkina unida a ubiquitina puede asociarse transitoriamente a las mitocondrias e interactuar con proteínas sustrato como las mitofusinas (Poole *et al.*, 2010). A su vez, las cadenas de ubiquitina generadas por Parkina son fosforiladas por PINK-1 para mayor estabilidad del marcaje y la eliminación de la mitocondria dañada.

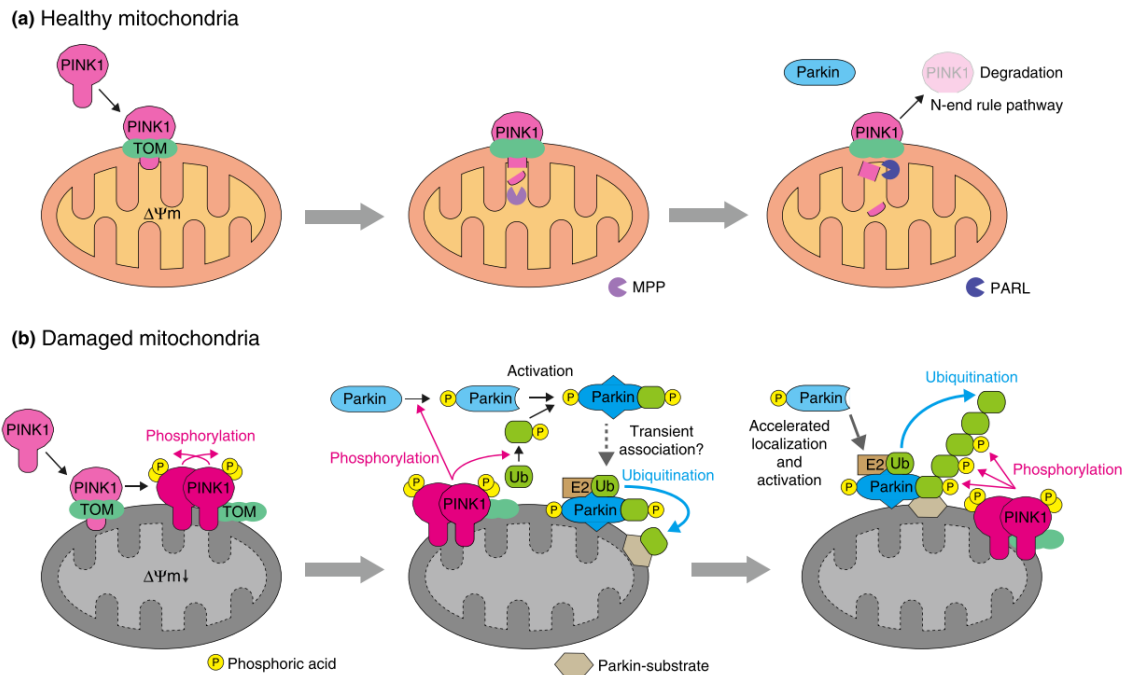


Figura 1.17 Mitofagia mediada por PINK-1/Parkina. (A) PINK-1 se degrada en una mitocondria sana puesto que no existe ningún cambio de potencial de membrana. **(B)** Activación de la vía tras la disminución del potencial de membrana que indica un daño en esa mitocondria. PINK-1 se dimeriza y activa autofosforilándose, lo que favorecerá el reclutamiento y activación de Parkina en la membrana, que ubiquitinizará la mitocondria dañada como forma de marcaje para la siguiente etapa en la cual será degradada. Adaptado de Eiyama & Okamoto, 2015.

Finalmente, al ser la mitofagia una autofagia específica de mitocondrias, comienza la interacción con el eje de la maquinaria autofágica (**Figura 1.18**). La proteína adaptadora p62/SQSTM1 o de unión a ubiquitina se acumula en las mitocondrias despolarizadas permitiendo su interacción con las mitocondrias marcadas por el sistema PINK-1/Parkina. Esta proteína funcionará como anclaje entre la mitocondria y el autofagosoma naciente a través de su unión con la forma lipidada de LC3B (Ashrafi & Schwarz, 2013). El autofagosoma se define como un compartimento de doble membrana lipídica que engloba determinada carga para después eliminarla al fusionarse con el lisosoma. No obstante, otras proteínas como la optineurina (OPTN) o NDP52 pueden actuar como adaptadores autofágicos. Como resultado, la mitocondria dañada situada en el interior del autofagosoma, estructura denominada mitofagosoma, se unirá al lisosoma para que sea degradado.

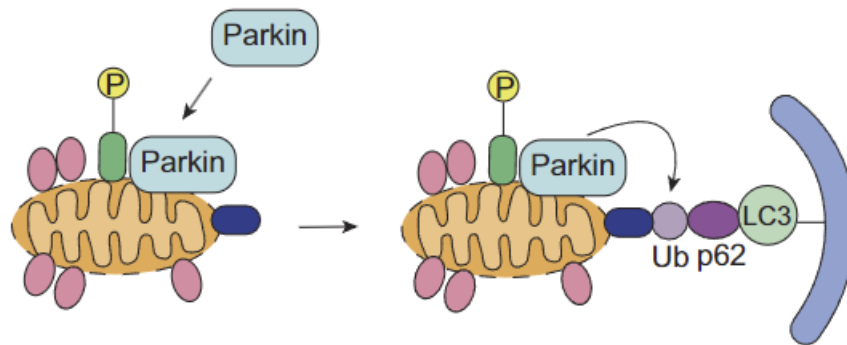


Figura 1.18 Mecanismo de degradación común entre la mitofagia y autofagia. Una vez marcada la mitocondria, las ubiquitininas fosforiladas por Parkina interaccionan con el adaptor autofágico p62, que a su vez se unirá a la forma lipidada de LC3B anclada en la membrana de lo que será el autofagosoma cuando rodee la mitocondria dañada. El mitofagosoma formado se fusionará con un lisosoma para su degradación. Adaptado de Moyzis, Sadoshima & Gustafsson, 2018.

Además de este mecanismo, se ha descrito una vía mitofágica independiente de PINK-1/Parkin mediada por los receptores mitocondriales relacionados con BCL-2: la proteína 3 de interacción con Bcl2 y proteínas de adenovirus E1B de 19kDa (BNIP3) y la proteína X de tipo Nip-3 (NIX), conocidas por promover la activación de la muerte celular (Moyzis, Sadoshima & Gustafsson, 2018). Tanto BNIP3 como NIX se localizan en la membrana mitocondrial externa, donde actúan como receptores directos de LC3B anclado a los autofagosomas, y suelen activarse en situaciones de hipoxia por acción de HIF-1 α (Zhang *et al.*, 2008).

Pese a que las vías BNIP3/NIX y PINK1/Parkin desempeñan funciones parecidas en la mitofagia, las señales que activan ambas vías parecen ser diferentes. Mientras que la mitofagia mediada por Parkin requiere la pérdida del potencial de membrana mitocondrial, BNIP3 promueve la mitofagia incluso cuando las mitocondrias conservan su potencial de membrana (Rikka *et al.*, 2011). Aunque los últimos estudios parecen indicar una posible coordinación entre BNIP3/NIX y las vías PINK1/Parkin para mantener una población sana de mitocondrias, es necesario investigar el papel y la regulación de esta posible interacción.

La mitofagia puede activarse por diferentes estímulos que conllevan estrés celular.

Ante una situación de estrés energético, la activación de AMPK provoca la fosforilación de ULK-1 y ULK-2, proteínas quinasas de mamíferos ortólogas del gen de la autofagia ATG1. La forma activa de estas proteínas promueve la autofagia, incluida la degradación de mitocondrias. La AMPK también inhibe la vía mTORC1, promotora del crecimiento, que normalmente inhibe la función de ULK (Egan *et al.*, 2011). Estos mecanismos interrelacionados vinculan el estado nutricional de la célula con la mitofagia.

Otro estímulo interesante para el mantenimiento de la población sana de mitocondrias en el tejido adiposo marrón es el frío (Lu *et al.*, 2018). Durante esta situación en la que el tejido tiene que adaptarse y predomina el desacoplamiento de la respiración mitocondrial, la mitofagia se ve favorecida al igual que la

biogénesis mitocondrial para renovar las mitocondrias dañadas y conseguir un equilibrio entre ambos procesos.

1.3.3 Modulación del balance mitocondrial por disponibilidad de nutrientes y su relación con el estado energético

Como se ha explicado previamente, el tejido adiposo marrón es el tejido termogénico por excelencia debido a su alto número de mitocondrias. Esto supone un gran interés en el papel de los mecanismos de calidad mitocondrial, tanto la dinámica mitocondrial como la biogénesis y mitofagia, durante la termogénesis adaptativa. Este ciclo mitocondrial está regulado por la disponibilidad energética, donde los nutrientes disponibles modulan la eficiencia bioenergética de los adipocitos marrones. Por ello, es importante conocer la situación mitocondrial para saber el estado energético de la célula (**Figura 1.19**). Así, un acúmulo de mitocondrias dañadas derivará en una disfunción del tejido mientras que el mantenimiento de la población mitocondrial sana conllevará una adaptación bioenergética favorable frente a diferentes situaciones nutricionales.

De ese modo, el exceso de nutrientes, como sucede en la obesidad, conduce a la inhibición de la fusión mitocondrial, dando lugar a la escisión de estos orgánulos y a un ciclo incompleto de fusión, fisión y autofagia, lo que aumenta la heterogeneidad mitocondrial subcelular (Wikstrom *et al.*, 2007). En esta situación en la que la mitofagia se ve afectada, cabría esperar que la masa mitocondrial disminuyera puesto que la población estaría compuesta mayoritariamente por mitocondrias pequeñas y despolarizadas, por lo que el mantenimiento de la salud mitocondrial sólo requeriría la estimulación de la biogénesis mitocondrial. Sin embargo, el exceso de nutrientes puede perjudicar el flujo autofágico al inhibir los lisosomas, necesarios en la última etapa de degradación selectiva (Las *et al.*, 2011). Como consecuencia, y particularmente cuando la alimentación es alta en grasas, el estado fisionado de las mitocondrias y las elevadas tasas respiratorias pueden provocar daños en los mecanismos que afectan a la maquinaria autofágica. Esto provocaría una acumulación de mitocondrias disfuncionales y un aumento de la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), lo que puede afectar incluso a la síntesis de nuevas mitocondrias.

Por el lado contrario, el ayuno o el ambiente reducido en nutrientes conlleva un cambio de la dinámica que homogeneizará la población mitocondrial, impidiendo la fragmentación y, de esta manera, la formación del *pool* preautofágico y la eliminación de los componentes dañados por mitofagia. La forma elongada de las mitocondrias que se ve favorecida en el ayuno aumenta la producción de ATP. En este estado, las mitocondrias se mantienen protegidas de la autofagia inducida por la deprivación y aumentan el número de crestas, lo que favorece la dimerización de ATP sintasa que conducirá a una mayor actividad de esta (Liesa & Shirihai, 2013).

En este contexto, es probable que la restricción calórica, o los ciclos adecuados de alimentación/ayuno, promueva una adaptación bioenergética y un cambio en la

dinámica mitocondrial que permitan que los mecanismos de control de calidad mitocondrial sean más eficientes (Liesa & Shirihai, 2013).

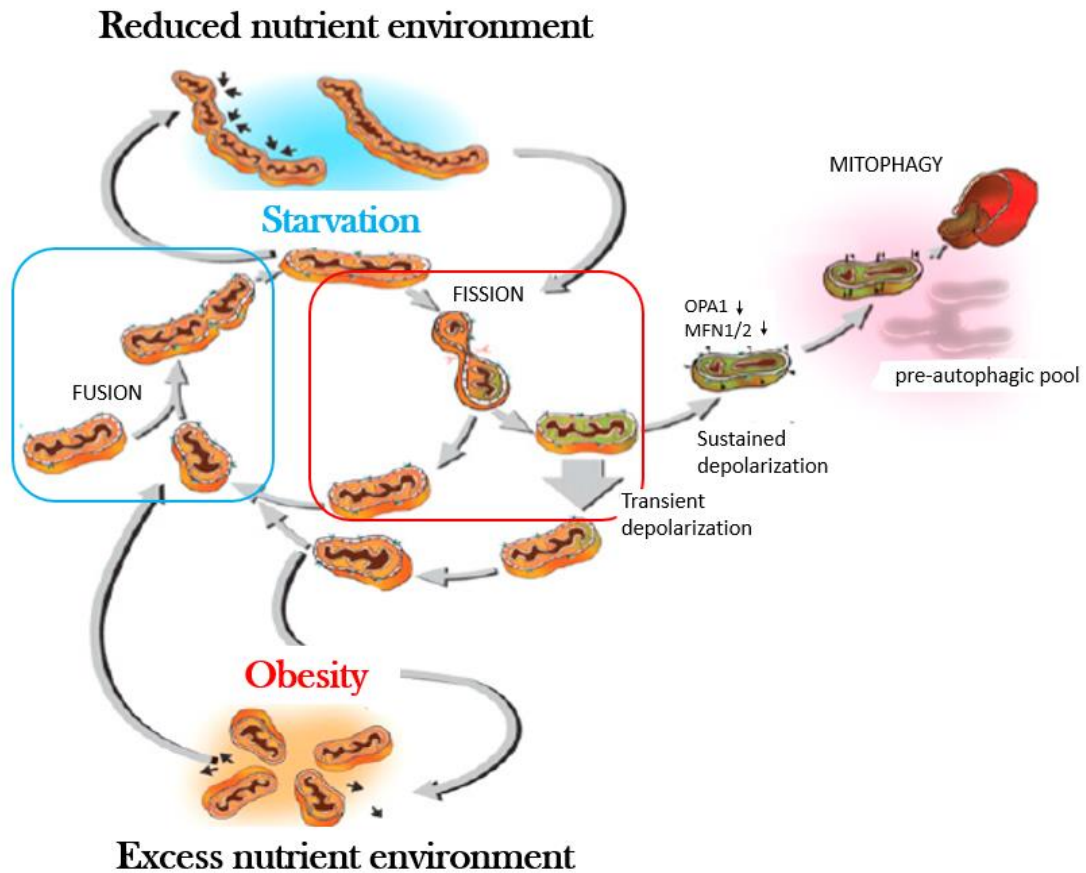


Figura 1.19 Estado energético de las mitocondrias dependiendo de la disponibilidad de nutrientes. La plasticidad mitocondrial mejora la adaptación energética frente a diferentes situaciones nutricionales. En un ambiente rico en nutrientes, la fisión se ve favorecida lo que producirá más daño mitocondrial, mientras que en un estado de ayuno será la forma elongada de las mitocondrias la que se ve beneficiada, lo que producirá mayor cantidad de ATP. Adaptado de Liesa & Shirihai, 2013.

Estas alteraciones pueden explicar la disfunción mitocondrial en patologías asociadas a un desequilibrio en la disponibilidad de nutrientes.

1.4 EL TEJIDO ADIPOSO MARRÓN COMO TERAPIA CONTRA LA OBESIDAD

Durante los últimos años, los estudios donde se plantea la estimulación de la generación de calor por parte del tejido adiposo marrón como una terapia frente a la obesidad eficaz son cada vez más numerosos. La obesidad ocurre cuando aparece un desequilibrio entre la energía asimilada y el gasto energético, y puede ser reducida modificando un lado de la ecuación del balance energético.


Como se ha mencionado previamente, la actividad del tejido adiposo marrón está inversamente relacionada con el IMC y la edad, siendo menor en $IMC > 30 \text{ kg/m}^2$ y en personas de avanzada edad. Además, el incremento de la captación de glucosa por la grasa parda en pacientes con obesidad tras una prolongada exposición al frío podría mejorar la homeostasis glucídica y prevenir la resistencia a la insulina.

La prueba de que los aumentos en la tasa metabólica pueden mejorar la obesidad en humanos derivan del ensayo clínico con el compuesto desacoplante dinitrofenol (DNP) en la era de los años 1930 (Tainter, Cutting & Stockton, 1934). El DNP provoca un desacoplamiento de la síntesis de ATP en la respiración mitocondrial al facilitar la fuga de H^+ a través de las membranas internas mitocondriales. A pesar de que los pacientes perdían peso y sentían calor, también padecían problemas cardíacos y cataratas, e incluso varios pacientes murieron debido a la ingestión de dicha molécula.

Los primeros fármacos utilizados en la activación del tejido adiposo marrón fueron los agonistas de los receptores β_3 -adrenérgicos. El principal inconveniente de estos fármacos es que pueden ocasionar efectos adversos a nivel cardiovascular (Yen & Ewald, 2012). Se ha demostrado que la administración oral de un agonista selectivo de los receptores β_3 -adrenérgicos, llamado Mirabegron, estimula la captación de glucosa en los depósitos de tejido adiposo marrón y eleva la tasa metabólica basal cuando se administra a humanos adultos sanos (Cypess AM *et al.*, 2015). No obstante, en pacientes con obesidad, estos tipos de agonistas poseen una mínima eficacia debido a un defecto en la señalización de estos receptores y/o al desarrollo de resistencia a estos agonistas en el tejido adiposo.

Gracias a estas investigaciones, en los últimos años se han estudiado diferentes moléculas y técnicas para la activación del tejido adiposo marrón en la mejora de la obesidad: compuestos de origen vegetal como el resveratrol o la capsaicina, suplementos alimenticios, variaciones en las dietas como la restricción de aminoácidos, cambios en la microbiota, trasplantes de tejido adiposo marrón, así como el uso de adipoquinas circulantes como FGF-21, BMPs o la irisina ya que pueden promover el *browning* del tejido adiposo blanco.

Actualmente, no existen tratamientos médicos eficaces contra la obesidad que mantengan la pérdida de peso por un periodo prolongado de tiempo, por lo que, si se demuestra la eficacia de la activación del tejido adiposo marrón en humanos



para una fracción significativa de pacientes con esta patología, podría representar un gran avance farmacéutico.

Por todo esto, es de vital importancia profundizar en el estudio de la obesidad, así como en la generación de nuevas terapias con diferentes dianas farmacológicas que consigan mantener la pérdida de peso a largo plazo.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

“El objetivo de la ciencia es descubrir e iluminar la verdad.”

Rachel Carson

Bióloga marina

2.1 HIPÓTESIS

La *obesidad* es un problema sanitario que tiene carácter pandémico y con complicaciones tales como el síndrome metabólico y la diabetes, además de otras enfermedades como el hígado graso no alcohólico, cáncer o trastornos mentales (OMS, 2022). Como se ha descrito previamente, el tejido adiposo marrón es protagonista en la regulación de la adiposidad y el peso corporal a través de la termogénesis sin tiriteo (TST) o termogénesis adaptativa (Cannon & Nedergaard, 2004). Su papel en el adulto fue desconsiderado durante varios años a pesar de haberse descrito en las primeras etapas de la infancia creyéndose que este tejido desaparecía con la edad. No obstante, gracias a la irrupción de los estudios PET-CT, se ha demostrado que este tejido está presente y es funcional en los adultos humanos (Nedergaard, Bengtsson & Cannon, 2007). Además, en los últimos años se ha establecido una correlación inversa entre el IMC y la presencia de depósitos de grasa marrón (Cypess *et al.*, 2009). Por ello, la activación del gasto energético a través del tejido adiposo marrón se ha convertido en objetivo de estudio para la búsqueda de nuevas terapias contra la obesidad.

Por otro lado, se ha descrito que la mitocondria juega un papel central en la bioenergética de las células eucarióticas, siendo clave en la **termogénesis adaptativa** (Spiegelman & Flier, 2001). Tradicionalmente, la termogénesis del tejido adiposo marrón se ha basado en la expresión de la **proteína desacoplante UCP-1** en la cadena respiratoria mitocondrial puesto que actúa sobre el gradiente protón-motriz implicado en la generación de energía (Golozoubova *et al.*, 2001). Debido a la presencia de UCP-1, este gradiente se verá afectado ya que los protones no circularán a través de la ATP-sintasa sino que pasarán a través del canal generado por UCP-1 produciendo la disipación de calor durante el proceso (Sakers *et al.*, 2022). Sin embargo, actualmente se conoce que la **dinámica mitocondrial**, descrita como el equilibrio dinámico entre varios procesos implicados en la plasticidad mitocondrial, participa activamente en la amplificación del gasto energético. Durante la adaptación a situaciones de restricción calórica, la fusión mitocondrial (unión entre dos mitocondrias) se ve favorecida; mientras que el exceso de nutrientes promueve la fisión (escisión de una mitocondria en dos) (Liesa & Shirihai, 2013).

Es necesaria una población mitocondrial sana para mantener las propiedades bioenergéticas del tejido adiposo marrón. Debido a que la dinámica mitocondrial no es suficiente para esta misión, otros dos procesos se ven implicados en la regulación de la función mitocondrial: **biogénesis**, generación de nuevas mitocondrias (Popov, 2020), y **mitofagia**, degradación de mitocondrias dañadas, envejecidas o defectuosas (Eiyama & Okamoto, 2015).

No obstante, la contribución tanto de la dinámica mitocondrial como de los mecanismos de control de la integridad mitocondrial, durante la termogénesis adaptativa dirigida por el tejido adiposo marrón, es casi desconocida.

Por ello, la hipótesis con la que se ha trabajado durante esta tesis doctoral ha sido:

“La dinámica mitocondrial, además de desempeñar su función sobre la plasticidad de las mitocondrias, contribuye en la termogénesis adaptativa de ratones mediante la generación de calor durante el proceso de fisión mitocondrial, con el consiguiente aumento del gasto energético tisular.”

2.2 OBJETIVOS

Por tanto, y teniendo en consideración esta hipótesis, se concretó como **objetivo general** de esta tesis doctoral *comprender el papel de la inhibición de la fusión mitocondrial sobre la termogénesis de la grasa parda inducida por frío y su impacto en las células residentes en la grasa blanca.*

Para conseguir dicho objetivo, se especificaron varios:

OBJETIVO 1: Valoración del efecto de la dinámica mitocondrial y mitofagia en la capacidad termogénica de ratones carentes del receptor de IGF-1 en el tejido adiposo marrón.

Para llevar a cabo este objetivo, se utilizó un modelo animal de ratón carente del receptor de IGF-1R (IGF-1R) específicamente en el tejido adiposo marrón (BAT) denominado modelo BATIGF1RKO y previamente generado en nuestro laboratorio. La delección de IGF-1R resultó en una leve disfunción termogénica durante la primera mitad de la exposición al frío en este modelo murino, destacando así la importancia fundamental de este receptor en la preservación de la capacidad termogénica (Viana-Huete et al., 2016). Este modelo animal fue seleccionado para investigar posibles mecanismos compensatorios activados específicamente en el tejido adiposo marrón como respuesta a la carencia de este receptor, por lo que se usó para:

- Caracterizar parámetros glucémicos y adiposidad, así como el peso corporal.
- Evaluar el papel de la dinámica mitocondrial en situación basal y tras la exposición al frío, así como la activación del mecanismo termogénico, la biogénesis mitocondrial y la mitofagia.
- Analizar la respiración mitocondrial durante la termogénesis adaptativa y en qué grado es dependiente de la acción de UCP-1.
- Profundizar en la plasticidad mitocondrial valorando la estructura y el estado mitocondrial.
- Estudiar el mecanismo de control mitocondrial mitofagia en la termogénesis adaptativa tras la administración de cloroquina.
- Determinar el proceso de *browning* en este modelo animal tras la activación de la termogénesis adaptativa.

OBJETIVO 2: Estudio de la contribución de la fusión mitocondrial en la termogénesis adaptativa.

Para la consecución de este objetivo, se desarrollaron dos nuevos modelos animales de ratón: uno carente de la proteína de fusión mitocondrial interna OPA-1 específicamente en el tejido adiposo marrón (BAT) y que se denominó modelo BATOPA1KO; y otro carente de la de fusión mitocondrial externa MFN-1 específicamente en el tejido adiposo marrón (BAT) y que se denominó modelo BATMFN1KO. Estos modelo se emplearon para:

- Estudiar si la inhibición de la fusión mitocondrial incrementa los procesos de fisión mitocondrial dando como resultado una amplificación de la capacidad termogénica en ratones.
- Analizar la activación de mecanismos compensatorios por células residentes del tejido adiposo blanco que han sufrido un proceso de *browning* (células *beige*).

OBJETIVO 3: Evaluación de diferentes compuestos desacoplantes mitocondriales (FCCP y DNP) como nuevos activadores sugeridos de UCP-1.

Para alcanzar este objetivo, se utilizó el modelo genérico UCP-1 KO previamente generado en el laboratorio de los profesores Jan Nedergaard y Barbara Cannon del Instituto Wenner-Gren (Estocolmo, Suecia). Este modelo se utilizó para:

- Buscar nuevos activadores del mecanismo termogénico mediante UCP-1 que previamente fueron descritos como desacoplantes de la cadena respiratoria mitocondrial.
- Valorar en qué grado dependen de la acción de UCP-1 y cómo afectan a la respiración máxima mitocondrial.
- Estudiar el efecto del desacoplamiento mitocondrial en el potencial de membrana.
- Analizar la acción de la metil- β -ciclodextrina (M β CD) en la respiración mitocondrial.

MATERIALES Y MÉTODOS

***“Hay una gran desconexión
entre lo que se ha demostrado científicamente
y lo que la gran mayoría de la gente cree.”***

Lynn Margulis

Bióloga evolutiva

3.1 EXPERIMENTACIÓN CON ANIMALES

3.1.1 Trabajo con modelos animales

Para el desarrollo de esta tesis se emplearon diferentes modelos murinos (*Mus musculus*), todos ellos con un *background* genético mixto 129/Sv y C57BL/6J. En primer lugar, se utilizó un modelo de ratón carente del IGF-1R específicamente en el tejido adiposo marrón (BAT) al que se denominó **modelo BATIGF1RKO**, y que fue previamente generado en el laboratorio (Viana-Huete *et al.*, 2016). A continuación, gracias a la colaboración del Prof. Dr. Antonio Zorzano del IRB de Barcelona, se generaron dos modelos murinos carentes de diferentes proteínas de fusión específicamente en el tejido adiposo marrón (BAT): la proteína de fusión interna OPA-1, denominado **modelo BATOPA1KO**; y la proteína de fusión externa MFN-1, denominado **modelo BATMFN1KO**.

En los tres casos, la generación de dichos animales tuvo lugar utilizando la tecnología Cre-recombinasa derivado del bacteriófago P1. Este sistema permite la escisión de regiones del genoma flanqueadas por secuencias LoxP gracias a la acción de la Cre-recombinasa, enzima que puede ser expresada bajo promotores específicos de tejido, eliminando regiones génicas tejido-específicas. Puesto que este trabajo se centra en el papel de la dinámica mitocondrial en el tejido adiposo marrón, la Cre-recombinasa se mantuvo bajo el promotor específico UCP-1 (UCP-Cre) ya que esta proteína sólo se expresa en los adipocitos termogénicos (Guerra *et al.* 2001) (**Figura 3.1**). Todos los modelos se generaron mediante el cruce de animales machos *Igf1r* o *Opa1* o *Mfn1* LoxP/LoxP, *Ucp1-Cre* -/- con hembras *Igf1r* o *Opa1* o *Mfn1* LoxP/LoxP, *Ucp1-Cre* +/- obteniéndose un 50% de animales control *Igf1r* o *Opa1* o *Mfn1* LoxP/LoxP, *Ucp1-Cre* -/- y un 50% de ratones *Igf1r* o *Opa1* o *Mfn1* LoxP/LoxP, *Ucp1-Cre* +/-, o lo que es igual, los modelos BATIGF1RKO, BATOPA1KO y BATMFN1KO, respectivamente.

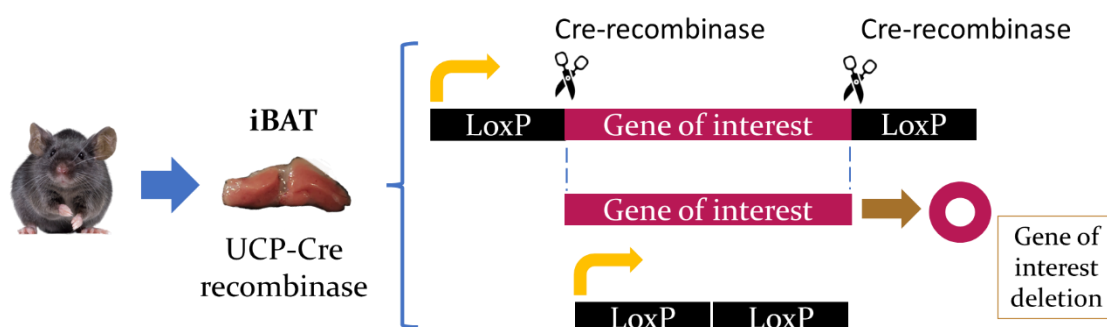


Figura 3.1 Tecnología Cre-recombinasa tejido-específica de BAT mediante el uso del promotor UCP-1 para la generación de los modelos murinos utilizados en esta tesis doctoral.

En todos los estudios sólo se han empleado ratones macho puesto que los estrógenos están implicados en la regulación del órgano adiposo (Steiner & Berry, 2022). Fueron mantenidos en condiciones estándar de luz (ciclos luz/oscuridad de 12 horas), temperatura (23,3°C) y humedad (65,1%), y con alimentación y bebida

ad libitum desde el destete realizado aproximadamente a los 21 días. El estado microbiológico de los animales fue controlado sanitariamente siguiendo los criterios de FELASA (Federation of European Laboratory Animal Science Associations) y no se reveló la presencia de patógenos. El estado de salud de los animales se controló rutinariamente mediante análisis en animales centinelas. Todas las manipulaciones con animales se realizaron de acuerdo con las normas establecidas por la Directiva Europea 2010/63/UE y el Comité Ético de la Universidad Complutense de Madrid, bajo el PROEX con referencia 126/17 y certificado CAP-202.3-21 de la Comunidad de Madrid.

Por otro lado, durante la estancia predoctoral en el Instituto Wenner-Gren de la Universidad de Estocolmo, se utilizaron ratones con un *background* genético 129/Sv pertenecientes al **modelo genérico UCP1-KO**. Los animales WT y KO fueron previamente generados según Enerbäck *et al.*, 1997, y fueron mantenidos en condiciones estándar de luz (ciclos luz/oscuridad de 12 horas), temperatura (24 °C) y humedad (65,1%), con alimentación y bebida *ad libitum* desde el destete realizado aproximadamente a los 21 días. La semana anterior al sacrificio, se mantuvieron en las mismas condiciones pero a una temperatura correspondiente a 21 °C. Este estudio fue aprobado por el Comité de Ética Animal de la región de Estocolmo Norte en el protocolo 302/11, siguiendo las directrices FELASA y la Directiva Europea 2010/63/UE.

3.1.2 Diseño experimental de los modelos animales

3.1.2.1 Modelo BATIGF1RKO

Para el estudio del papel de la dinámica mitocondrial en la termogénesis adaptativa en el modelo BATIGF1RKO, se planteó un primer experimento de exposición al frío (**apartado 3.1.4.3**) con ratones macho de 3 meses de edad a los que, tras 3 días en termoneutralidad (30°C), se les puso a 4°C durante 12 horas.

Para la evaluación de la mitofagia en el mismo modelo murino se utilizaron ratones macho de 3 meses de edad a los que se les administró intraperitonealmente una dosis de 60 mg/kg/día de cloroquina (**apartado 3.7.3**) durante el periodo en termoneutralidad (3 días a 30°C) para posteriormente mantenerlos durante 12 horas a 4°C.

Todo este diseño experimental queda recogido en la **Figura 3.2**. Todos los grupos *knock-out* planteados conllevaron la agrupación de animales LoxP/LoxP bajo las mismas condiciones de estudio.

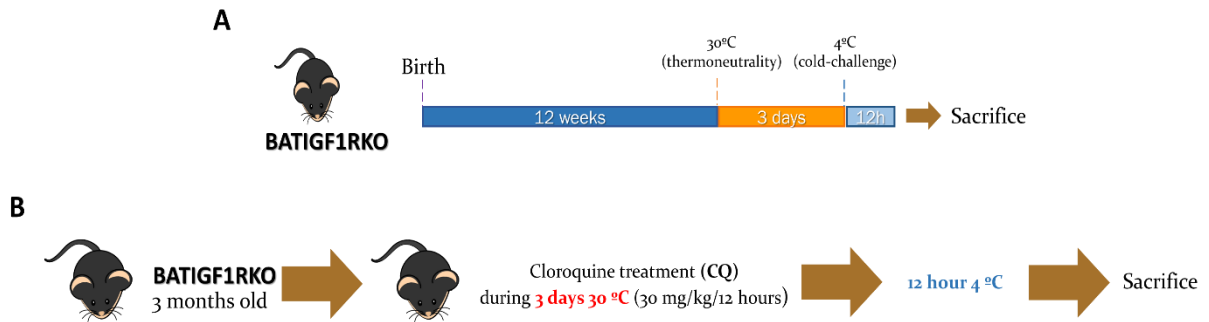


Figura 3.2 Diseños experimentales en el modelo **BATIGF1RKO**. **(A)** Exposición al frío y **(B)** impedimento de la autofagia.

3.1.2.2 Modelo **BATOPA1KO**

En primer lugar, se evaluó el efecto de la delección de OPA-1 específicamente en BAT en la termogénesis adaptativa mediante la exposición al frío (**apartado 3.1.4.3**), mismo proceso que el utilizado en el modelo **BATIGF1RKO** (**apartado 3.1.2.1**) pero en este caso los animales macho eran de 5 meses de edad.

Posteriormente, se realizó otro grupo experimental junto con su grupo control, también de 5 meses de edad, para el análisis de la dinámica mitocondrial en el modelo **BATOPA1KO** en una situación de termogénesis prolongada. Para ello, se administró 1 mg/kg/día del β 3-adrenérgico **CL-316243** (**apartado 3.7.3**) durante 14 días a los ratones antes del sacrificio.

Todo este diseño experimental queda recogido en la **Figura 3.3**. Todos los grupos *knock-out* planteados conllevaron la agrupación de animales *LoxP/LoxP* bajo las mismas condiciones de estudio.

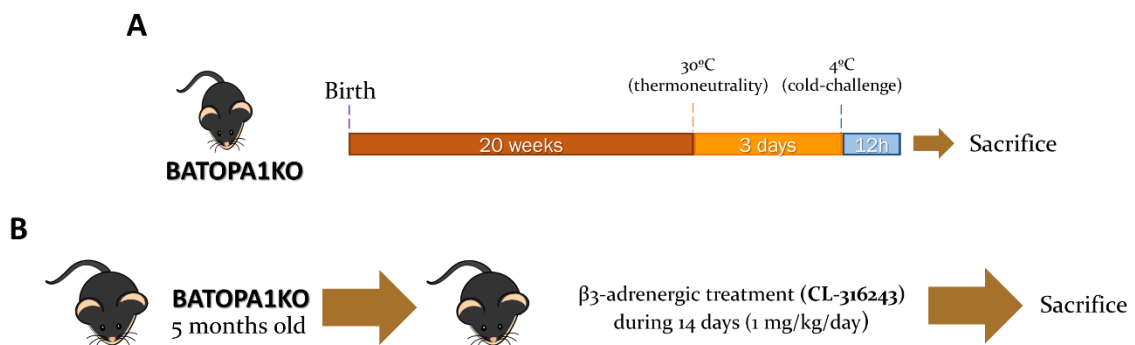


Figura 3.3 Diseños experimentales en el modelo **BATOPA1KO**. **(A)** Exposición al frío y **(B)** termogénesis prolongada activa vía farmacológica.

3.1.2.3 Modelo BATMFN1KO

Para el estudio de la delección de MFN-1 en BAT durante la activación de la termogénesis adaptativa se realizó el experimento de exposición al frío (**apartado 3.1.4.3**) con ratones macho de 5 meses de edad a los que, tras 3 días en termoneutralidad (30°C), se les puso a 4°C durante 12 horas. Este diseño experimental queda recogido en la **Figura 3.4**. El grupos *knock-out* planteado conllevó la agrupación de animales LoxP/LoxP bajo las mismas condiciones de estudio.

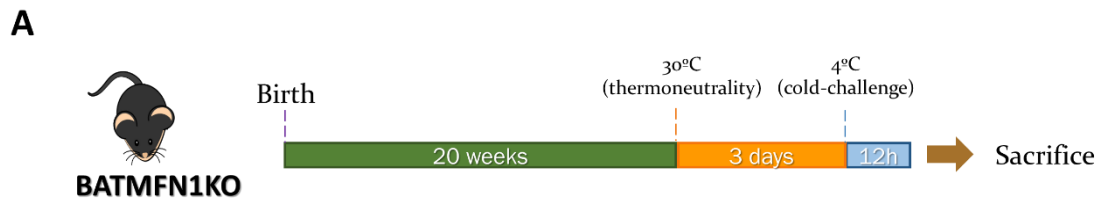


Figura 3.4 Diseño experimental en el modelo **BATMFN1KO**. **(A)** Exposición al frío (4°C) durante 12 horas.

3.1.2.4 Modelo UCP1-KO

El modelo genérico UCP1-KO fue utilizado para la evaluación de la dependencia de UCP-1 de diferentes desacoplantes mitocondriales. Para ello, se usaron animales de 7-9 semanas de edad que se trasladaron a la zona de experimentación del animalario perteneciente al Instituto Wenner-Gren de la Universidad de Estocolmo cuya temperatura ambiental era de 21°C durante la semana previa al experimento. Tras el sacrificio, se aislaron las mitocondrias de los compartimentos interescapular, subescapular y supraclavicular de grasa parda (**apartado 3.2.2.1**) para la respirometría de estos orgánulos. Este diseño experimental queda recogido en la **Figura 3.5**. El grupos *knock-out* planteado conllevó la agrupación de animales WT bajo las mismas condiciones de estudio.

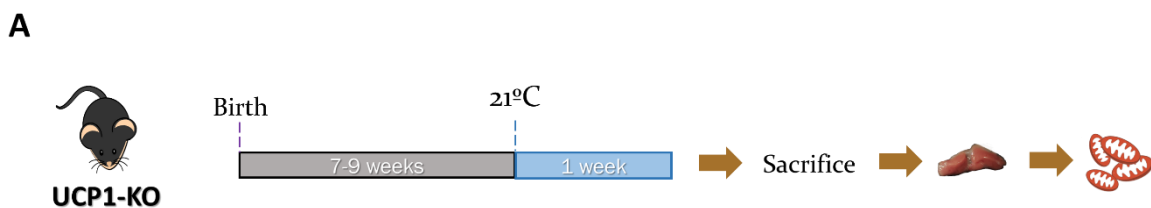


Figura 3.5 Diseño experimental en el modelo **UCP1-KO**. **(A)** Aislamiento mitocondrial del BAT.

3.1.3 Caracterización genética y proteica de los modelos animales

La caracterización genética de ratones animales se realizó con el ADN extraído de las colas. Para la extracción de ADN se utilizó el kit Wizard® SV Genomic DNA Purification System (Promega). Las colas de los ratones se incubaron con 275 µl de una mezcla de digestión: 200 µl de tampón de lisis, EDTA (100 mM, pH 8,0), proteinasa K (20 mg/ml) y RNAsa A (4 mg/ml) a 55°C durante la noche. Después de la centrifugación (13000 rpm, 4°C, 3 minutos), se recolectó la fracción superior y se precipitó el ADN con la adición de 600 µl de etanol absoluto y centrifugación (13000 rpm, 4°C, 1 minutos), tres veces más. El precipitado se secó durante 5 minutos y posteriormente se resuspendió en 300 µl de H₂O libre de nucleasas. Los cebadores utilizados para la caracterización genética de los modelos animales se describen a continuación (**Tabla 3.1**):

Gen	Secuencia	Producto	Condiciones (T _m y ciclos)
Igf1r (exón 3)	S: 5'-CCGCTGCTGGACCACAAATC-3' AS: 5'-CTTCATCGCCGACACTTTG-3'	WT = 250 pb LoxP/LoxP IGF-1R = 310 pb	60°C 34 ciclos
Opa1	S: 5'-ATTGTCTGATGGCAGTGGTG-3' AS: 5'-TTCTGTGCACACTGGTGTCC-3'	WT = 850 pb LoxP/LoxP OPA-1 = 1100 pb	60°C 35 ciclos
Mfn1	S: 5'-TTGGTAATCTTTAGCGGTGCTC-3' AS: 5'-AGCAGTTGGTTGTGTGACCA-3'	WT = 350 pb LoxP/LoxP MFN-1 = 450 pb	66°C 40 ciclos
Ucp1-Cre	S: 5'-GTCTGCACTGGCACTACCTA-3' AS: 5'-GGAGAAGCCTCATCAATGTCA-3' AS(Cre): 5'CCATCGCTCGACCAGTTTGT-3'	WT = 285 pb Cre = 600 pb	60 °C 30 ciclos

Tabla 3.1 Cebadores utilizados para el genotipado de los modelos animales.

Se realizó una PCR utilizando el ADN extraído de las colas. Se mezcló 1 µl de ADN con 25 µl de un tampón específico (Tris-HCl 75 mM, MgCl₂ 2 mM, KCl 50 mM, (NH₄)₂SO₄ 20 mM, pH 9,0), 0,2 µl de los cebadores (cada uno), dNTP 0,2 mM (cada uno) y 1 U de ADN polimerasa. Se utilizó un termociclador Veriti de 96 pocillos (Applied Biosystems) para PCR y el producto obtenido se mezcló con el tampón de carga [Tris-HCl, 1,7 mM, azul de bromofenol 0,005 % (p/v), xilano cianol 0,005 % (p/v), glicerol 10 % (v/v), EDTA 10 mM, pH 7,6] y se cargó en un gel de agarosa 1,5-3 % (p/v) en TAE (Tris-HCl 40 mM, ácido acético 20 mM y EDTA 1 mM, pH 8,0), suplementado con GelRed (Biotium®) después de la fusión de agarosa. La electroforesis se realizó en tampón TAE y se usó Phi-X174/HaeIII (Promega) como marcador de ADN. El resultado se visualizó a través de un transiluminador UV y las imágenes se tomaron con una cámara CCD (dispositivo acoplado cargado), ChemiDoc XRS+ (Bio-Rad®).

Además, se realizó una verificación proteica mediante la técnica Western Blot posteriormente descrita en el **apartado 3.2.2.2**. Las imágenes representativas de PCR y Western Blot quedan recogidas en la **Figura 3.6**.

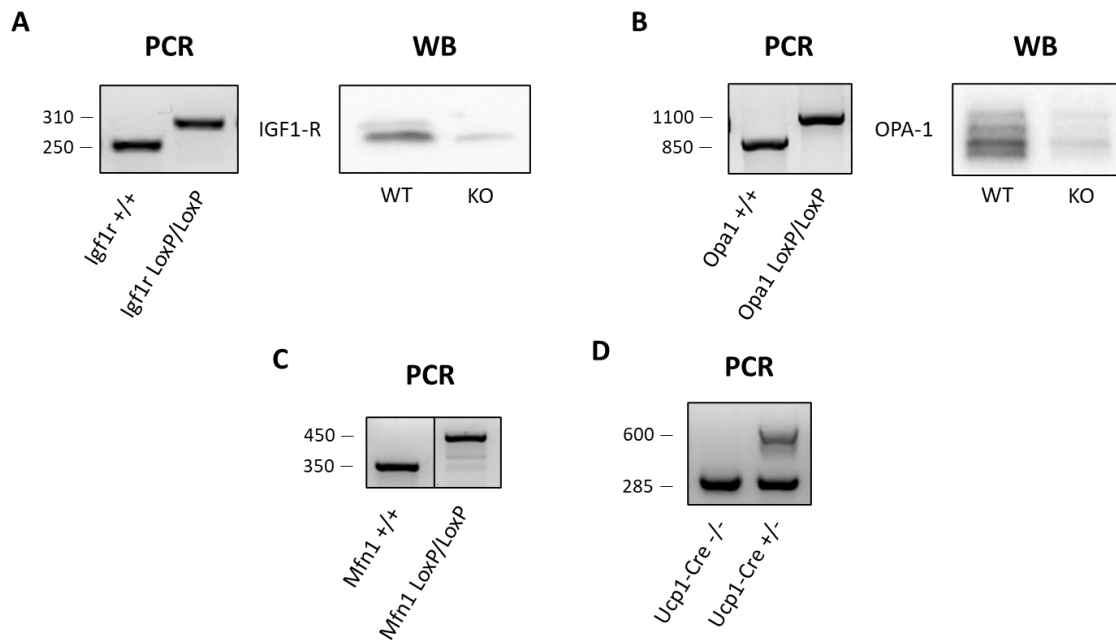


Figura 3.6 Ejemplo representativo de los resultados de las PCR y western blots obtenidas para genotipar a los modelos (A) BATIGF1RKO, (B) BATOPA1KO, (C) PCR de BATMFN1KO y (D) PCR de Ucp1-Cre, herramienta necesaria para la delección de la región floxeada.

3.1.4 Técnicas empleadas en los modelos animales

3.1.4.1 Prueba de tolerancia a la glucosa (GTT)

La prueba de tolerancia a la glucosa (GTT) se empleó para determinar la velocidad de aclaramiento de la glucosa plasmática. La prueba se realizó previo ayuno de los ratones durante toda la noche y se tomó una pequeña muestra de sangre para la medida de la glucemia basal mediante un glucómetro Accu-Chek® Aviva (Roche®), antes de la inyección intraperitoneal de 2 g de glucosa por kg de peso corporal. Esta medida se consideró como tiempo cero y la glucemia se midió nuevamente a los 30, 60, 90 y 120 minutos.

3.1.4.2 Prueba de tolerancia a la insulina (ITT)

Para estudiar la tolerancia de los ratones a la acción de la insulina se llevó a cabo la prueba de tolerancia a la insulina (ITT). Esta prueba da una idea de la capacidad del organismo de responder a la administración de insulina, observando en los animales tolerantes una reducción de la concentración de glucosa en sangre que se va recuperando durante el transcurso de esta.

La prueba se realizó en ratones alimentados ad libitum; después de medir la glucemia basal, se inyectó 1 U de insulina humana (Novo Nordisk®) por kg de peso corporal y se tomó la medida de la glucemia a los 15, 30 y 60 minutos usando un glucómetro Accu-Chek® Aviva (Roche). Los resultados se expresaron como el porcentaje de la concentración inicial de glucosa en sangre.

3.1.4.3 Experimento de exposición al frío

La finalidad de este ensayo es estudiar la capacidad termogénica del tejido adiposo marrón de los modelos animales utilizados en esta tesis doctoral. Previamente al ensayo, los animales fueron puestos en termoneutralidad (30 °C) durante tres días. Este paso previo debe realizarse siempre que se quiera estudiar la termogénesis, puesto que bajo las condiciones de temperatura habituales del animalario (23 °C) la proteína UCP-1 se encuentra activa, dando lugar a resultados del ensayo e interpretaciones erróneas. Tras el periodo de termoneutralidad, se tomó la temperatura basal de los animales y, posteriormente, fueron expuestos durante 12 horas a temperaturas de entre 2 y 4 °C. Durante este tiempo se midió la temperatura rectal, denominada temperatura corporal a lo largo de este trabajo, utilizando un termómetro con sonda rectal incorporada (BIO-9882 Dual Input Thermometer de Bioseb, Vitrolles, Francia). Todos los experimentos se comenzaron a la misma hora de la mañana (8 am), salvo los de respiración mitocondrial cuyo comienzo tuvo lugar a las 22 pm, siempre con disposición de alimento y bebida *ad libitum*. Los animales cuya temperatura bajaba de los 31°C fueron sacrificados antes de acabar la exposición al frío siguiendo la normativa ética de la Universidad Complutense de Madrid y bajo el PROEX con referencia 126/17.

3.1.4.4 Sacrificio de los animales de experimentación

Los animales empleados para la realización de esta tesis fueron sacrificados en condiciones de alimentación tras la exposición al frío o el mantenimiento en termoneutralidad, así como tras el tratamiento con CL-316243. El método general de sacrificio se basó en una exposición a concentraciones superiores a 60% de dióxido de carbono (anhídrido carbónico), puesto que actúa como un agente anestésico y produce rápidamente la pérdida de consciencia, y tras comprobar la ausencia de reflejo podal, se desinfectaron con etanol al 70% (v/v). Para el modelo UCP1-KO se realizó otro procedimiento de eutanasia basado en la dislocación cervical, previa anestesia por 30% de anhídrido carbónico, seguidamente de la decapitación del animal. En todos los modelos animales se realizó una incisión en forma de "V" desde el abdomen inferior extendiéndose hacia las porciones laterales del diafragma, con objeto de exponer todos los órganos de la cavidad peritoneal. Los tejidos seleccionados en este estudio fueron: iBAT, iWAT, eWAT, mWAT, rWAT y otros compartimentos de BAT como subescapular (subBAT) y supraclavicular (supraBAT).

Los órganos extraídos se pesaron y ciertos fragmentos en algunos casos se depositaron en una solución de formalina 10% para incluirlos posteriormente en parafina (**apartado 3.3.1.1**) y realizar las tinciones oportunas (**apartado 3.3.2**), o en *optimum cutting temperature* (OCT) *Mounting Media* (VWR Chemicals BDH®) para la tinción de contenido lipídico de Oil-Red O (**apartado 3.3.2.3**), o se almacenaron el suero salino para su posterior preparación para microscopía electrónica

(apartado 3.4.2). El OCT permite la inclusión de la biopsia sin fijación previa, ya que a esa temperatura se detienen los procesos post mortem del espécimen y la hace apta para estudios de lípidos, enzimáticos e inmunohistoquímicos. Por otro lado, en caso de no emplear inmediatamente los tejidos, se congelaron directamente en nitrógeno líquido para ser almacenados a -80 °C hasta su posterior utilización.

3.2 TÉCNICAS MOLECULARES

3.2.1 Análisis de expresión de proteínas

3.2.1.1 Obtención y cuantificación de extractos proteicos

Las muestras de tejido se descongelaron a temperatura ambiente y se homogeneizaron en una proporción de 0,04-0,05 mg de tejido por 400-500 µl de tampón de lisis [Nonidet-P40 1 % (v/v), Tris-HCl 50 mM, EDTA 5 mM, EGTA 5 mM, NaCl 150 mM, NaF 20 mM, pH 7,5] al que se añadió previamente PMSF 1 mM, aprotinina 10 µg/ml y leupeptina 2 µg/ml. El lisado se transfirió a tubos eppendorf y después se centrifugó (15 minutos, 15 000 g a 4 °C). Se recogió el sobrenadante con el lisado de proteínas, descartando otros componentes celulares y grasa libre.

La cuantificación de proteínas se determinó a través del ensayo de Bradford, basado en la medición de los cambios de absorbancia (de 465 nm a 595 nm) que se producen cuando las proteínas se agregan a una solución ácida de Coomassie Brilliant Blue G-250. Las interacciones hidrofóbicas e iónicas producidas por los aminoácidos básicos, esencialmente la arginina, estabilizan la forma aniónica del reactivo indicador, lo que lleva a un cambio de color azul visible después de cinco minutos de incubación. Las concentraciones de proteína se interpolaron a partir de una recta patrón de 0-10 µg/ml preparada a partir de una solución estándar de BSA 2 mg/ml (Bio-Rad). Las absorbancias se midieron con un espectrofotómetro a 595 nm a partir de una mezcla de 1 µl de muestra en 1 ml de concentrado de reactivo de tinción para el ensayo de proteínas Bio-Rad (Bio-Rad®) diluido en ddH₂O (1:5).

3.2.1.2 Western Blot (WB)

3.2.1.2.1 Preparación de muestras y geles SDS-PAGE

La concentración de las muestras se igualó a 0,5-2 µg/µl de proteína, diluyendo con tampón de lisis y agregando tampón Laemmli 4X para un volumen final [Tris-HCl 100 mM, glicerol 5 % (v/v), SDS 2 % (p/v), 2-mercaptoetanol 1% (v/v), azul de bromofenol 0,004% (p/v), pH 6,8]. Las muestras se desnaturalizaron (3 minutos, 95°C) y se cargaron 10-40 µg por muestra en geles de poliacrilamida SDS-PAGE. Junto con las muestras, se cargó un marcador de peso molecular estándar [Precision Plus Protein Standards All Blue (Bio-Rad)].

La concentración de acrilamida en el gel de separación se determinó por el tamaño de la proteína diana. Las proteínas de bajo peso molecular (25-80 kDa) se analizan utilizando geles con mayor porcentaje de acrilamida (15%) mientras que para proteínas más pesadas (>80 kDa) se prefiere un menor porcentaje de acrilamida (8-

10%). La proporción de los demás componentes de los geles de acrilamida (SDS, Tris-HCl pH 8,8 y pH 6,8, persulfato de amonio y TEMED) también varía según el porcentaje de acrilamida utilizado.

3.2.1.2.2 *Electroforesis en geles de SDS-PAGE*

Las proteínas se separaron mediante electroforesis en geles SDS-PAGE discontinuos, siguiendo el método descrito por Laemmli (Laemmli, 1970) y utilizando un equipo Miniprotean II o TetraSystem (Bio-Rad®). Con esta composición [Tris-base 25 mM, glicina 190 mM y SDS 0,1% (p/v) pH 8,3] se preparó el running buffer utilizado durante la electroforesis y se usó un voltaje continuo de 100-140 V durante 1,5 - 2 horas.

3.2.1.2.3 *Transferencia a membranas de PVDF*

Una vez separadas las proteínas por su peso molecular, se transfirieron de los geles SDS-PAGE a membranas de Difluoruro de Polivinilideno (PVDF) Immobilon-P 0,45 µm (Merck Millipore®). Las membranas de PVDF, que son altamente hidrofóbicas, se activaron previamente con metanol.

La electrotransferencia se realizó utilizando la Celda de Transferencia Electroforética Mini Trans-Blot (Bio-Rad) a 100 V durante una hora y 10 minutos en frío. El tampón de transferencia utilizado se preparó con Tris 25 mM, glicina 192 mM y metanol al 20% (v/v).

3.2.1.2.4 *Bloqueo e incubación con anticuerpos*

Una vez finalizada la transferencia, las membranas se bloquearon en TTBS [Tris-HCl 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7,5 con Tween-20 0,05% (v/v)] suplementado con 5% (p/v) de BSA (Albúmina-BSA-Fracción V para Western blotting, Panreac®) durante 1 hora a temperatura ambiente, con agitación suave. El propósito de este paso fue bloquear los sitios de unión inespecíficos del anticuerpo primario a las proteínas.

Pasado este tiempo, se retiró la solución de bloqueo y se incubaron las membranas con anticuerpo primario diluido en TTBS, suplementado o no con BSA al 5% según los requerimientos de anticuerpos, durante la noche a 4°C, con agitación suave. La lista de anticuerpos primarios se detallará en **apartado 3.7.1, Tabla 3.2** de este capítulo.

3.2.1.2.5 *Detección de anticuerpos por quimioluminiscencia*

Pasada toda la noche, después de tres lavados con TTBS, las membranas se incubaron con el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP), diluido en TTBS a temperatura ambiente y agitación suave durante 1 hora. El anticuerpo secundario se une al anticuerpo primario después de reconocer la región constante de la especie huésped en la que se generó. La lista de anticuerpos secundarios se detallará en el **apartado 3.7.2, Tabla 3.3** de este

capítulo. Después de la incubación, las membranas se lavaron nuevamente tres veces con TTBS.

Para la detección de anticuerpos secundarios conjugados con HRP, las membranas se incubaron en el reactivo de quimioluminiscencia Clarity™ Western ECL Substrate (Bio-Rad®), basado en la oxidación de luminol en presencia de H₂O₂ y un catalizador (3-aminoftalato), que permanece en estado excitado y emite luz visible (432 nm) cuando vuelve a su estado fundamental. Se utilizó el sistema ChemiDoc™ XRS+ System (Bio-Rad®) para la obtención de imágenes.

3.2.1.2.6 Borrado de membranas de PVDF


Se utilizó el borrado (*stripping*) de membranas para eliminar los anticuerpos primarios y secundarios unidos a ellas, lo que permitió analizar diferentes proteínas cuyas bandas podían superponerse o la misma proteína en su estado fosforilado y total. Las membranas se incubaron en solución de separación Restore™ Western Blot Stripping Buffer (Thermo Fisher Scientific®) a temperatura ambiente y agitación suave durante 5-15 minutos. Después de eso, las membranas se lavaron entre 3-5 veces con TTBS antes de la incubación nuevamente con el nuevo anticuerpo primario.

3.2.2 Estudio de la respiración mitocondrial

3.2.2.1 Aislamiento de mitocondrias

Los depósitos de tejido adiposo marrón interescapular, subescapular y cervical se diseccionaron inmediatamente después del sacrificio, en el caso del modelo BATIGF1RKO sólo iBAT. Los depósitos se limpiaron cuidadosamente de los tejidos circundantes y se introdujeron rápidamente en medio para el aislamiento mitocondrial (250 mM de sacarosa, 10 mM de TES (pH 7,2), 1 mM de EGTA, 0,1% de BSA libre de ácidos grasos) mantenido en hielo. Se midió el peso de los depósitos de tejido combinados y, tras un lavado con el medio de aislamiento helado, se picó el tejido en trozos de 2-3 mm y se homogeneizó en un homogeneizador eléctrico con un mortero de teflón; a continuación, se filtró a través de una gasa de algodón en un tubo de centrifuga. El homogeneizado se centrifugó durante 10 minutos a 8800 g, 2°C. A continuación, se desechó el sobrenadante y se limpió de grasa el interior del tubo. El pellet se resuspendió a mano en un homogeneizador de vidrio con un mortero de teflón en 20 ml con el mismo medio anterior pero con la concentración de BSA aumentada al 1 % y, posteriormente, se centrifugó durante 10 minutos a 800 g, 2°C.

El sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo y se centrifugó durante 10 minutos a 8800 g, 2°C, el sobrenadante se desechó y el precipitado se resuspendió en 15 ml de tampón de aislamiento compuesto por 100 mM KCl, 20 mM TES, 0,6 % de BSA libre ácidos grasos, pH 7,2, y se centrifugó otra vez durante 10 minutos a 8800 g, 2°C. El sobrenadante se desechó y el pellet se resuspendió en el tampón de aislamiento hasta alcanzar una concentración de 20-40 mg/ml. La concentración



de proteína mitocondrial se determinó con una solución de Fluram siguiendo el protocolo de Udenfriend *et al.*, 1972. Las suspensiones mitocondriales de BAT recién aisladas se mantuvieron en tubos de vidrio profundamente sumergidos en hielo y se utilizaron para mediciones de consumo de oxígeno y potencial de membrana en un plazo de 2 horas.

3.2.2.2 Respirimetría por tecnología O2k-Oroboros System

En el **modelo BATIGF1RKO**, el estudio de respiración mitocondrial se realizó con un instrumento O2k Oxígrafo (Oroboros Instruments) con el módulo fluorescente adjunto. Las mediciones de oxígeno se realizaron antes de cada experimento. Tras el aislamiento de las mitocondrias, se cargaron 50 µg en las cámaras del instrumento con Mir05 (Oroboros Instruments), y posteriormente se añadieron secuencialmente sustratos e inhibidores. Para este experimento se utilizó glutamato (10 mM) y malato (0,5 mM) para activar la respiración dependiente del Complejo I y rotenona (0,5 µM) para suprimirla. A continuación, se añadió succinato (10 mM) para activar la respiración dependiente del Complejo II y, finalmente, 1 mM de ADP para activar el estado 3 de la respiración. Todos se inhibieron añadiendo 2,5 µM de antimicina A. Por último, se añadieron 0,5 mM de N, N, N', N'-tetrametil-p-fenilendiamina (TMPD) y 2 mM de ascorbato para activar la respiración dependiente del Complejo IV, que posteriormente se suprimió añadiendo 100 mM de azida sódica.

En el **modelo UCP1-KO**, las tasas de consumo de oxígeno se monitorizaron con un oxígrafo de alta resolución (Oroboros O2k-FluoRespirometer, Austria). Se añadieron mitocondrias previamente aisladas (aproximadamente 0,3 mg) a 2,0 ml de un medio de incubación en agitación continua (125 mM de sacarosa, 20 mM de TES, 2 mM de MgCl₂, 1 mM de EDTA, 4 mM de KH₂PO₄, 0,1 % de BSA libre de ácidos grasos, ajustado a pH 7,2 con KOH) en presencia de 3 mM de malato, 5 mM de piruvato, 0,5 mM de octanoil-L-carnitina (OctCar) y 3 µM de carboxiatractilósido (CATR). Se midió la respiración basal durante 2-3 minutos y, a continuación, se añadió 1 ó 3 mM de GDP, según lo indicado. A continuación, se realizaron trazados dosis-respuesta de los desacoplantes en estudio (oleato sódico, FCCP y DNP) con adiciones sucesivas de los desacoplantes hasta la concentración indicada y alcanzar la respiración máxima. Para reproducir la condición de Bertholet *et al.*, 2022, en algunos experimentos se añadió al medio respiratorio 10 mM de metil-β-ciclodextrina (MβCD). El consumo de oxígeno se calculó por mg de proteína mitocondrial.

3.2.2.3 Potencial de membrana por tecnología O2k-Oroboros System

Además de medir la tasa de consumo de oxígeno en las mitocondrias aisladas del **modelo UCP1-KO**, se determinó el potencial de membrana en los mismos diseños de adiciones previamente descrito en el **apartado 3.2.2.2**.

Las mediciones del potencial de membrana mitocondrial se realizaron con el fluoróforo TMRM (éster metílico de tetrametilrhodamina, 0,5 μM). Los cambios en la intensidad de fluorescencia del TMRM se siguieron en paralelo al consumo de oxígeno a 37 °C en el Oroboros O2k-FluoRespirometer (Austria) con el módulo O2K-Fluo LED2 mediante un sensor de fluorescencia *green*. Las curvas de calibración se realizaron para cada preparación mitocondrial en medio libre de K^+ (por lo demás, como se ha indicado anteriormente) y se obtuvieron a partir de trazas en las que el K^+ extramitocondrial se alteró mediante la adición de KCl en un intervalo de concentración final de 0,1-100 mM en presencia de 3 μM de valinomicina. Al final de la valoración se añadió un péptido formador de poros, la alameticina (10 μM). El cambio en la señal de fluorescencia causado por cada adición se representó gráficamente frente a $[\text{K}^+]_{\text{out}}$ y el K^+ intramitocondrial, $[\text{K}^+]_{\text{in}}$, se estimó por extrapolación de la línea al punto de captación cero. Las lecturas de fluorescencia se utilizaron para calcular el potencial de membrana (mV) utilizando la recta de calibrado mencionada anteriormente y mediante la ecuación de Nernst según: $\text{Fluorescence} = 61 \text{ mV} - \log ([\text{K}^+]_{\text{in}}/[\text{K}^+]_{\text{out}})$.

3.3 ESTUDIO HISTOLÓGICO

3.3.1 Preparación de los tejidos

3.3.1.1 Fijación, inclusión en parafina y obtención de cortes de tejido

De los tejidos obtenidos en el sacrificio de los ratones, se tomó una pequeña biopsia para los experimentos de histología. Estos fragmentos de tejido fueron fijados durante toda la noche en una solución de formaldehído al 4%. Al día siguiente, se realizaron tres lavados de 1 hora cada uno con etanol al 70 % (v/v), para precipitar las sales formadas por el tampón en el que se encuentra el formaldehído. A continuación, los tejidos fueron deshidratados al pasarlos por una batería de alcoholes de gradación creciente hasta llegar al etanol absoluto. Posteriormente, el tejido se transfirió a un sustituto más seguro del xileno (Neo-Clear™, Merck Millipore®), miscible tanto en el alcohol 100% (v/v) como en la parafina. Cuando los tejidos procesados fueron tejidos adiposos (tanto blancos como marrones), el Neo-Clear™ se diluyó 1:1 en etanol.

Por último, los tejidos se pasaron a recipientes con parafina líquida en una estufa a 50°C, realizando dos rondas de parafinado para favorecer la eliminación de los restos de disolvente orgánico. Tras embeber por completo las muestras de tejido, se vertió parafina líquida en moldes en los que se introdujeron las muestras y se dejaron solidificar a temperatura ambiente. Para conservarlos, se congelaron a -20°C.

Para obtener cortes de los bloques de parafina de los distintos tejidos, previamente solidificados, se utilizó un microtomo Leica RM2125RT, obteniéndose cortes de entre 6-7 μm de grosor que fueron depositados en la superficie de un baño de agua a 55 °C para su completa extensión y, seguidamente, colocados sobre los

portaobjetos. Se obtuvieron alrededor de 20 cortes por cada región del bloque, descartando alrededor de 15-20 cortes entre cada una de ellas.

Antes de realizar cualquier tinción histológica, fue necesario eliminar la parafina e hidratar los tejidos en este tipo de preparaciones, lo que les permitió captar adecuadamente los colorantes. Para desparafinarlos, los portaobjetos con los cortes se introdujeron en Neo-Clear™ (2 incubaciones de 10 minutos). A continuación, para la hidratación de los tejidos, las preparaciones se introdujeron en etanol absoluto (2 incubaciones de 2 minutos) y, por último, en una batería de alcoholes de concentración decreciente, hasta el 70% (v/v), durante 1-3 minutos por cada solución. Finalmente, los portaobjetos se lavaron varias veces en agua destilada hasta quedar preparados para ser utilizados en las tinciones correspondientes.

3.3.1.2 Inclusión en OCT y obtención de cortes de tejidos en fresco

Algunas tinciones y anticuerpos específicos requieren del tejido fresco y sin deshidratar para su realización, ya que los elementos de interés (algunos antígenos, lípidos, etc) pueden degradarse durante este procesamiento. Para la conservación de los tejidos frescos, las biopsias tomadas durante el sacrificio se embebieron en compuesto *OCT Mounting Media* (Tissue-Tek®), que es un medio sintético muy viscoso a temperatura ambiente y que favorece la realización de cortes en criostato a temperaturas muy bajas (-20°C), para criopreservarlas y congelándolas en nitrógeno líquido hasta su uso.

Los bloques generados se cortaron en secciones de 6-7 µm en un criostato Leica CM1510S, que se depositaron sobre portaobjetos almacenados a -80°C hasta el momento de hacer las tinciones.

3.3.2 Tinciones histológicas

3.3.2.1 Hematoxilina y eosina

Tras el proceso de desparafinado mencionado anteriormente, los cortes de tejidos adiposos, páncreas e hígado fueron teñidos con hematoxilina y eosina para observar la morfología de las células que conforman cada uno de los tejidos. En primer lugar, los portaobjetos con los tejidos se pasaron por una cubeta con hematoxilina Mayer durante 7 minutos, para teñir los núcleos (estructuras ácidas). A continuación, se realizaron 3 lavados de 5 minutos en ddH₂O para eliminar el exceso de colorante y, posteriormente, las preparaciones se incubaron en eosina alcohólica 0,2% durante 5 minutos, para teñir el citoplasma y la matriz extracelular (estructuras básicas). Tras volver a lavar con agua destilada para aclarar el colorante, las preparaciones fueron deshidratadas mediante la utilización de una batería de alcoholes de gradación creciente hasta llegar al Neo-Clear™. Finalmente, las preparaciones se montaron utilizando DPX (soluble en xileno) como medio de montaje.

3.3.2.2 Inmunohistoquímica de tejidos adiposos (IHQ)

Los cortes de tejido fueron desparafinados y rehidratados (**apartado 3.3.1.1**). A continuación, se procedió a desenmascarar los antígenos, ya que la extensa fijación con aldehídos produce una gran cantidad de puentes metileno a lo largo de la estructura de las proteínas, lo cual puede ocultar los epítomos reconocidos por los anticuerpos. Para ello, se hirvieron los cortes en una solución de citrato sódico 10 mM a pH 6,0 durante 20 minutos.

Posteriormente, los cortes se lavaron tres veces con ddH₂O y se incubaron 30 minutos con una solución de H₂O₂ 3% (v/v) para bloquear las peroxidasas endógenas. Tras dos lavados con ddH₂O, las preparaciones se incubaron en solución de bloqueo (10% suero de cabra en PBT) durante 1 hora a temperatura ambiente en una cámara húmeda. Seguidamente, se añadió el anticuerpo primario diluido en PBT con 1% BSA, durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente, las preparaciones se lavaron 3 veces en PBT y se incubaron con el anticuerpo secundario conjugado con HRP a una dilución 1:500 (*GE healthcare*) en oscuridad. Después de un par de lavados en PBT, se procedió al revelado mediante el uso del reactivo 3,3'-diaminobenzidina (DAB) y un cromógeno (Dako), siguiendo las instrucciones del fabricante. La 3,3'-diaminobenzidina forma un precipitado marrón local al oxidarse en presencia de H₂O₂ y la peroxidasa. La reacción se paró a los 10 minutos introduciendo las preparaciones en ddH₂O, que posteriormente se incubaron en hematoxilina 1 minuto como tinción de contraste nuclear. Tras lavar con agua destilada y eliminar los restos de colorante, las preparaciones se sometieron a la batería de alcoholes en grado creciente y al Neo-Clear™, para finalmente montarlas con DPX.

3.3.2.3 Tinción de lípidos celulares con Oil-Red O

La tinción de los lípidos celulares requiere tejidos frescos para no perder la integridad de las estructuras lipídicas y poder detectarlas con el Oil-Red O. Por todo ello, para realizar esta tinción, se cortaron bloques de BAT embebidos en OCT para su criopreservación.

Previamente a la tinción, se descongelaron las preparaciones durante unos 10 minutos a temperatura ambiente y después se fijaron los tejidos con formol 10% durante otros 10 minutos. A continuación, las preparaciones se sumergieron durante unos segundos en isopropanol al 60%, que es soluble en el colorante Oil-Red O, para eliminar los restos de formol, y posteriormente en una solución de Oil-Red O (Mehlem *et al.*, 2013) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Tras un par de lavados de 5 minutos con agua destilada para eliminar los restos del colorante, se hizo la tinción de contraste con hematoxilina Mayer durante 5 minutos para teñir los núcleos. Finalmente, tras lavar de nuevo con agua destilada, se montaron las preparaciones utilizando un medio de montaje soluble en agua.

3.4 TÉCNICAS DE IMAGEN

3.4.1 Microscopía de campo claro

Para la visualización de los adipocitos fijados y las preparaciones histológicas teñidas, se utilizó el microscopio invertido Eclipse TE300 (Nikon) acoplado a una cámara Digital Sight DS-U2 (Nikon). Las imágenes se tomaron a distintos aumentos (10X-20X) en función del experimento.

3.4.2 Microscopía electrónica de transmisión (TEM)

Para la obtención de imágenes de mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM), se tomó una pequeña biopsia de iBAT en el momento del sacrificio que se fijó en una solución de paraformaldehído 4 % (*Electron Microscopy Sciences*, 15710) y glutaraldehído 2,5% (Sigma-Aldrich®, G8882) con un tampón de cacodilato/fosfato 0,2 M a pH 7,3 durante aproximadamente 24 horas. Tras la fijación, las muestras se lavaron varias veces en el mismo tampón fosfato y se pusieron en contacto con una solución de OsO₄ al 1% (*Electron Microscopy Sciences*, 19172) y K₄[Fe(CN)₆] al 1,5% en H₂Odd durante 1 hora. Transcurrido este tiempo, las muestras fueron deshidratadas de forma secuencial mediante baños en acetona en distintas proporciones, y posteriormente embebidas en resina epoxi Epon812 (TAAB, T004), para secarse durante 48-72 horas a 70°C hasta su solidificación. De los bloques solidificados en resina epoxi se obtuvieron cortes ultrafinos (60 nm de espesor) mediante el ultramicrotomo *Ultracut E* (Leica®), que fueron observados para asegurar la integridad del corte y seleccionar los que contienen las regiones de interés, de forma que los cortes elegidos para ver al microscopio electrónico se tiñeron con citrato de plomo y se incluyeron en rejillas metálicas de 1 cm de diámetro para su almacenaje. Las imágenes de los cortes procedentes de muestras de tejido se obtuvieron por un microscopio electrónico de transmisión JEOL® JEM-1010 perteneciente al Laboratorio de Microscopía Electrónica de Transmisión de la Universidad Autónoma de Madrid (UAM) por Francisco Urbano Olmos y Covadonga Aguado Ballano.

3.4.3 Resonancia magnética nuclear (RMN)

Con el objetivo de medir el porcentaje de volumen de grasa corporal de los animales, éstos se sometieron a resonancia magnética nuclear (RMN). Estos experimentos fueron realizados en el CAI de Resonancia Magnética Nuclear localizado en el Instituto Pluridisciplinar de la Universidad Complutense de Madrid por María de la Encarnación Fernández Valle. Para la realización de estos estudios, los animales fueron anestesiados con isofluorano, monitorizando su respiración durante todo el ensayo. La grasa corporal fue medida empleando el equipo de Resonancia Magnética Bruker BIOSPEC 47/40 (Ettlingen, Alemania). Las imágenes fueron obtenidas como cortes longitudinales de los animales y analizadas posteriormente, utilizando el software ImageJ™.

3.5 CUANTIFICACIÓN

Para realizar la cuantificación de los resultados de Western-blot (WB), las imágenes obtenidas en el revelador ChemiDoc™ XRS+ System (Bio-Rad®) se procesaron utilizando el programa ImageLab™ (BioRad®) para delimitar la banda correspondiente a la proteína a analizar y posicionarla en horizontal para su posterior análisis. Tras este paso, los blots se cuantificaron mediante la utilización del *plugin* “Analyze gels” del programa ImageJ™ (*National Institutes of Health, NIH*). Se seleccionaron regiones rectangulares que incluyeran todas las bandas del blot y se obtuvieron representaciones de la densidad de señal a lo largo de la región seleccionada. Se dibujó una línea base y se obtuvo el área bajo la curva referente a la señal relativa de cada punto. Los resultados fueron normalizados con la cuantificación de la señal del control de carga (β -actina o α -tubulina), y representados como *fold increase* frente a su correspondiente control. La normalización de los datos y su representación gráfica se realizaron utilizando Excel.

Para cuantificar la intensidad o porcentaje de señal de tinción en el caso de la histología, se utilizó el programa Fiji-ImageJ™ (*National Institutes of Health, NIH*), de forma que, tras convertir la imagen en 8 bits y en blanco/negro, se seleccionó el umbral adecuado de detección de señal (*threshold*) de al menos seis imágenes del mismo experimento y se obtuvo la intensidad de señal seleccionando “*measure*” dentro de la pestaña de análisis. Los datos se llevaron a Excel para restar los valores correspondientes a las intensidades de señal de los controles sin anticuerpo para eliminar la señal de fondo. La intensidad de señal media de cada experimento fue representada posteriormente en un diagrama de barras expresado en porcentaje de área teñida.

La cuantificación de las imágenes de RMN se realizó utilizando el software ImageJ™ tras la adición del *macro BrukersOpener*, seleccionando las regiones de interés (ROI) de las imágenes correspondientes al volumen corporal de los animales y al volumen de grasa en particular (ambas imágenes se incluyen en los archivos obtenidos en el CAI), asegurándonos de eliminar de la selección la señal de fondo que interfiera en el posterior análisis. Tras haber procesado cada uno de los cortes longitudinales de los archivos de volumen de grasa y de volumen corporal, se estableció el *threshold* y se calculó el área ocupada por los píxeles seleccionados, transformando el área en unidades de volumen. Posteriormente, los resultados se calcularon como porcentaje y se representaron en Excel como porcentaje de volumen de grasa por volumen total corporal de animal.

3.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los valores fueron expresados como la media \pm error estándar de la media (SEM). El análisis estadístico se realizó usando el programa GraphPad Prism® 6. Las diferencias entre dos grupos de valores se evaluaron mediante la prueba de t de Student despareada. Las diferencias fueron consideradas estadísticamente significativas cuando el valor de p era menor de 0,05 ($p < 0,05$).

3.7 MATERIALES

3.7.1 Listado de anticuerpos primarios

Los anticuerpos primarios utilizados en esta tesis doctoral se recogen en la **Tabla 3.2**:

Anticuerpo	Casa Comercial	Origen	Dilución
Drp-1	BD Biosciences (611112)	IgG Mouse	1:500 (WB)
Drp-1 (Ser 616)	Cell Signaling (#3455)	IgG Rabbit	1:500 (WB) 1:200 (IHQ)
HADHA	Abcam (ab54477)	IgG Rabbit	1:2000 (WB)
HSL	Cell Signaling (#4107)	IgG Rabbit	1:1000 (WB)
LC3A/B	Cell Signaling (#4108)	IgG Rabbit	1:1000 (WB)
Mfn-1	Santa Cruz (sc-50330)	IgG Rabbit	1:500 (WB)
Mfn-2	Abcam (ab56889)	IgG Mouse	1:500 (WB)
Opa-1	BD Biosciences (#612607)	IgG Mouse	1:2000 (WB)
p62 (SQSTM1)	ProGen (GP62-C-WBC)	IgG Guinea Pig	1:1000 (WB)
Parkina	Abcam (ab77924)	IgG1 Mouse	1:1000 (WB)
PGC1- α	Santa Cruz (sc-517380)	IgG1 Mouse	1:1000 (WB)
PINK-1	Cell Signaling (#6946)	IgG Rabbit	1:1000 (WB)
PLIN-1	Cell Signaling (#3470)	IgG Rabbit	1:2000 (WB) 1:200 (IHQ)
TOMM20	Abcam (ab56783)	IgG2 Mouse	1:1000 (WB) 1:100 (IHQ)
UCP-1	Abcam (ab10983)	IgG Rabbit	1:4000 (WB) 1:300 (IHQ)
α -tubulina	Sigma-Aldrich (T9026)	IgG1 Mouse	1:5000 (WB)
β -actina	Sigma-Aldrich (A5316)	IgG1 Mouse	1:5000 (WB)

Tabla 3.2 Listado de anticuerpos primarios utilizados.

3.7.2 Listado de anticuerpos secundarios

Los siguientes anticuerpos secundarios se usaron en esta tesis doctoral (**Tabla 3.3**):

Anticuerpo	Casa Comercial	Origen	Dilución
Sheep Anti-Rabbit	GE Healthcare (NA931V)	HRP	1:3000 (WB) 1:500 (IHQ)
Sheep Anti-Mouse	GE Healthcare (NA934V)	HRP	1:3000 (WB) 1:500 (IHQ)
Goat Anti-Guinea Pig	ProGen (90001)	HRP	1:7000 (WB)

Tabla 3.3 Listado de anticuerpos secundarios utilizados.

3.7.3 Agentes farmacológicos

Cloroquina, sal difosfato (CQ)

Se trata de un compuesto capaz de penetrar selectivamente dentro de los lisosomas, aumentando su pH interior, lo que conduce a una inhibición de la fusión entre los lisosomas y los autofagosomas, bloqueando el flujo autofágico e impidiendo la degradación proteica lisosomal. Es un fármaco del grupo de las 4-aminoquinolinas que se utiliza en el tratamiento o prevención de la malaria, así como en el de determinadas enfermedades autoinmunes, como la artritis reumatoide o el lupus eritematoso sistémico. Este compuesto (C6628, Sigma-Aldrich®) es soluble en suero salino y fue utilizado en una dosis de 30 mg/kg/12 horas.

Agonista β 3-adrenérgico CL-316243, hidrato

Este compuesto es un agonista β 3-adrenérgico (C5076, Sigma-Aldrich®), lo que le confiere un potente efecto activador de la termogénesis además de hipoglucemiante, lipolítico y activador del *browning* en la grasa blanca. Asimismo, en experimentos *in vivo*, se ha demostrado su regulación del apetito a nivel hipotalámico. Es soluble en suero salino y se utilizó en una dosis de 1 mg/kg/día.

3.7.4 Reactivos comunes

Los reactivos comunes de laboratorio fueron obtenidos en las siguientes casas comerciales:

- **Merck Millipore®**: Tritón X-100, Tween-20, Bovine Serum Albumin (BSA) Fraction V (fatty acid free)
- **Panreac®**: ácido acético, etanol, glicerol, glicina, HCl, isopropanol y metanol.
- **Roche®**: aprotinina, leupeptina y PMSF.
- **Sigma-Aldrich®**: DMSO, EDTA, paraformaldehido, SDS, Tris base (Trizma), sacarosa, TES, EGTA, EDTA, MgCl₂, KH₂PO₄, FCCP, DNP, GDP, M β CD, malato, piruvato, OctCar, oleato sódico, Na₂HPO₄, valinomicina, alameticina, rotenona, succinato, ADP, TMPD, ascorbato y azida sódica.

RESULTADOS

***“Un campeón no se define por sus victorias,
sino por la cantidad de veces que se recupera cuando cae.”***

Serena Williams

Tenista

4.1 ESTUDIO DE LA CONTRIBUCIÓN DE LA DINÁMICA MITOCONDRIAL Y LA MITOFAGIA EN LA CAPACIDAD TERMOGÉNICA DE RATONES CARENTES DEL RECEPTOR DE IGF-1 EN EL TEJIDO ADIPOSO MARRÓN

Estudios previos de nuestro laboratorio demostraron que la delección de IGF-1R no afectaba al desarrollo del tejido adiposo marrón, principal fuente de disipación de energía durante la exposición al frío, pero disminuía la presencia de adipocitos *beige* en los compartimentos blancos. Además, esto produjo una ligera disfunción termogénica en la primera mitad de la exposición al frío (6 horas) en el modelo animal BATIGF1RKO demostrando así el papel indispensable que presenta este receptor en el mantenimiento de la capacidad termogénica (Viana-Huete *et al.*, 2016). Por otro lado, y generalmente, los depósitos de grasa blanca suelen aumentar de tamaño a lo largo de la vida, tanto en humanos como en animales roedores, lo que sugiere que en edades avanzadas el proceso de *browning* sería más proclive a activarse al existir muchos adipocitos blancos que actuarían como diana del propio proceso (Gesta, Tseng & Kahn, 2007).

Para poder estudiar la contribución de los diferentes procesos mitocondriales en la termogénesis adaptativa de ratones, se utilizó el modelo murino BATIGF1RKO con una edad de 3 meses. Se seleccionó este modelo animal para la búsqueda de posibles mecanismos compensatorios activados por la delección de IGF-1R específicamente en el tejido adiposo marrón, siendo la dinámica mitocondrial el principal objetivo de estudio. Además, a esta edad, de manera general el tejido adiposo marrón es más funcional y los depósitos blancos todavía no han comenzado a agrandarse por el paso del tiempo, lo que limitaría la capacidad de *browning*. Por último, se emplearon machos debido a la influencia que tienen los estrógenos en la regulación del órgano adiposo (Steiner & Berry, 2022).

4.1.1 Estado mitocondrial en el modelo murino BATIGF1RKO en una situación basal

En primer lugar, se evaluó nuevamente el perfil glucídico y adiposidad de dichos animales en condiciones normales. Los datos obtenidos no mostraron ninguna diferencia entre el grupo control y el modelo BATIGF1RKO tanto a nivel de intolerancia a glucosa y sensibilidad a la insulina (**Figura 4.1A y 4.1B**) así como en la cantidad de grasa corporal (**Figura 4.2A y 4.2B**).

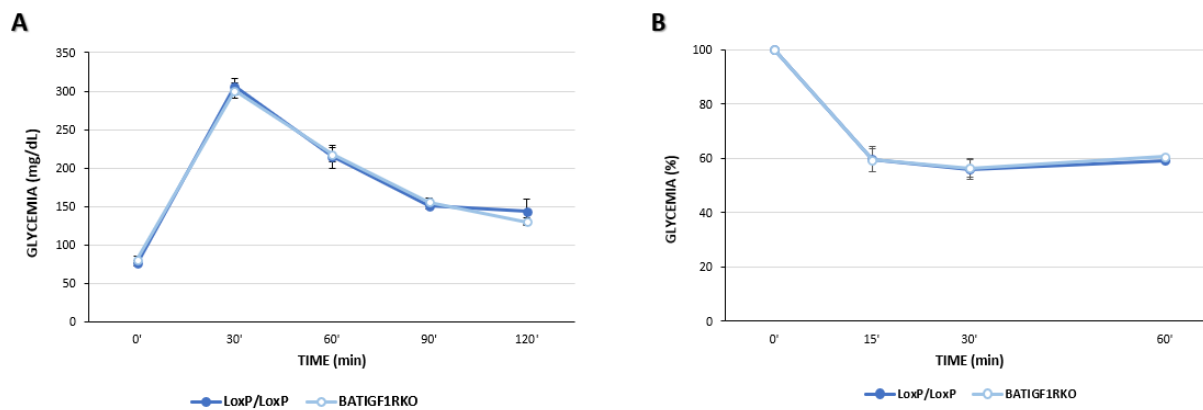


Figura 4.1 Perfil glucídico basal del modelo BATIGF1RKO. Curvas obtenidas de los (A) test de tolerancia a glucosa (GTT) representada en mg/dL de glucosa en sangre y (B) test de tolerancia a insulina (ITT) representada en porcentaje (%) en animales LoxP/LoxP (n=13) y BATIGF1RKO (n=16). Los resultados se expresaron como media \pm SEM.

Sin embargo, cabe destacar que el grupo BATIGF1RKO presentó un peso corporal más bajo pero no significativo cuando se comparaba con el grupo control (**Figura 4.2C**).

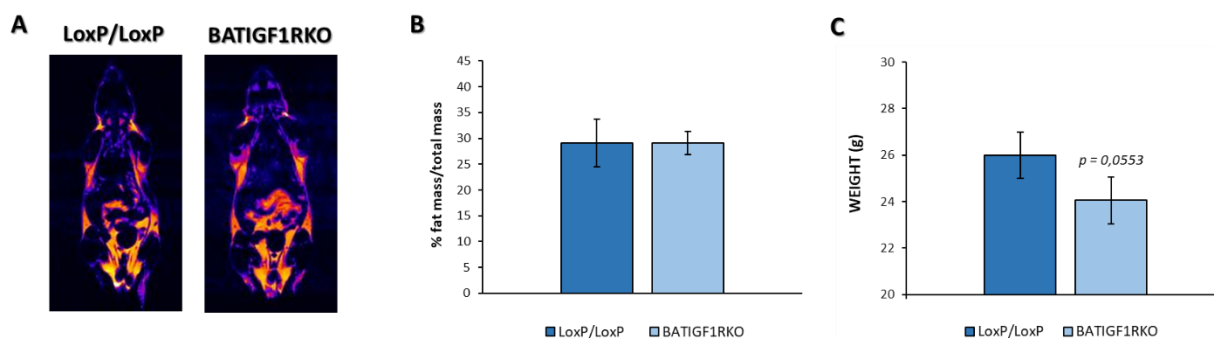


Figura 4.2 Parámetros de adiposidad y peso corporal en el modelo BATIGF1RKO. (A) Imágenes representativas de RMN de animales LoxP/LoxP y BATIGF1RKO de 3 meses de edad y en una situación basal. (B) Cuantificación de las imágenes de RMN representada en porcentaje de masa grasa respecto a la masa total de animales LoxP/LoxP (n=3) y BATIGF1RKO (n=3). (C) Histograma del peso corporal en animales LoxP/LoxP (n=13) y BATIGF1RKO (n=16). Los resultados se expresaron como media \pm SEM.

Tras el sacrificio de los animales, se extrajo el tejido adiposo marrón interescapular (iBAT) junto con cuatro compartimentos del tejido adiposo blanco que se denominaron según su localización: inguinal (iWAT), epididimal o gonadal (eWAT), mesentérico (mWAT) y retroperitoneal (rWAT). Posteriormente, estos tejidos fueron procesados para su estudio proteico relacionado con la dinámica mitocondrial.

Respecto al iBAT, los resultados revelaron una disminución significativa del ratio formado entre las isoformas corta (S-OPA-1) y larga (L-OPA-1) de la proteína de fusión OPA-1 en el grupo carente de IGF-1R comparado con los animales LoxP/LoxP (**Figura 4.3**), lo que indicó un posible incremento de la elongación o fusión mitocondrial debido a que las isoformas largas de OPA-1 se han relacionado previamente con este proceso (Duvezin-Caubet *et al.*, 2006) estando posiblemente asociado con el ligero aumento observado en la expresión de la proteína de fusión MFN-2 en el grupo BATIGF1RKO. Por último, se observó un incremento en la expresión de la proteína HADHA, localizada en la matriz mitocondrial, que sugirió un mayor contenido mitocondrial cuando se comparaba el modelo BATIGF1RKO con el grupo control (**Figura 4.3**).

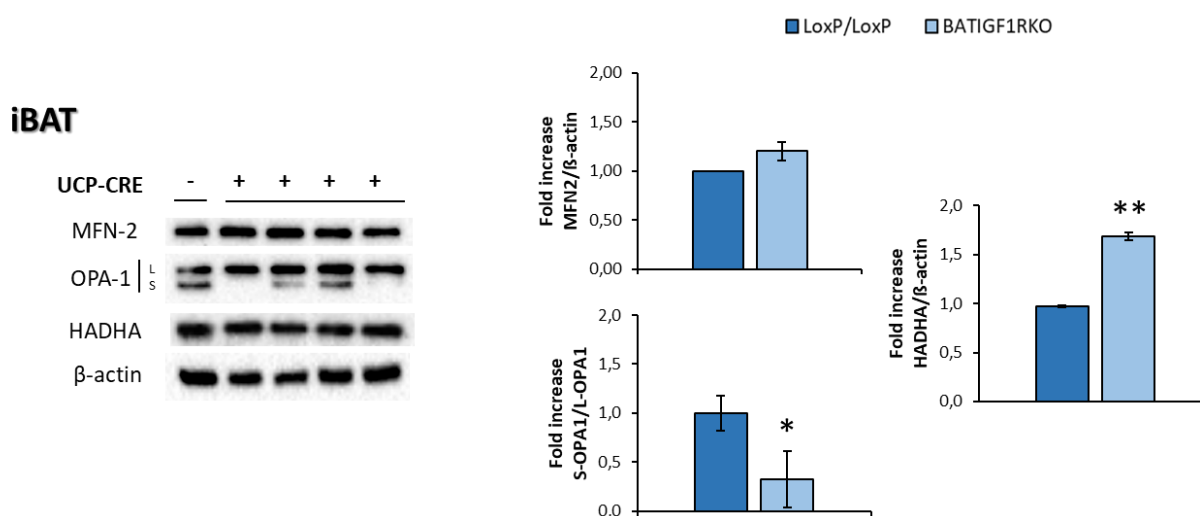
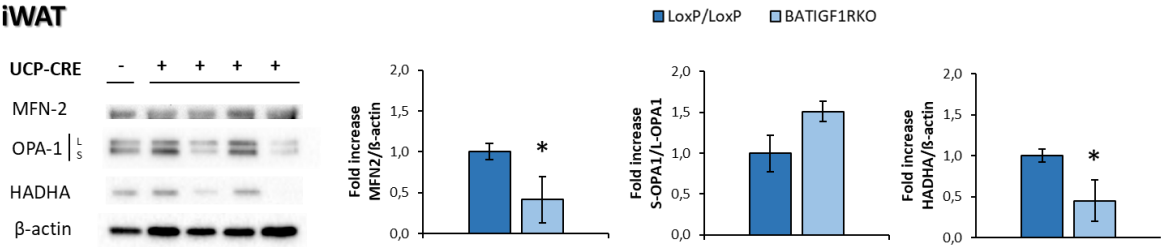


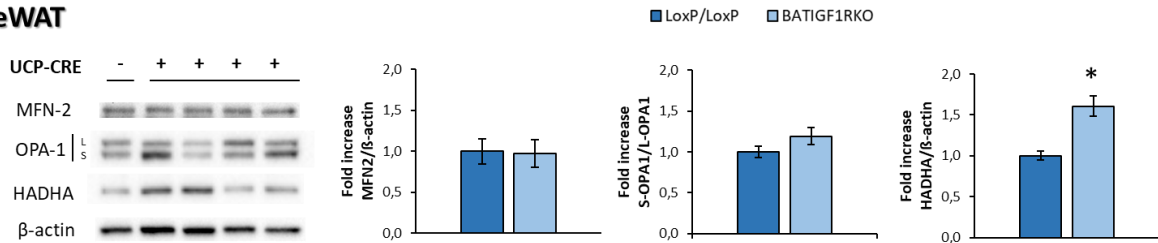
Figura 4.3 Análisis proteico de la dinámica mitocondrial en el iBAT del modelo BATIGF1RKO en una situación basal. Izquierda, inmunoblots representativos en homogeneizado de iBAT en animales LoxP/LoxP (n=2) y BATIGF1RKO (n=7). Derecha, cuantificación de la expresión de las proteínas mitocondriales seleccionadas. Se empleó β -actina como control de carga. Los resultados se expresaron como media \pm SEM. La significación estadística se evaluó por la prueba t-Student de dos colas y muestras desapareadas, y se representó como * = $p < 0,05$ y ** = $p < 0,01$ vs. ratones LoxP/LoxP.

El estudio proteico de los compartimentos de grasa blanca arrojó una disminución de la expresión de la proteína de fusión MFN-2 en el grupo BATIGF1RKO, siendo más significativa en la localización inguinal o iWAT (**Figura 4.4A**). Este resultado junto con el ligero aumento del ratio S-OPA-1/L-OPA-1, que funciona como un indicador de la fisión mitocondrial, podría señalar una predisposición al estado fragmentado en las mitocondrias de dicho compartimento en el modelo murino comparado con el grupo LoxP/LoxP (**Figura 4.4A**). Además, es el único tejido adiposo blanco que presentó un descenso significativo en la expresión de la proteína de contenido mitocondrial HADHA (**Figura 4.4A**). Por otro lado, el análisis de eWAT mostró un incremento significativo de la expresión de esta proteína relacionada con el número mitocondrial (HADHA) (**Figura 4.4B**), y que también pudo observarse como tendencia en los compartimentos rWAT (**Figura 4.4C**) y mWAT (**Figura 4.4D**).

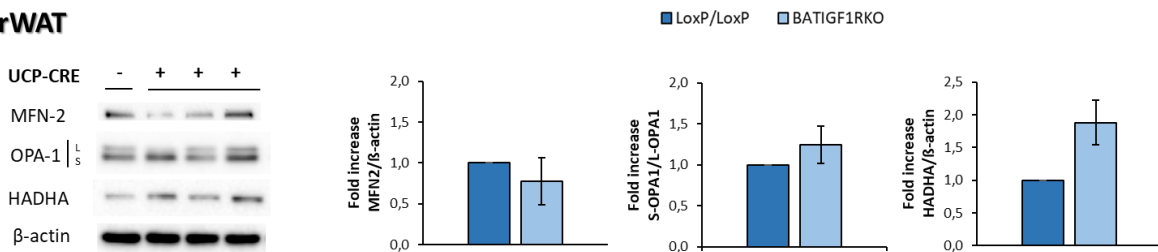
A iWAT



B eWAT



C rWAT



D mWAT

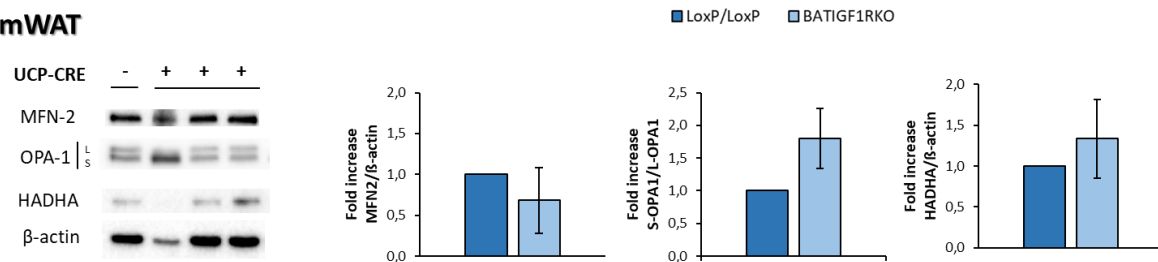


Figura 4.4 Análisis proteico de la dinámica mitocondrial en los compartimentos de WAT del modelo BATIGF1RKO en una situación basal. Izquierda, inmunoblots representativos en homogeneizados de (A) iWAT, (B) eWAT, (C) rWAT y (D) mWAT en ratones control y en el modelo BATIGF1RKO. Derecha, cuantificación de la expresión de las proteínas mitocondriales seleccionadas en (A) iWAT, (B) eWAT, (C) rWAT y (D) mWAT en animales LoxP/LoxP (n=2 en A y B, n=1 en C y D) y BATIGF1RKO (n=7 en A y B, n=3 en C y D). Se empleó β-actina como control de carga. Los resultados se expresaron como media ± SEM. La significación estadística se evaluó por la prueba t-Student de dos colas y muestras desapareadas en (A) y (B), y se representó como * = p < 0,05 vs. ratones LoxP/LoxP.

4.1.2 Capacidad termogénica y estudio proteico en el modelo BATIGF1RKO tras la exposición al frío

Una vez caracterizado el modelo BATIGF1RKO a nivel glucémico, de adiposidad y analizado su estado mitocondrial en el órgano adiposo respecto a la dinámica mitocondrial en una situación basal, se formaron nuevos grupos de animales para su estudio termogénico. Para ello, tras 3 días en termoneutralidad (30°C), se expusieron al frío (4°C) durante 12 horas y, posteriormente, fueron sacrificados

para evaluar la expresión proteica de los mecanismos relacionados con la termogénesis adaptativa.

El análisis de las temperaturas corporales durante la exposición al frío reveló una peor respuesta adaptativa durante las 4 primeras horas del experimento en los ratones *knock-out* comparada con la del grupo control. Sin embargo, pasadas las 5 horas, el modelo BATIGF1RKO consiguió adaptarse termogénicamente utilizando el grupo LoxP/LoxP como referencia e, incluso, presentó una mayor temperatura corporal significativa al final del experimento (Figura 4.5A). Por otro lado, no se encontraron diferencias en el tamaño de los iBAT extraídos entre ambos grupos (Figura 4.5B y 4.5C). Este retraso termogénico observado podría indicar que la capacidad termogénica del modelo BATIGF1RKO no depende exclusivamente del mecanismo primario de la termogénesis adaptativa basado en el desacoplamiento de la mitocondria mediante la acción de UCP-1 y que este grupo animal presentaría un tejido adiposo marrón funcional.

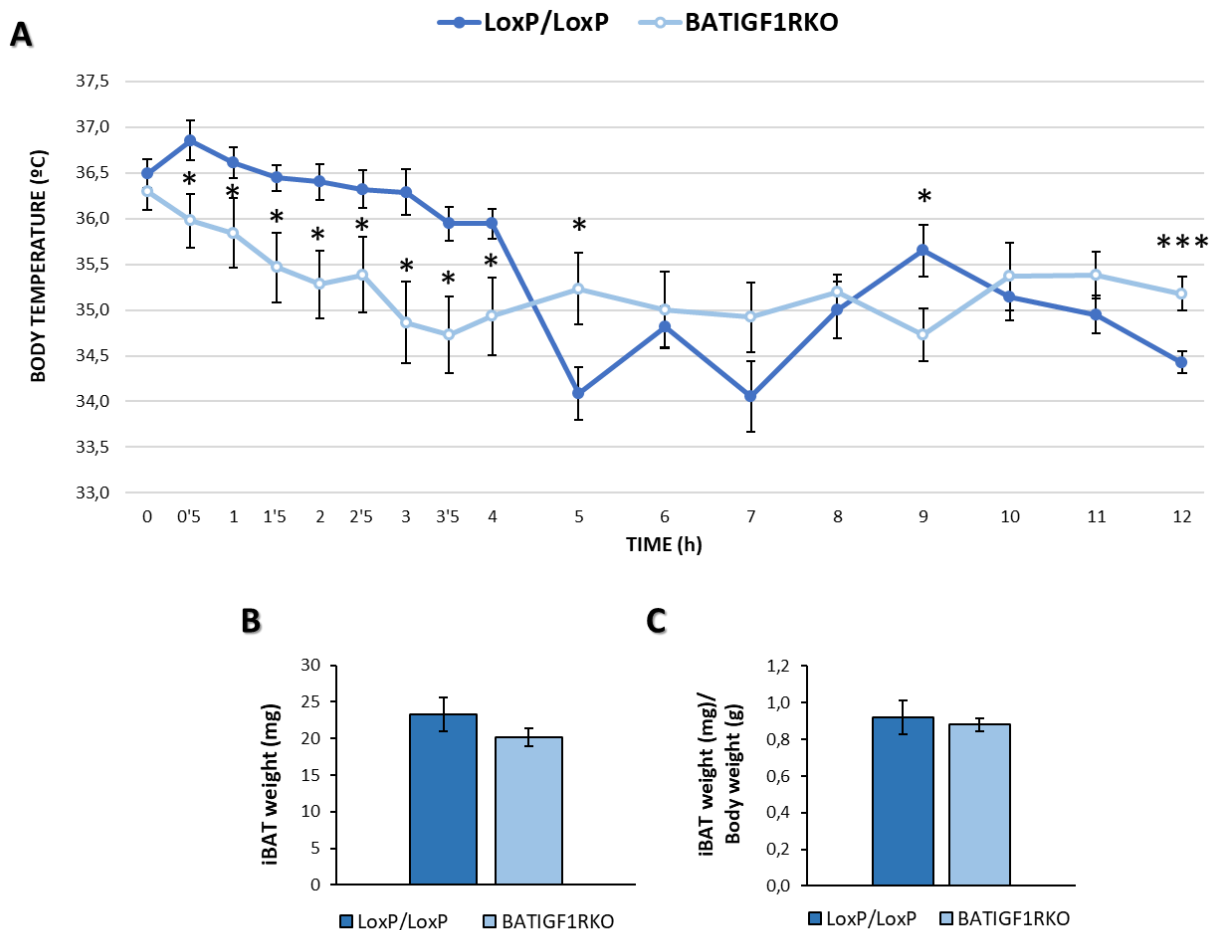


Figura 4.5 Adaptación termogénica del modelo BATIGF1RKO. (A) Representación gráfica de las temperaturas corporales durante las 12 horas de exposición al frío en animales LoxP/LoxP (n=9) y en el modelo BATIGF1RKO (n=10). (B) Histograma del peso en miligramos (mg) del depósito interescapular del tejido adiposo marrón (iBAT) en el grupo control (n=3) y en el grupo *knock-out* (n=8). (C) Representación gráfica del peso de iBAT corregido por el peso corporal. Los resultados se expresaron como media \pm SEM. La significación estadística se evaluó por la prueba t-Student de dos

colas y muestras desapareadas, y se representó como * = $p < 0,05$ y *** = $p < 0,001$ vs. ratones LoxP/LoxP.

Tras el sacrificio de estos animales, se procedió al análisis de la expresión proteica de varios parámetros termogénicos junto con aquellos relacionados con la dinámica mitocondrial. En primer lugar, se estimó el número de adipocitos ubicados en el iBAT mediante el conteo de los núcleos teñidos en la tinción de hematoxilina/eosina. Tras llevar a cabo esta aproximación, el número estimado de células en este tejido no difería entre ambos grupos de animales (**Figura 4.6**).

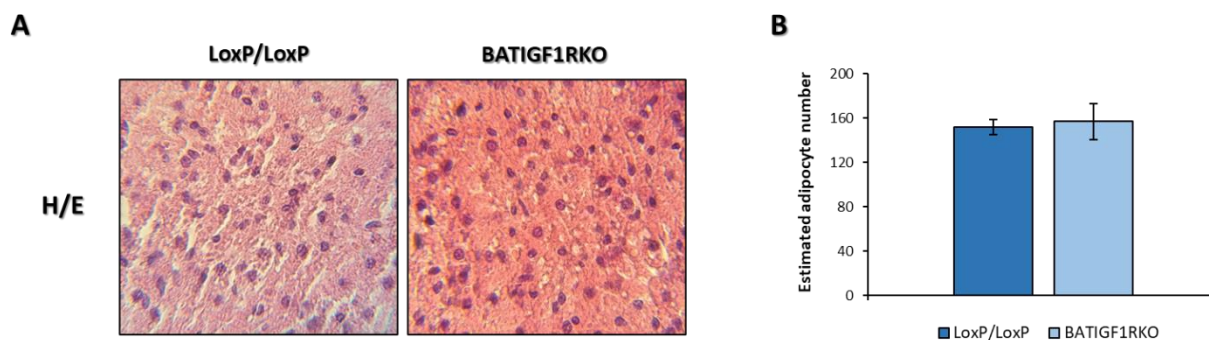


Figura 4.6 Aproximación del número de células en iBAT en el grupo control y en el modelo **BATIGF1RKO** tras la exposición al frío. **(A)** Imágenes representativas de la tinción de hematoxilina/eosina de iBAT de animales control y el modelo *knock-out*. **(B)** Histograma del número estimado de células localizadas en iBAT del grupo control (n=7) y del grupo **BATIGF1RKO** (n=9). Los resultados se expresaron como media \pm SEM.

Al analizar la activación del mecanismo termogénico canónico, UCP1-dependiente, se determinó un aumento de la expresión de UCP-1 en los grupos expuestos al frío cuando se comparaban con los controles de ambos grupos que permanecieron en termoneutralidad (30°C) (**Figura 4.7B**). No obstante, los datos mostraron un ligero incremento en la expresión de esta proteína en el iBAT de los animales **BATIGF1RKO** cuando se comparó con el grupo LoxP/LoxP tras la exposición prolongada al frío (**Figura 4.7D**). Este incremento de la expresión de la proteína desacoplante UCP-1 podría explicar la mejora adaptativa de la termogénesis del modelo **BATIGF1RKO** determinada al final de la exposición al frío y comparada con el grupo control pero no el retraso observado en la adaptación térmica.

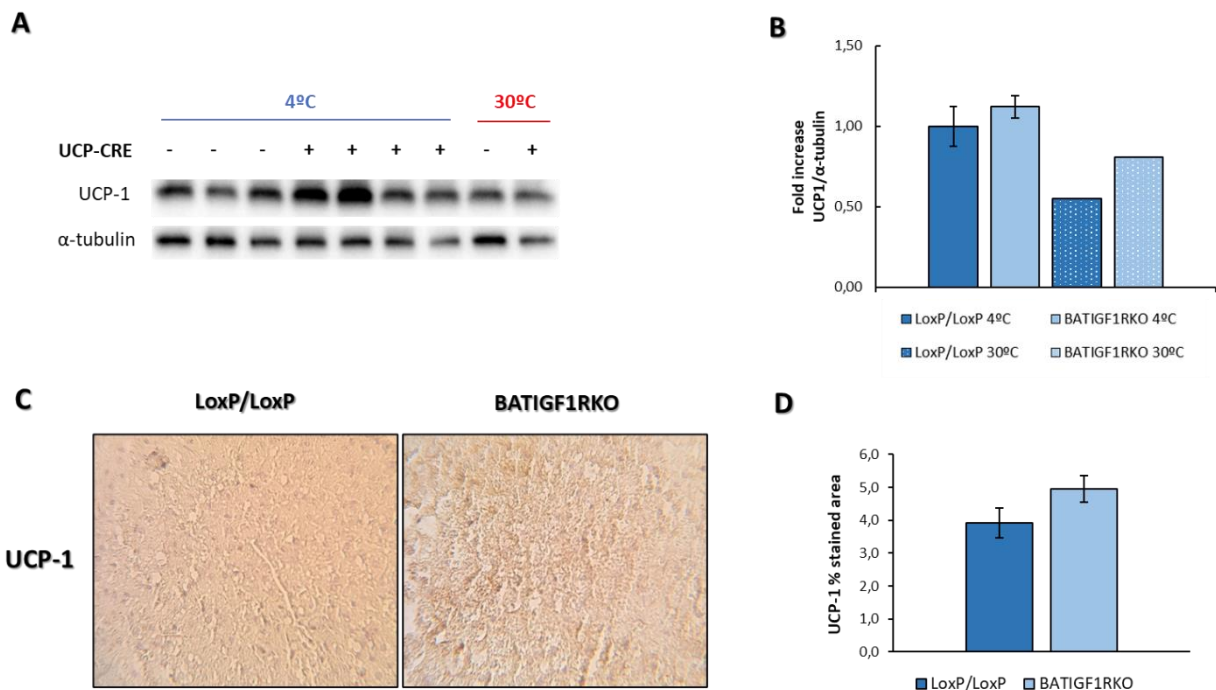


Figura 4.7 Activación de la termogénesis adaptativa mediante el mecanismo canónico de UCP-1 en el modelo BATIGF1RKO tras la exposición al frío. (A) Inmunoblot representativo de UCP-1 en homogeneizados de iBAT en ratones LoxP/LoxP y BATIGF1RKO. (B) Cuantificación de la expresión de UCP-1 en el grupo control expuesto a 4°C (n=7), grupo BATIGF1RKO expuesto a 4°C (n=12), grupo LoxP/LoxP a 30°C (n=1) y grupo BATIGF1RKO a 30°C (n=1). Se empleó α-tubulina como control de carga. (C) Imágenes representativas de inmunohistoquímica de UCP-1 en iBAT del grupo control expuesto al frío y del modelo BATIGF1RKO. (D) Cuantificación de las imágenes de inmunohistoquímica de UCP-1 en animales LoxP/LoxP (n=7) y *knock-out* (n=12). Los resultados se expresaron como media ± SEM. La significación estadística se evaluó por la prueba t-Student de dos colas y muestras desapareadas, y se representó como ** = p < 0,01 vs. ratones LoxP/LoxP 4°C.

Puesto que no se encontraron diferencias en el tamaño y el número de adipocitos de iBAT entre el grupo control y el modelo BATIGF1RKO expuesto al frío, se evaluó el contenido mitocondrial en dicho depósito de grasa parda. El análisis reveló un aumento significativo en la expresión de la proteína de matriz mitocondrial HADHA y una ligera tendencia positiva en la proteína de membrana externa mitocondrial TOMM-20 (Figura 4.8B), que se corroboró con la expresión *in situ* de TOMM-20 en iBAT del modelo BATIGF1RKO (Figura 4.8D). Esto podría apuntar a un alto contenido mitocondrial en el grupo carente de IGF-1R comparado con los animales LoxP/LoxP, que también se asociaría con el aumento observado de UCP-1. Además, estos datos reflejan un incremento de la expresión de TOMM-20 en los grupos expuestos al frío y, debido a su localización en la membrana externa mitocondrial, podría revelar un alto número de mitocondrias en este depósito ante una situación a 4°C. Previamente se ha descrito que el frío activa la biogénesis mitocondrial (Cardanho-Ramos & Morais, 2021), lo que explicaría este aumento en el número mitocondrial.

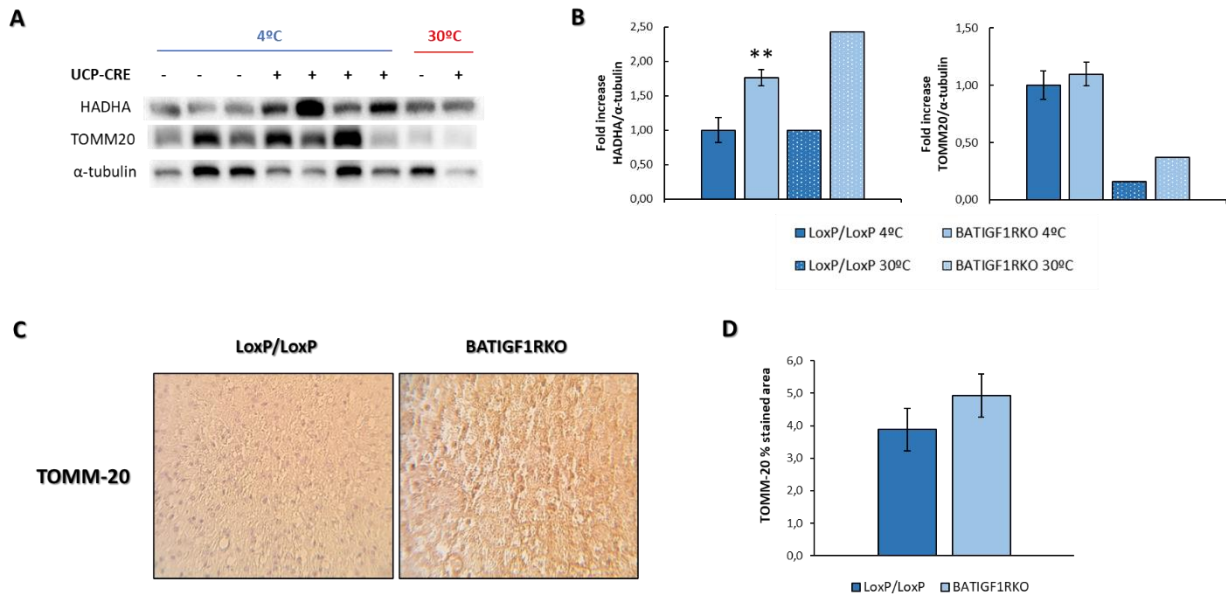


Figura 4.8 Estudio proteico del contenido mitocondrial en el modelo BATIGF1RKO tras la exposición al frío. **(A)** Inmunoblot representativo de HADHA y TOMM-20 en homogeneizados de iBAT en ratones LoxP/LoxP y BATIGF1RKO. **(B)** Cuantificación de la expresión de ambas proteínas en el grupo control expuesto a 4°C (n=8), grupo BATIGF1RKO expuesto a 4°C (n=12), grupo LoxP/LoxP a 30°C (n=1) y grupo BATIGF1RKO a 30°C (n=1). Se empleó β-actina como control de carga. **(C)** Imágenes representativas de inmunohistoquímica de TOMM-20 en iBAT del grupo control y del modelo BATIGF1RKO expuestos al frío. **(D)** Cuantificación de las imágenes de inmunohistoquímica de TOMM-20 en animales LoxP/LoxP (n=7) y *knock-out* (n=9). Los resultados se expresaron como media ± SEM. La significación estadística se evaluó por la prueba t-Student de dos colas y muestras desapareadas, y se representó como ** = p < 0,01 vs. ratones LoxP/LoxP 4°C.

Por último, se evaluó la lipólisis en el tejido adiposo marrón del modelo BATIGF1RKO para vislumbrar la utilización de ácidos grasos en el proceso termogénico. Para ello, se analizó la expresión proteica *in situ* de PLIN-1, una perilipina que forma una monocapa alrededor de las gotas lipídicas e inhibe la acción de las lipasas. La inmunohistoquímica de esta proteína en iBAT reveló una disminución de su expresión en el modelo BATIGF1RKO comparado con el grupo control (**Figura 4.9B**), lo que estaría indicando una activación de la lipólisis de este tejido. Esto se confirmó tras la tinción de Oil Red-O, que mostró una disminución significativa del porcentaje del área teñida, lo que se determinó como un menor contenido lipídico en el grupo *knock-out* comparado con los animales control (**Figura 4.9D**). Todos estos resultados se explicarían por un incremento en la actividad lipolítica en el iBAT del modelo BATIGF1RKO.

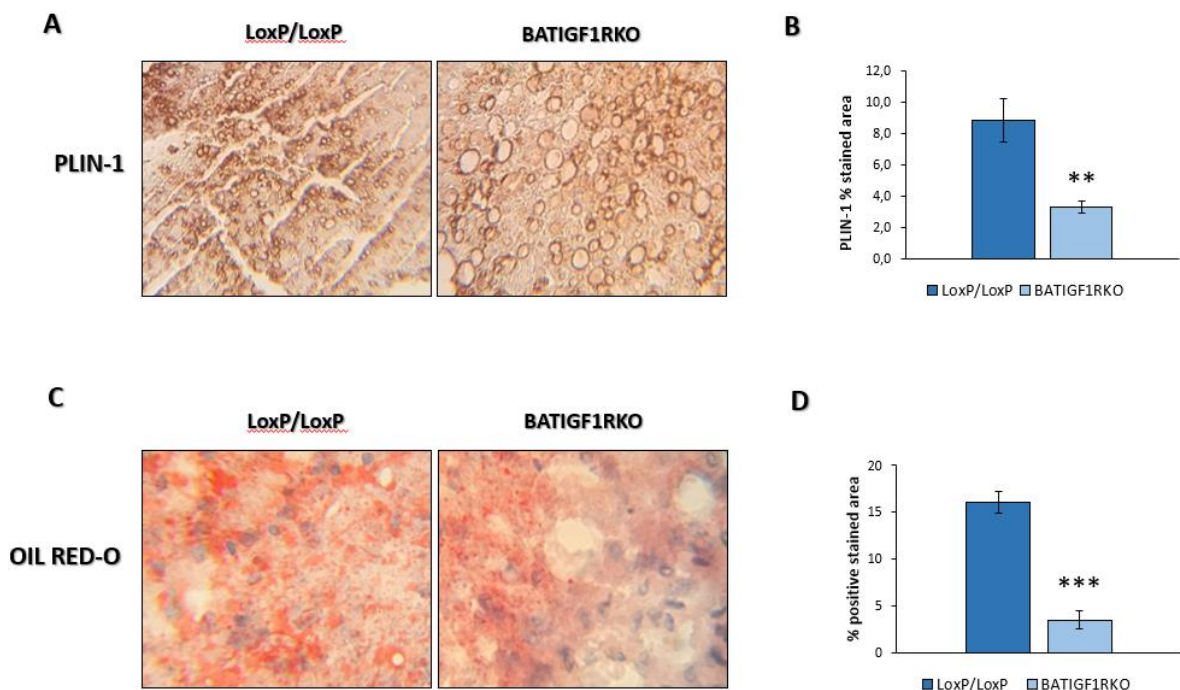


Figura 4.9 Evaluación de la actividad lipolítica en el modelo BATIGF1RKO tras la exposición al frío. (A) Imágenes representativas de la inmunohistoquímica de PLIN-1 en el iBAT de animales control y el grupo BATIGF1RKO. (B) Cuantificación de las imágenes de inmunohistoquímica de PLIN-1 en el grupo control expuesto a 4°C (n=7) y el grupo BATIGF1RKO expuesto a 4°C (n=12). (C) Imágenes representativas de la tinción Oil Red-O, marcaje de lípidos, en iBAT del grupo control expuesto al frío y del modelo BATIGF1RKO. (D) Cuantificación de las imágenes de la tinción de Oil Red-O en animales LoxP/LoxP (n=7) y *knock-out* (n=10). Los resultados se expresaron como media ± SEM. La significación estadística se evaluó por la prueba t-Student de dos colas y muestras desapareadas, y se representó como ** = p < 0,01 y *** = p < 0,001 vs. ratones LoxP/LoxP 4°C.

4.1.3 Análisis del estado y respiración mitocondrial del modelo BATIGF1RKO tras la exposición al frío

Puesto que el objetivo de esta tesis doctoral ha sido evaluar la contribución de la dinámica mitocondrial en la adaptación termogénica de ratones para poder sugerirla como una nueva diana terapéutica contra la obesidad, se analizó el perfil mitocondrial del modelo BATIGF1RKO tras la exposición al frío estudiada en el apartado 4.1.2.

El estudio de la expresión proteica de la dinámica mostró un incremento significativo del ratio formado por p-DRP-1 y DRP-1, indicador de la fisión mitocondrial puesto que esta proteína ubicada en la membrana externa mitocondrial debe ser fosforilada para la activación de este proceso, en los animales BATIGF1RKO comparado con el grupo LoxP/LoxP, ambos expuestos a 4°C (Figura 4.10B). Además, esto se corroboró mediante un marcaje *in situ* de la forma fosforilada de DRP-1 por inmunohistoquímica que determinó un aumento significativo de la expresión de dicha proteína en el grupo carente de IGF-1R a 4°C (Figura 4.10D). Todo ello podría indicar un estado fisionado de las mitocondrias en

el iBAT del modelo BATIGF1RKO comparado con el grupo control tras la exposición al frío.

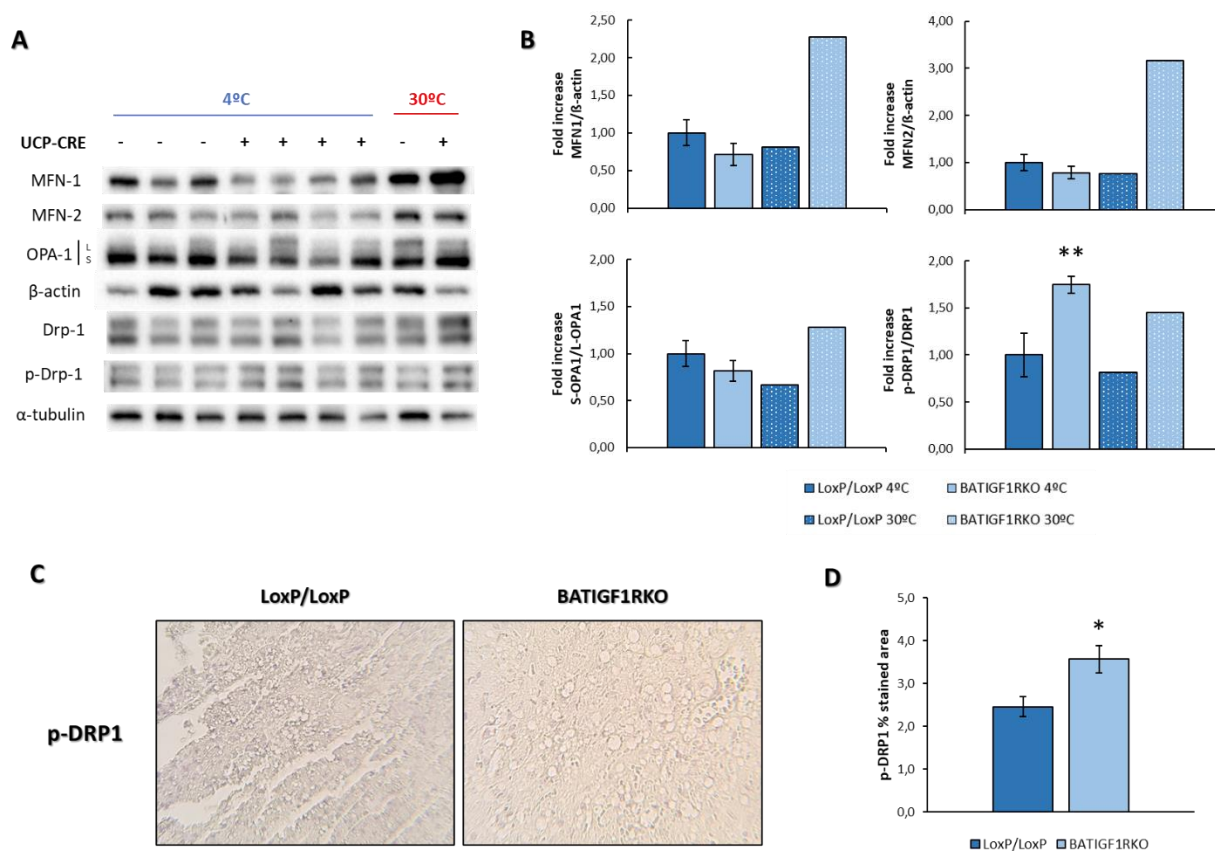


Figura 4.10 Análisis proteico de la dinámica mitocondrial en el modelo BATIGF1RKO tras la exposición al frío. **(A)** Inmunoblot representativo de las proteínas de fusión MFN-1, MFN-2 y OPA-1, y de la proteína de fisión mitocondrial DRP-1 y su forma activada p-DRP-1 en homogeneizados de iBAT en animales LoxP/LoxP y BATIGF1RKO. **(B)** Cuantificación de la expresión de dichas proteínas en el grupo control expuesto a 4°C (n=7), grupo BATIGF1RKO expuesto a 4°C (n=12), grupo LoxP/LoxP a 30°C (n=1) y grupo BATIGF1RKO a 30°C (n=1). Se empleó β-actina y α-tubulina como controles de carga. **(C)** Imágenes representativas de inmunohistoquímica de p-DRP-1 en iBAT del grupo control y del modelo BATIGF1RKO expuestos al frío. **(D)** Cuantificación de las imágenes de inmunohistoquímica de p-DRP-1 en animales LoxP/LoxP (n=7) y *knock-out* (n=12). Los resultados se expresaron como media ± SEM. La significación estadística se evaluó por la prueba t-Student de dos colas y muestras desapareadas, y se representó como * = p < 0,05 y ** = p < 0,01 vs. ratones LoxP/LoxP 4°C.

Por otro lado, la expresión de las proteínas de fusión MFN-1 y MFN-2 no indicó ningún cambio entre los grupos control y BATIGF1RKO (Figura 4.10B). No obstante, en el grupo *knock-out* en termoneutralidad se observó un incremento de la expresión de todas las proteínas involucradas en la dinámica mitocondrial cuando se comparó con los animales control en la misma situación de 30°C (Figura 4.10B) que podría relacionarse con el aumento del contenido mitocondrial descrito en el apartado 4.1.2, Figura 4.8.

Para comprobar el estado fisionado de las mitocondrias advertido durante el análisis proteico, se tomaron imágenes de microscopía electrónica de iBAT del modelo BATIGF1RKO junto con el grupo control que habían sido expuestos al frío

durante 12 horas (**Figura 4.11A**). Gracias a la cuantificación de dichas imágenes, se observó un incremento en el número de mitocondrias así como un descenso del tamaño de estos orgánulos en el grupo carente de IGF-1R cuando se comparaba con los animales LoxP/LoxP (**Figura 4.11B y 4.11C**). Estos resultados indican que las mitocondrias presentaron formas más pequeñas y redondeadas características del estado fisionado en el modelo BATIGF1RKO, que coincide con los datos previamente indicados de aumento en la expresión de p-DRP-1.

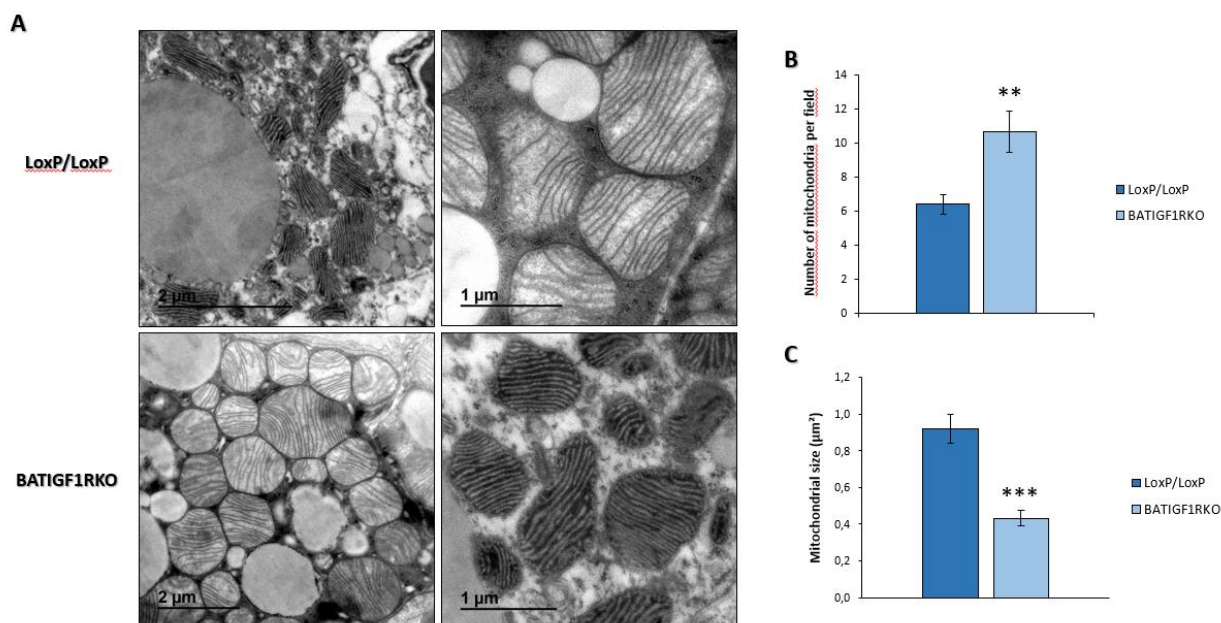


Figura 4.11 Estudio mitocondrial en el modelo BATIGF1RKO tras la exposición al frío. (A) Imágenes representativas de microscopía electrónica tomadas de iBAT pertenecientes al grupo BATIGF1RKO y al grupo control. **(B)** Cuantificación del número de mitocondrias en fotografías de microscopía electrónica del grupo control expuesto a 4°C (n=4) y del grupo BATIGF1RKO expuesto a 4°C (n=4). **(C)** Cuantificación del tamaño mitocondrial en μm² en fotografías de microscopía electrónica del grupo control expuesto a 4°C (n=4) y del grupo BATIGF1RKO expuesto a 4°C (n=4). Los resultados se expresaron como media ± SEM. La significación estadística se evaluó por la prueba t-Student de dos colas y muestras desapareadas, y se representó como ** p < 0,01 y *** p < 0,001 vs. ratones LoxP/LoxP 4°C.

Puesto que existen evidencias de que la plasticidad mitocondrial está asociada a la disponibilidad bioenergética, así como al gasto energético (Liesa & Shirihai, 2013), se evaluó la respiración mitocondrial de mitocondrias aisladas de iBAT en el modelo BATIGF1RKO, así como en el grupo LoxP/LoxP tras 12 horas de exposición al frío.

Los resultados de la respirometría de alta resolución por O2k-Oroboros mostraron un incremento significativo de la respiración basal (**Figura 4.12A**, gráfico izquierdo) que se reveló como una tendencia a la alza tras su corrección por la respiración máxima debido al Complejo IV (**Figura 4.12A**, gráfico derecho), de las mitocondrias aisladas en el modelo BATIGF1RKO comparado con el grupo control. Posteriormente, se añadió succinato como sustrato para activar la respiración del Complejo II de la cadena de transporte de electrones y tras la medida, se inhibió la actividad de UCP-1 mediante la adición del nucleótido de purina ADP. Esta

activación del Complejo II resultó en un aumento significativo de la respiración en el modelo BATIGF1RKO comparado con el grupo control tanto con UCP-1 activa como cuando está inhibida (Figura 4.12B).

Sin embargo, en los animales LoxP/LoxP apareció un aumento significativo de la respiración cuando UCP-1 se encontraba inhibida, lo que cabía esperar puesto que esta proteína desacopla la cadena de transporte de electrones impidiendo la generación de ATP; pero en el grupo *knock-out*, se observó lo contrario, un ligero descenso de la respiración cuando UCP-1 estaba inhibida que podría ser explicado por la baja *n* de este experimento (Figura 4.12B, gráfico *derecho*). A continuación, se evaluó la capacidad máxima respiratoria del modelo BATIGF1RKO tras la exposición al frío cuyos datos determinaron una mayor capacidad en este modelo comparado con el grupo control (Figura 4.12C).

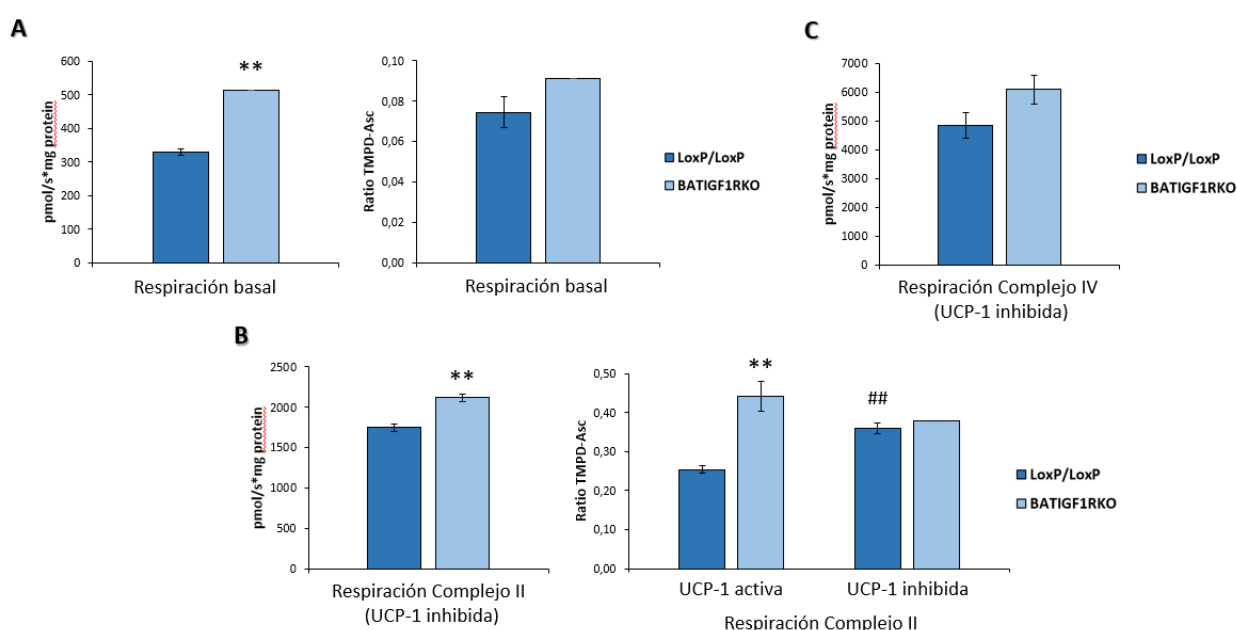


Figura 4.12 Respiración mitocondrial del modelo BATIGF1RKO tras la exposición al frío. **(A)** Histogramas de respiración basal en pmol/s corregidos por los mg de proteína obtenidos de la cantidad mitocondrial (izquierda) y normalizado con respecto a la respiración máxima (derecha) en ratones LoxP/LoxP (n=3) y animales BATIGF1RKO (n=2). **(B)** Representación gráfica de la respiración total por los Complejo I y II de CTE en pmol/s corregidos por los mg de proteína obtenidos de la cantidad mitocondrial (izquierda) y normalizado con respecto a la respiración máxima (derecha) en ratones LoxP/LoxP (n=2) y animales BATIGF1RKO (n=3). **(C)** Histograma de respiración máxima obtenida tras la activación completa del Complejo IV de CTE en el grupo control (n=3) y en el modelo BATIGF1RKO (n=3). Los resultados se expresaron como media \pm SEM. La significación estadística se evaluó por la prueba t-Student de dos colas y muestras desapareadas, y se representó como ** $p < 0,01$ vs. ratones LoxP/LoxP 4°C y ## $p < 0,01$ vs. Ratones LoxP/LoxP 4°C UCP-1 activa.

4.1.4 Estudio del mecanismo de control mitocondrial mitofagia en el modelo BATIGF1RKO tras la exposición al frío

Estudios previos han demostrado que existe una relación entre la mitofagia y la dinámica mitocondrial (Twig *et al.*, 2008), así como entre este mecanismo de

control de calidad y la adaptación termogénica de ratones (Wikstrom *et al.*, 2014). Por ello, se analizó la expresión proteica de este proceso selectivo de autofagia para determinar su grado de activación tras la exposición al frío en el modelo BATIGF1RKO. Pese a no encontrar ninguna diferencia significativa entre los grupos control y BATIGF1RKO a 4°C en cuanto a la expresión de las proteínas involucradas en la vía mitofágica PINK-1/Parkina, se observó un aumento de la expresión de Parkina en los animales expuestos al frío comparado con aquellos mantenidos en termoneutralidad (**Figura 4.13B**). Esto podría indicar una activación de la mitofagia promovida por la señalización β -adrenérgica del frío.

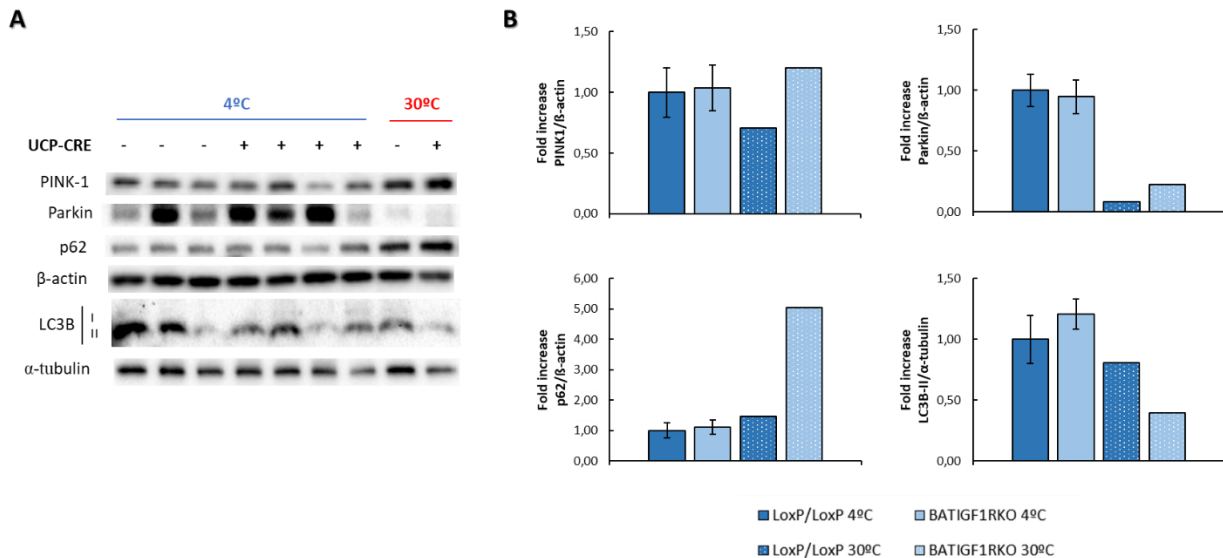


Figura 4.13 Análisis proteico de la mitofagia en el modelo BATIGF1RKO tras la exposición al frío. (A) Inmunoblot representativo de las proteínas implicadas en la vía mitofágica PINK-1/Parkina y en la fase final de la autofagia (p62 y LC3B-II) en homogeneizados de iBAT en ratones LoxP/LoxP y BATIGF1RKO. (B) Cuantificación de la expresión de dichas proteínas en el grupo control expuesto a 4°C (n=7), grupo BATIGF1RKO expuesto a 4°C (n=12), grupo LoxP/LoxP a 30°C (n=1) y grupo BATIGF1RKO a 30°C (n=1). Se empleó β -actina y α -tubulina como controles de carga. Los resultados se expresaron como media \pm SEM.

Para dilucidar el papel de la mitofagia en la termogénesis adaptativa del modelo murino BATIGF1RKO, se administraron intraperitonealmente 30 mg/kg/12 horas de cloroquina (CQ) durante 3 días en animales control y BATIGF1RKO de 3 meses de edad que posteriormente fueron expuestos al frío (4°C) o mantenidos en termoneutralidad (30°C). Como control se utilizó suero salino en la misma dosis. La cloroquina es un compuesto capaz de penetrar selectivamente dentro de los lisosomas, aumentando su pH interior, lo que conduce a una inhibición de la fusión entre los lisosomas y los autofagosomas, bloqueando el flujo autofágico e impidiendo la degradación proteica lisosomal.

En cuanto a la adaptación termogénica, la curva de frío mostró una ligera disminución de temperaturas en el grupo control tratado con cloroquina mientras que los ratones carentes de IGF-1R presentaron un comportamiento similar independientemente de la administración de la cloroquina (**Figura 4.14A**). El análisis proteico indicó una ligera disminución de la expresión de UCP-1, así como

de la proteína de contenido mitocondrial HADHA, en el modelo BATIGF1RKO expuesto al frío tratado con cloroquina comparado con los ratones sin tratar (Figura 4.14C). Además, se observó un ligero aumento de dichas expresiones en los animales expuestos al frío comparado con aquellos que estuvieron en termoneutralidad. No obstante, en el caso del grupo control mantenido en termoneutralidad sin cloroquina sugirió un incremento en la expresión de dichas proteínas al compararse con el resto de los animales en termoneutralidad y se identificó una pequeña disminución en la expresión de UCP-1 y HADHA en los animales LoxP/LoxP tratados con cloroquina a 30°C comparado con este grupo control en termoneutralidad (Figura 4.14C).

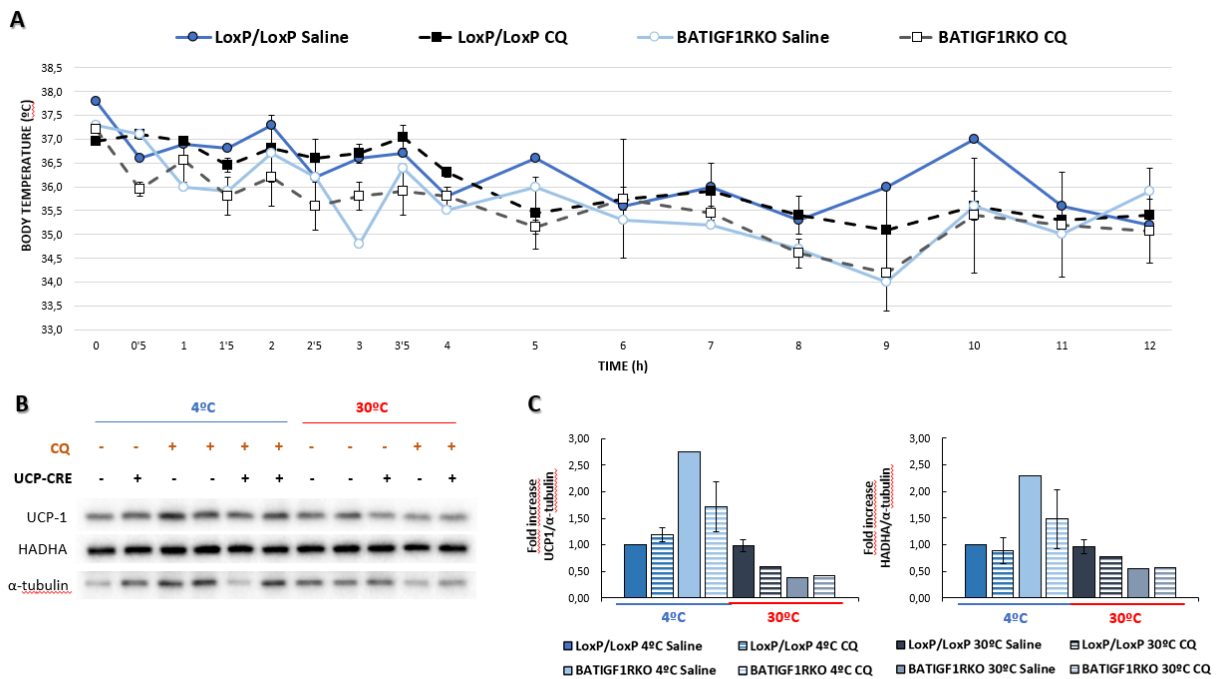


Figura 4.14 Estudio del papel de la mitofagia en la termogénesis adaptativa del modelo BATIGF1RKO. (A) Representación gráfica de las temperaturas corporales durante las 12 horas de exposición al frío en animales LoxP/LoxP sin tratar (n=1), LoxP/LoxP tratados con 30mg/kg/12 horas de cloroquina (CQ) durante 3 días (n=2), en el modelo BATIGF1RKO sin tratar (n=1) y BATIGF1RKO tratados con 30mg/kg/12 horas de cloroquina (CQ) durante 3 días (n=2). **(B)** Inmunoblot representativo de UCP-1 y HADHA en homogeneizados de iBAT de ratones LoxP/LoxP y BATIGF1RKO sin tratar y tratados con 30mg/kg/12 horas de cloroquina (CQ) durante 3 días, expuestos al frío o mantenidos en termoneutralidad. **(C)** Cuantificación de la expresión de UCP-1 y HADHA en el grupo control sin tratar (n=1), tratado con 30mg/kg/12 horas de cloroquina (CQ) durante 3 días (n=2), en el grupo BATIGF1RKO sin tratar (n=1) y tratado con 30mg/kg/12 horas de cloroquina (CQ) durante 3 días (n=2). Se empleó α-tubulina como control de carga. Los resultados se expresaron como media ± SEM.

Asimismo, se examinó la dinámica mitocondrial en este experimento con cloroquina para esclarecer cómo afecta la mitofagia al estado mitocondrial. Los resultados presentaron un posible incremento en la expresión de las proteínas de fusión MFN-1 y MFN-2 en el grupo LoxP/LoxP tratado con cloroquina y expuesto al frío comparado con su grupo control (sin tratar y 4°C), al igual que en los grupos complementarios del modelo BATIGF1RKO (Figura 4.15B). Sin embargo, el ratio S-OPA-1/L-OPA-1, que suele indicar un estado fisionado, se observó incrementado

en los animales tratados con cloroquina al compararlos con sus grupos controles, tanto en los animales LoxP/LoxP como BATIGF1RKO (**Figura 4.15B**). Además, se observó una notable disminución del ratio de fisión p-DRP1/DRP1 en los mismos ratones tratados con cloroquina y expuestos al frío (**Figura 4.15B**). Todo ello, y considerando OPA-1 como una proteína de fusión, podría sugerir un estado fusionado de las mitocondrias en los grupos tratados con cloroquina y expuestos al frío.

De manera similar a lo que ocurriría con la expresión de UCP-1 y HADHA, el grupo LoxP/LoxP sin tratar y mantenido en termoneutralidad mostró un posible incremento en la expresión de las proteínas MFN-1 y MFN-2, así como en el ratio S-OPA-1/L-OPA-1, comparado con el grupo tratado con cloroquina y con el modelo BATIGF1RKO sin tratar, ambos en termoneutralidad (**Figura 4.15B**).

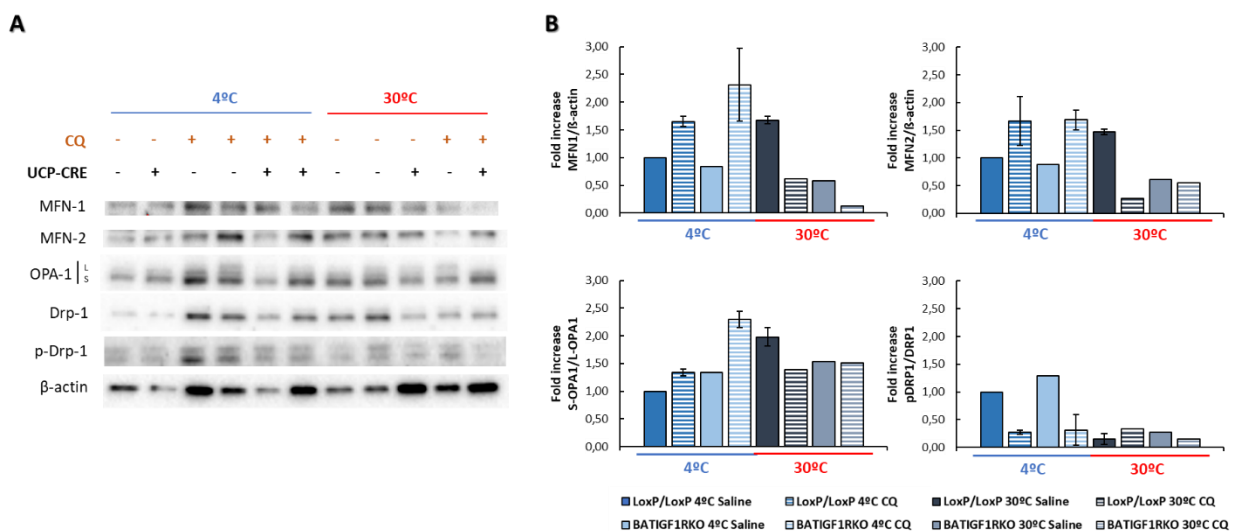


Figura 4.15 Análisis proteico de la dinámica mitocondrial en el modelo BATIGF1RKO tras el tratamiento con cloroquina (CQ) y después de la exposición al frío o de la situación en termoneutralidad. **(A)** Inmunoblot representativo de las proteínas de fusión MFN-1, MFN-2 y OPA-1, y de la proteína de fisión mitocondrial DRP-1 y su forma activada p-DRP-1 en homogeneizados de iBAT en animales LoxP/LoxP sin tratar (n=1), LoxP/LoxP tratados con 30mg/kg/12 horas de cloroquina (CQ) durante 3 días (n=2), en el modelo BATIGF1RKO sin tratar (n=1) y BATIGF1RKO tratados con 30mg/kg/12 horas de cloroquina (CQ) durante 3 días (n=2). **(B)** Cuantificación de la expresión de dichas proteínas en LoxP/LoxP sin tratar (n=1), LoxP/LoxP tratados con 30mg/kg/12 horas de cloroquina (CQ) durante 3 días (n=2), en el modelo BATIGF1RKO sin tratar (n=1) y BATIGF1RKO tratados con 30mg/kg/12 horas de cloroquina (CQ) durante 3 días (n=2). Se empleó β-actina como control de carga. Los resultados se expresaron como media ± SEM.

Por último, se evaluó la expresión proteica de diferentes marcadores de mitofagia. En general, el análisis mostró una posible activación de la mitofagia debido a la exposición al frío puesto que se observó un incremento de la expresión de PINK-1, Parkina y la forma lipidada de LC3B (LC3B-II) en los grupos expuestos al frío comparados con aquellos mantenidos a 30°C (**Figura 4.16B**). Además, el tratamiento con cloroquina aumentó los niveles de expresión de estos marcadores mitofágicos en los ratones expuestos al frío comparados con su grupo control (**Figura 4.16B**), lo que podría indicar una activación de este mecanismo de control

de calidad durante la exposición al frío para poder renovar las mitocondrias dañadas y mantener un pool sano de las mismas.

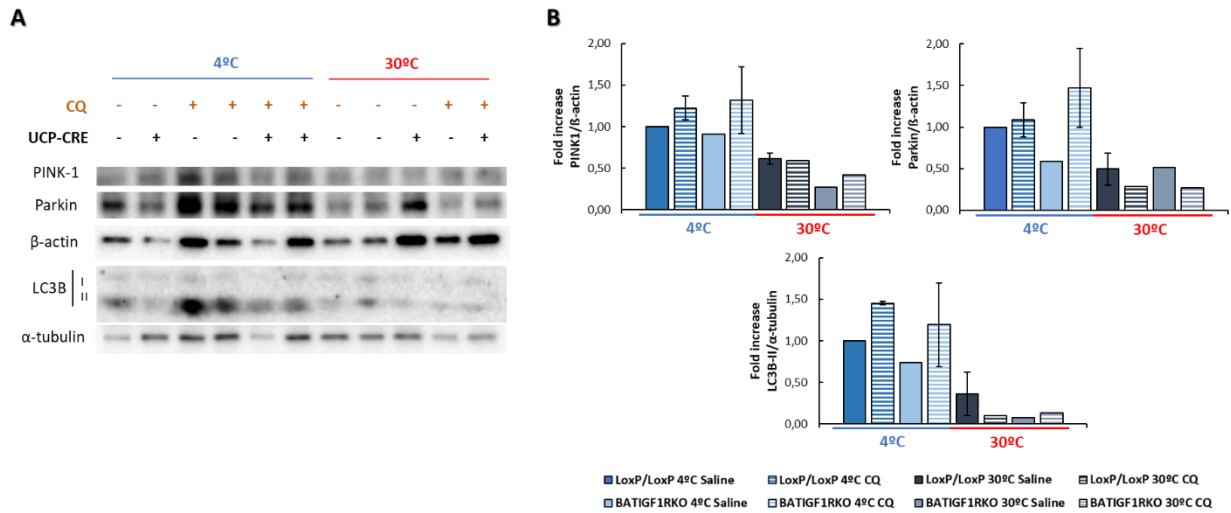


Figura 4.16 Análisis proteico de la mitofagia en el modelo BATIGF1RKO tras la exposición al frío. (A) Inmunoblot representativo de las proteínas implicadas en la vía mitofágica PINK-1/Parkina y en la fase final de la autofagia (LC3B-II) en homogeneizados de iBAT en animales LoxP/LoxP sin tratar (n=1), LoxP/LoxP tratados con 30mg/kg/12 horas de cloroquina (CQ) durante 3 días (n=2), en el modelo BATIGF1RKO sin tratar (n=1) y BATIGF1RKO tratados con 30mg/kg/12 horas de cloroquina (CQ) durante 3 días (n=2). (B) Cuantificación de la expresión de dichas proteínas en el grupo control sin tratar (n=1), tratados con 30mg/kg/12 horas de cloroquina (CQ) durante 3 días (n=2), en el modelo BATIGF1RKO sin tratar (n=1) y tratados con 30mg/kg/12 horas de cloroquina (CQ) durante 3 días (n=2). Se empleó β-actina y α-tubulina como controles de carga. Los resultados se expresaron como media ± SEM.

4.1.5 Proceso de *browning* o marronización en los compartimentos de tejido adiposo blanco en el modelo BATIGF1RKO tras la exposición al frío

En los últimos años, gracias a los estudios realizados sobre nuevos mecanismos de generación de calor, se ha demostrado que la expresión de UCP-1 en los adipocitos blancos no es necesaria para ser considerados células *beige* (Kazak *et al.*, 2015), lo que quiere decir que existen adipocitos de esta clase denominados UCP-1(-). Asimismo, puesto que el proceso de *browning* implica una remodelación del tejido adiposo blanco, es lógico pensar que la mitocondria juega un papel fundamental en esta plasticidad.

Por ello, una vez comprobada la contribución de la dinámica mitocondrial en la función termogénica del tejido adiposo marrón en el modelo de ratón BATIGF1RKO, se evaluó el grado de *browning* en los diferentes compartimentos adiposos blancos (iWAT, eWAT, mWAT y rWAT) para valorar la relación de este proceso con la plasticidad mitocondrial.

Primero, se analizó la región inguinal del tejido adiposo blanco (iWAT) ya que es conocida por ser el compartimento blanco con una mayor capacidad de marronización debido a la inducción de la expresión de UCP-1 tras un estímulo β -adrenérgico como es el frío (Sakers *et al.*, 2022). Como cabía esperar, la expresión de esta proteína desacoplante se determinó cómo variaba en los diferentes ratones expuestos al frío, así como en los grupos que se encontraban en termoneutralidad (**Figura 4.17A**), lo que demostró la heterogeneidad del proceso UCP-1+ *browning* en el tejido adiposo blanco. Además, se evaluó el contenido mitocondrial en este compartimento tras la activación de la termogénesis que mostró una ligera disminución en la expresión de HADHA en el modelo BATIGF1RKO a 4°C comparado con su grupo control en frío (**Figura 4.17C**). Esta disminución se correlaciona con los datos obtenidos de iWAT del ratón *knock-out* en la situación basal que fueron mostrados en el **apartado 4.1.1, Figura 4.4A**, pudiendo indicar así un menor contenido mitocondrial global en este depósito de grasa blanca en el modelo BATIGF1RKO. Asimismo, se advirtió un descenso de dicha expresión cuando se compararon los grupos a 4°C con aquellos a 30°C (**Figura 4.17C**).

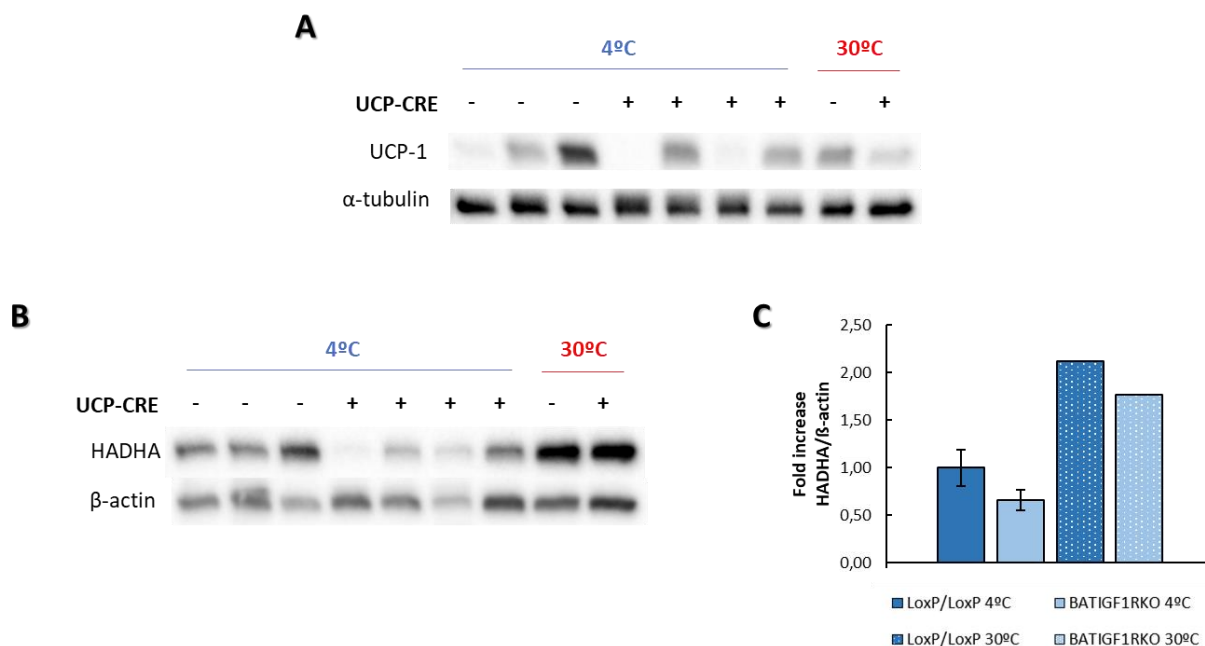


Figura 4.17 Estudio proteico de la activación termogénica y de contenido mitocondrial en iWAT del modelo BATIGF1RKO tras la exposición al frío. (A) Inmunoblot representativo de UCP-1 en homogeneizados de iWAT en ratones LoxP/LoxP y BATIGF1RKO. (B) Inmunoblot representativo de HADHA en homogeneizados de iWAT en ratones LoxP/LoxP y BATIGF1RKO. (C) Cuantificación de la expresión de HADHA en el grupo control expuesto a 4°C (n=3), grupo BATIGF1RKO expuesto a 4°C (n=4), grupo LoxP/LoxP a 30°C (n=1) y grupo BATIGF1RKO a 30°C (n=1). Se empleó α-tubulina y β-actina como controles de carga. Los resultados se expresaron como media ± SEM.

A continuación, se valoró el estado mitocondrial a través del análisis proteico de los parámetros de dinámica en este mismo compartimento. Los resultados mostraron un ligero descenso en la expresión de las proteínas de fusión MFN-1, MFN-2 y OPA-1 en el iWAT perteneciente al modelo BATIGF1RKO cuando fue comparado con el grupo control tras la exposición al frío (Figura 4.18B), lo que avalaría la reducción del contenido mitocondrial propuesta por la disminución de la expresión de HADHA (Figura 4.17C). Además, se determinó una disminución significativa en el ratio de fisión p-DRP-1/DRP-1 en el grupo carente de IGF-1R a 4°C comparado con su control sugiriendo una forma más fusionada de las mitocondrias en iWAT de este modelo de ratón (Figura 4.18B).

Por último, se estudió el grado de activación del mecanismo de eliminación mitocondrial por la vía PINK-1/Parkina en el iWAT del modelo BATIGF1RKO a 4°C. El análisis proteico determinó un incremento significativo en la expresión de Parkina y un ligero aumento en PINK-1 en el grupo *knock-out* comparado con los animales LoxP/LoxP (Figura 4.18D). Esto podría indicar una activación de la mitofagia acrecentada en iWAT del modelo BATIGF1RKO tras la exposición al frío, hecho que sucede también al comparar los grupos a 4°C y a 30°C señalando el frío como estímulo de la mitofagia.

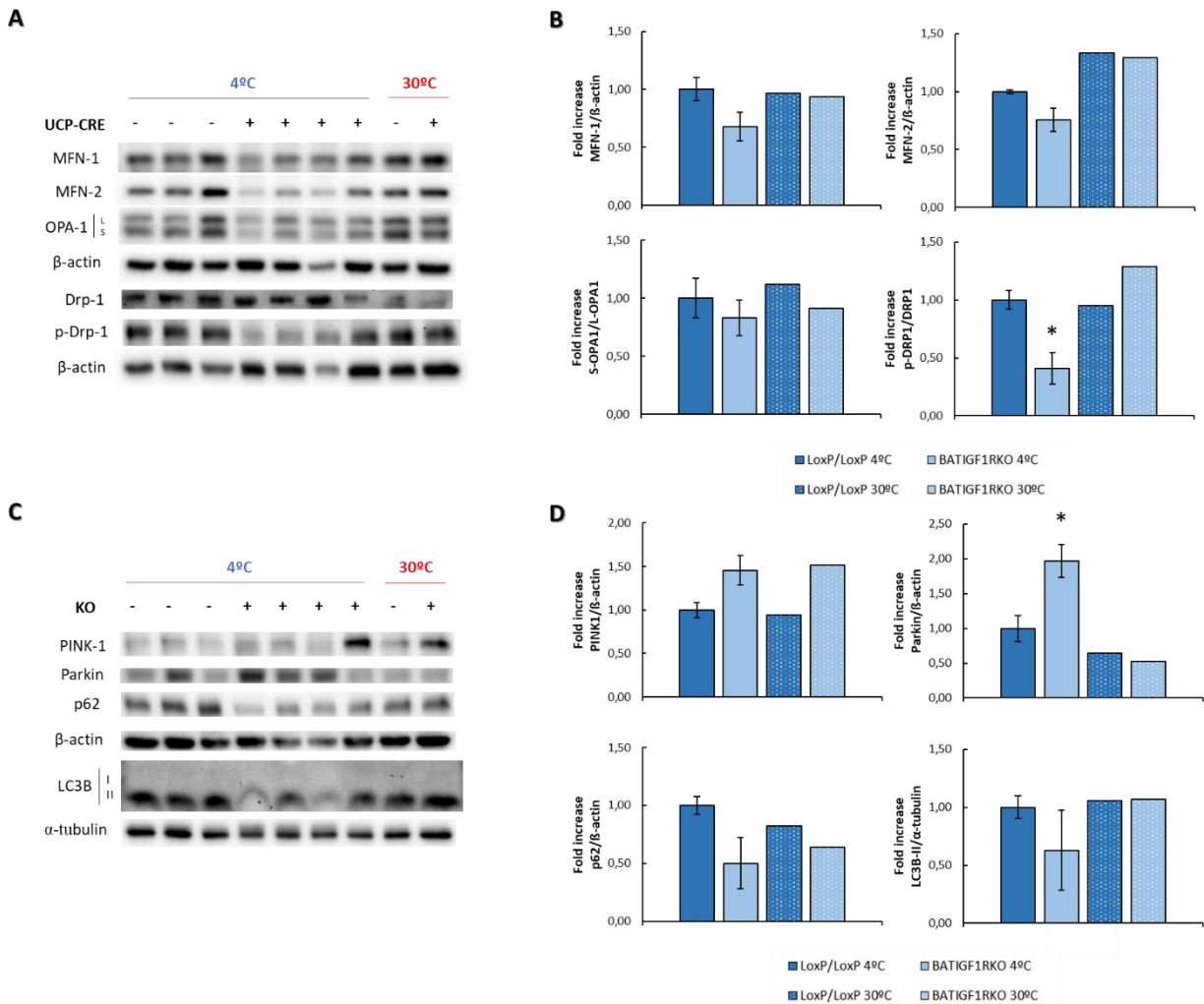


Figura 4.18 Estudio proteico de la dinámica mitocondrial y mitofagia en iWAT del modelo BATIGF1RKO tras la exposición al frío. **(A)** Inmunoblot representativo de proteínas de dinámica mitocondrial en homogeneizados de iWAT en ratones LoxP/LoxP y BATIGF1RKO. **(B)** Cuantificación de la expresión de dichas proteínas en el grupo control expuesto a 4°C (n=3), grupo BATIGF1RKO expuesto a 4°C (n=4), grupo LoxP/LoxP a 30°C (n=1) y grupo BATIGF1RKO a 30°C (n=1). **(C)** Inmunoblot representativo de proteínas involucradas en la mitofagia en homogeneizados de iWAT en ratones LoxP/LoxP y BATIGF1RKO. **(D)** Cuantificación de la expresión de dichas proteínas en el grupo control expuesto a 4°C (n=3), grupo BATIGF1RKO expuesto a 4°C (n=4), grupo LoxP/LoxP a 30°C (n=1) y grupo BATIGF1RKO a 30°C (n=1). Se empleó β-actina y α-tubulina como controles de carga. La significación estadística se evaluó por la prueba t-Student de dos colas y muestras desapareadas, y se representó como * p < 0,05 vs. ratones LoxP/LoxP 4°C.

Respecto al compartimento epididimal de grasa blanca (eWAT), descrito en la bibliografía como un tejido con poca capacidad de *beiging* (Rosen & Spiegelman, 2014), no se detectaron niveles de expresión de UCP-1 en ambos grupos expuestos al frío ni en aquellos mantenidos en termoneutralidad (Figura 4.19A). Al igual que en iWAT, se evaluó el contenido mitocondrial que no reveló cambios significativos en la expresión de HADHA (Figura 4.19C), posiblemente indicando la misma cantidad de estos orgánulos en eWAT del modelo BATIGF1RKO.

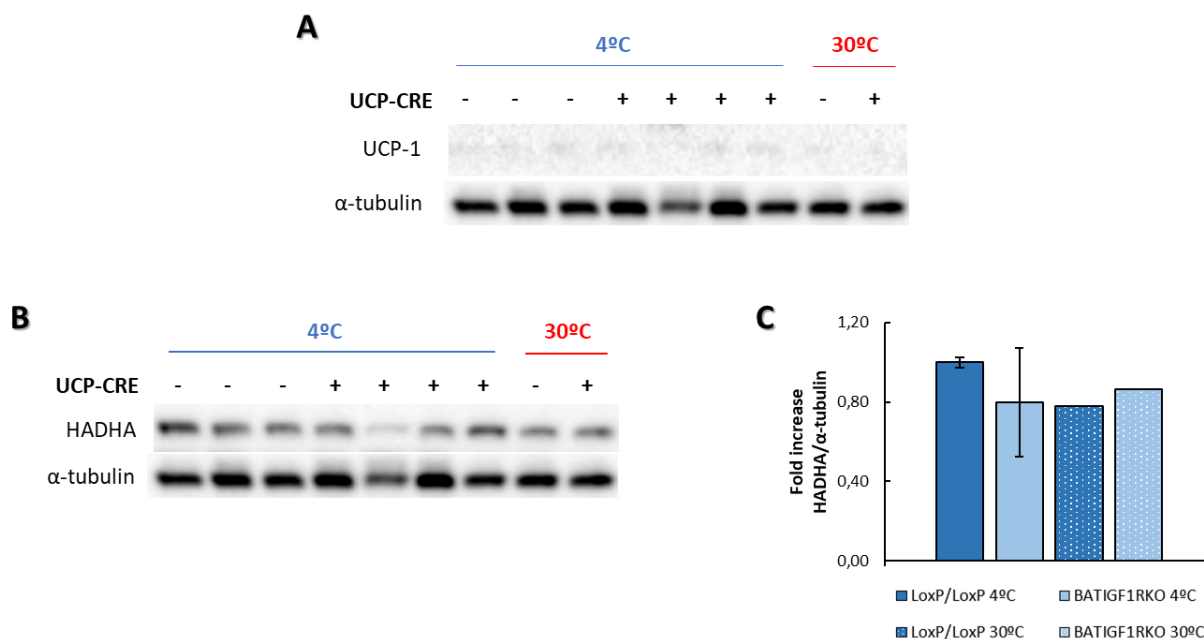


Figura 4.19 Estudio proteico de la activación termogénica y de contenido mitocondrial en eWAT del modelo BATIGF1RKO tras la exposición al frío. (A) Inmunoblot representativo de UCP-1 en homogeneizados de eWAT en ratones LoxP/LoxP y BATIGF1RKO. **(B)** Inmunoblot representativo de HADHA en homogeneizados de eWAT en ratones LoxP/LoxP y BATIGF1RKO. **(C)** Cuantificación de la expresión de HADHA en el grupo control expuesto a 4°C (n=2), grupo BATIGF1RKO expuesto a 4°C (n=4), grupo LoxP/LoxP a 30°C (n=1) y grupo BATIGF1RKO a 30°C (n=1). Se empleó α-tubulina como control de carga. Los resultados se expresaron como media ± SEM.

El estudio del estado mitocondrial mostró un aumento significativo de la expresión de la proteína de fusión MFN-1, pero no de MFN-2, al igual que se observó dicho incremento en el ratio de fisión p-DRP-1/DRP-1 en el grupo BATIGF1RKO expuesto al frío comparado con su grupo control (Figura 4.20B). Este paradigma podría explicarse por la existencia de un balance en la dinámica mitocondrial en el que las mitocondrias poseerían formas mixtas entre fusionadas y fisionadas en el modelo murino BATIGF1RKO. Además, se determinó un aumento muy significativo en la expresión de la proteína mitofágica Parkina en los ratones carentes de IGF-1R comparado con los animales LoxP/LoxP a 4°C (Figura 4.20D), lo que podría indicar el inicio de la activación de este mecanismo de control de calidad mitocondrial que apoyarían el balance sugerido previamente.

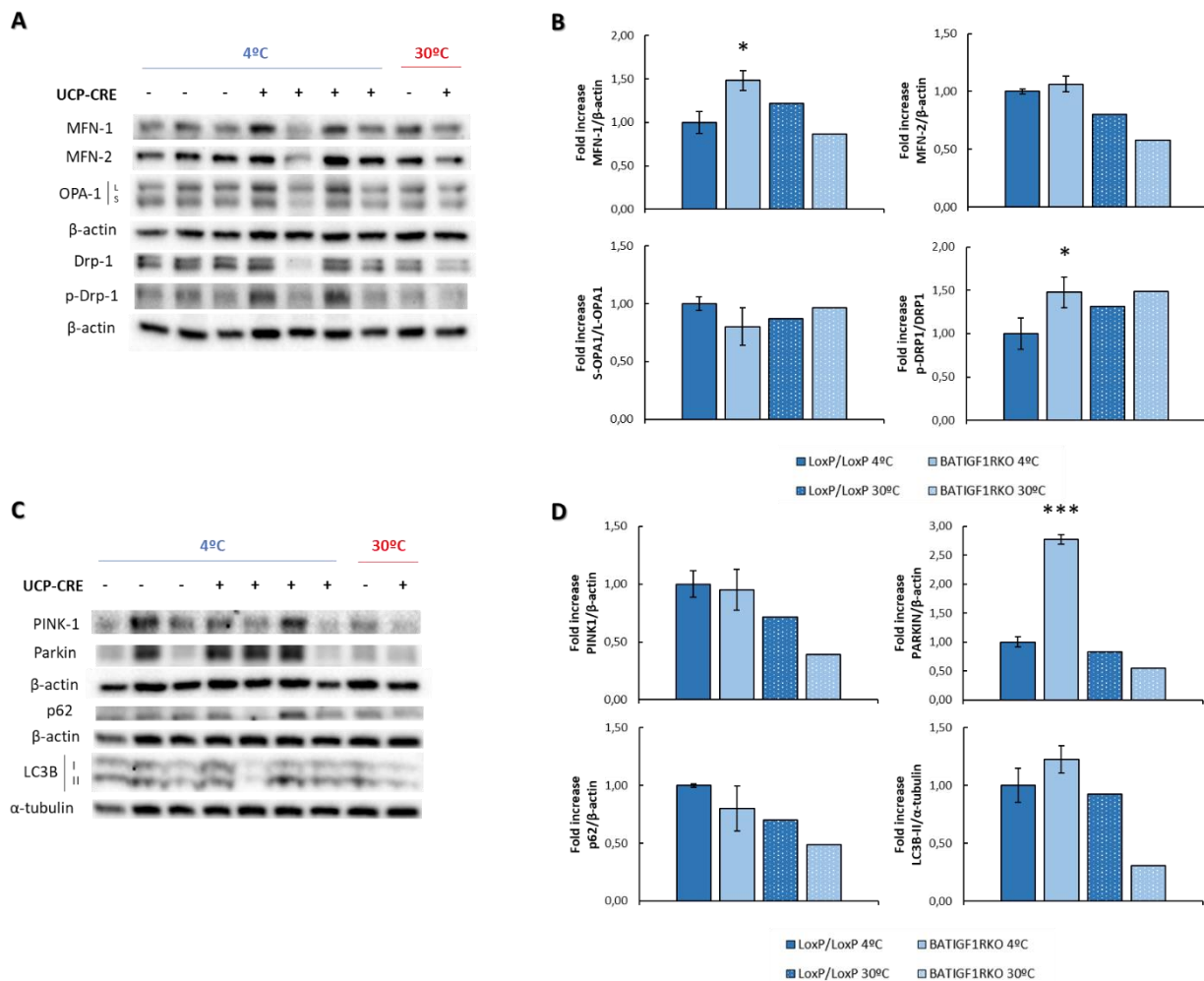


Figura 4.20 Estudio proteico de la dinámica mitocondrial y mitofagia en eWAT del modelo BATIGF1RKO tras la exposición al frío. (A) Inmunoblot representativo de proteínas de dinámica mitocondrial en homogeneizados de eWAT en ratones LoXP/LoXP y BATIGF1RKO. (B) Cuantificación de la expresión de dichas proteínas en el grupo control expuesto a 4°C (n=3), grupo BATIGF1RKO expuesto a 4°C (n=4), grupo LoXP/LoXP a 30°C (n=1) y grupo BATIGF1RKO a 30°C (n=1). (C) Inmunoblot representativo de proteínas involucradas en la mitofagia en homogeneizados de eWAT en ratones LoXP/LoXP y BATIGF1RKO. (D) Cuantificación de la expresión de dichas proteínas en el grupo control expuesto a 4°C (n=3), grupo BATIGF1RKO expuesto a 4°C (n=3), grupo LoXP/LoXP a 30°C (n=1) y grupo BATIGF1RKO a 30°C (n=1). Se empleó β-actina y α-tubulina como controles de carga. La significación estadística se evaluó por la prueba t-Student de dos colas y muestras desapareadas, y se representó como * p < 0,05 y *** p < 0,001 vs. ratones LoXP/LoXP 4°C.

A continuación, se examinó la región retroperitoneal del tejido adiposo blanco (rWAT) en el modelo BATIGF1RKO tras la exposición al frío. Este compartimento presenta una gran proporción de clústeres de adipocitos *beige* en roedores (Rosen & Spiegelman, 2014). Al igual que sucedió en iWAT, se observó una expresión de UCP-1 heterogénea que se mostró más acrecentada en el grupo *knock-out* comparado con los animales LoXP/LoXP expuesto al frío (Figura 4.21B). Sin embargo, la expresión de la proteína de matriz mitocondrial HADHA no mostró ninguna diferencia entre ambos grupos (Figura 4.21D). Estos resultados apoyarían la activación del proceso UCP-1(+) de *browning* en el modelo BATIGF1RKO a 4°C. Esta marronización ha sido descrita previamente en este depósito retroperitoneal

pudiendo por ello, ser clasificado algunas veces, como un compartimento de grasa parda (Sakers *et al.*, 2022).

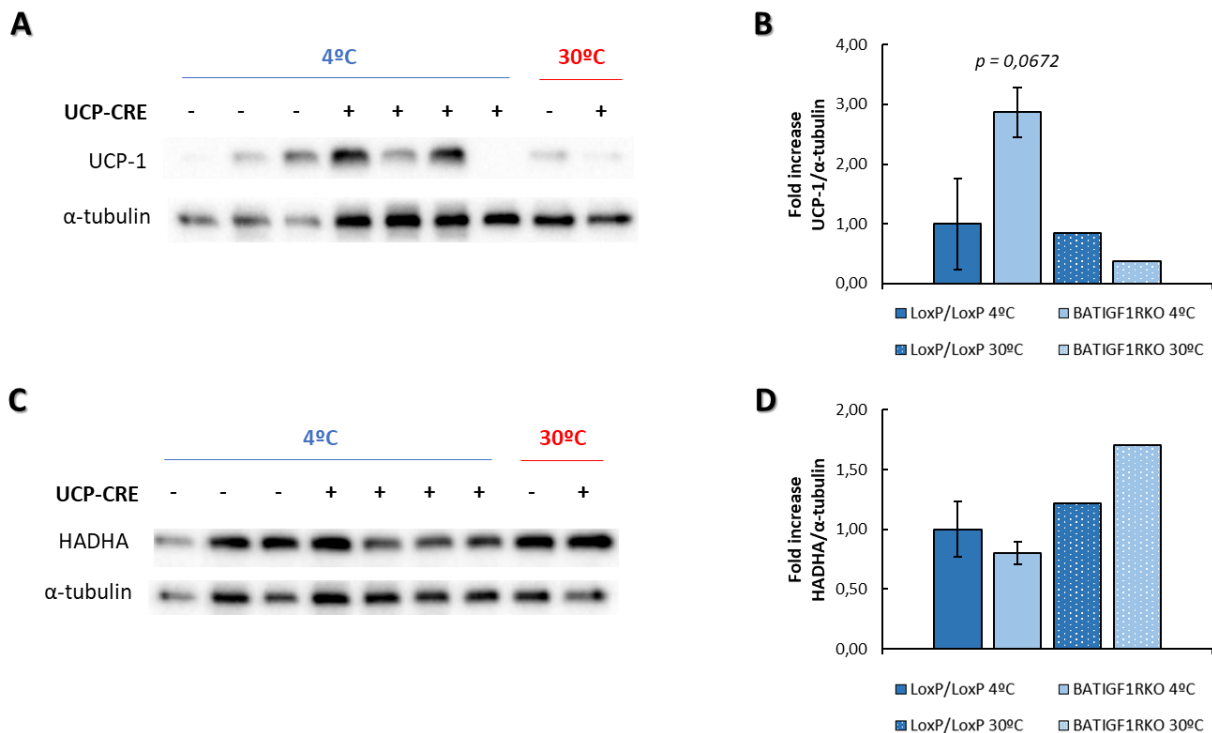


Figura 4.21 Estudio proteico de la activación termogénica y de contenido mitocondrial en rWAT del modelo BATIGF1RKO tras la exposición al frío. (A) Inmunoblot representativo de UCP-1 en homogeneizados de rWAT en ratones LoxP/LoxP y BATIGF1RKO. (B) Cuantificación de la expresión de UCP-1 en el grupo control expuesto a 4°C (n=3), grupo BATIGF1RKO expuesto a 4°C (n=4), grupo LoxP/LoxP a 30°C (n=1) y grupo BATIGF1RKO a 30°C (n=1). (C) Inmunoblot representativo de HADHA en homogeneizados de rWAT en ratones LoxP/LoxP y BATIGF1RKO. (D) Cuantificación de la expresión de HADHA en el grupo control expuesto a 4°C (n=3), grupo BATIGF1RKO expuesto a 4°C (n=4), grupo LoxP/LoxP a 30°C (n=1) y grupo BATIGF1RKO a 30°C (n=1). Se empleó α -tubulina como control de carga. Los resultados se expresaron como media \pm SEM.

El análisis proteico de los parámetros de dinámica mitocondrial y mitofagia reveló una disminución significativa del ratio de fisión p-DRP-1/DRP-1 en el grupo BATIGF1RKO expuesto a 4°C comparado con el grupo control (Figura 4.22B). Además, este descenso en la fisión mitocondrial quedó más marcado por el ligero aumento de la expresión de MFN-2. Por otro lado, en el estudio mitofágico se observó un aumento significativo de la expresión de PINK-1 en los animales BATIGF1RKO cuando eran comparados con los LoxP/LoxP en la situación de frío, y junto con el ligero aumento de la expresión de Parkina también percibido (Figura 4.22D), podría señalar una activación de este mecanismo de control mitocondrial mostrando así su fase inicial del proceso.

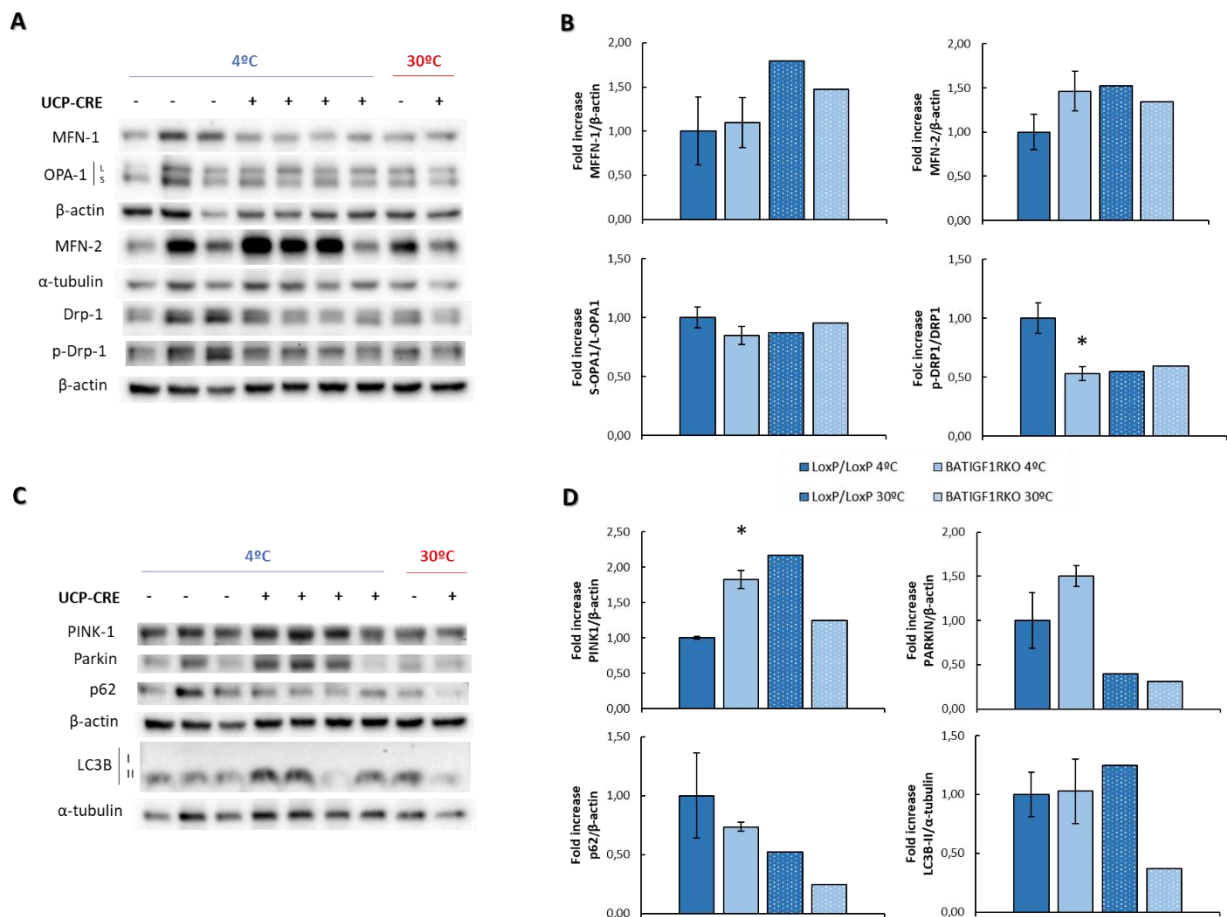


Figura 4.22 Estudio proteico de la dinámica mitocondrial y mitofagia en rWAT del modelo BATIGF1RKO tras la exposición al frío. **(A)** Inmunoblot representativo de proteínas de dinámica mitocondrial en homogeneizados de rWAT en ratones LoXP/LoXP y BATIGF1RKO. **(B)** Cuantificación de la expresión de dichas proteínas en el grupo control expuesto a 4°C (n=3), grupo BATIGF1RKO expuesto a 4°C (n=4), grupo LoXP/LoXP a 30°C (n=1) y grupo BATIGF1RKO a 30°C (n=1). **(C)** Inmunoblot representativo de proteínas involucradas en la mitofagia en homogeneizados de rWAT en ratones LoXP/LoXP y BATIGF1RKO. **(D)** Cuantificación de la expresión de dichas proteínas en el grupo control expuesto a 4°C (n=3), grupo BATIGF1RKO expuesto a 4°C (n=4), grupo LoXP/LoXP a 30°C (n=1) y grupo BATIGF1RKO a 30°C (n=1). Se empleó β-actina y α-tubulina como controles de carga. La significación estadística se evaluó por la prueba t-Student de dos colas y muestras desapareadas, y se representó como * p < 0,05 vs. Ratones LoXP/LoXP 4°C.

Posteriormente, se evaluó el papel de la dinámica mitocondrial en el proceso de *browning* del compartimento mesentérico del tejido adiposo blanco (**mWAT**) en el modelo BATIGF1RKO expuesto al frío. Respecto a la marronización, parece que, si el proceso está activo, no es dependiente de la expresión de UCP-1 puesto que el análisis proteico no mostró expresión de esta proteína ni en los animales carentes de IGF-1R ni en aquellos con el gen floxeado a 4°C (**Figura 4.23a**). Tampoco se observó ningún cambio en el parámetro de contenido mitocondrial indicado por la expresión de la proteína de matriz HADHA en ambos grupos expuestos al frío (**Figura 4.23C**).

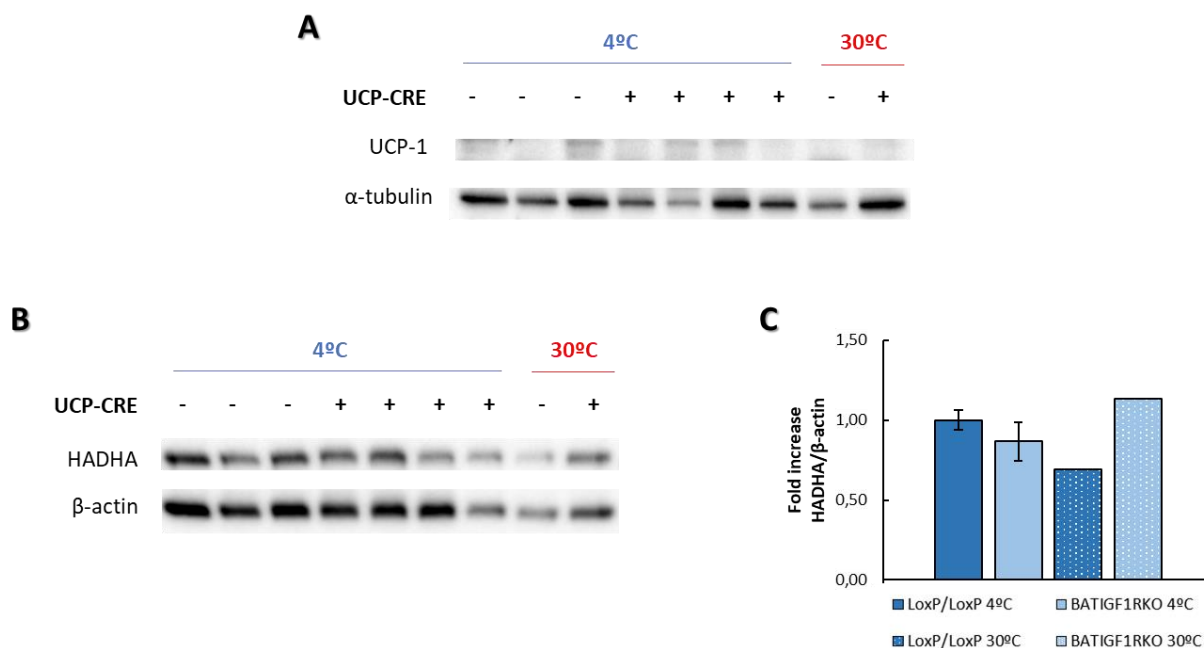


Figura 4.23 Estudio proteico de la activación termogénica y de contenido mitocondrial en mWAT del modelo BATIGF1RKO tras la exposición al frío. **(A)** Inmunoblot representativo de UCP-1 en homogeneizados de mWAT en ratones LoxP/LoxP y BATIGF1RKO. **(B)** Inmunoblot representativo de HADHA en homogeneizados de mWAT en ratones LoxP/LoxP y BATIGF1RKO. **(C)** Cuantificación de la expresión de HADHA en el grupo control expuesto a 4°C (n=3), grupo BATIGF1RKO expuesto a 4°C (n=4), grupo LoxP/LoxP a 30°C (n=1) y grupo BATIGF1RKO a 30°C (n=1). Se empleó α-tubulina y β-actina como controles de carga. Los resultados se expresaron como media ± SEM.

En relación con la plasticidad mitocondrial, el estudio proteico mostró un descenso casi significativo en la expresión de MFN-1 en el modelo BATIGF1RKO comparado con el grupo control expuesto al frío (**Figura 4.24B**). No obstante, los resultados obtenidos no sugirieron ninguna forma preferente de la mitocondria lo que podría señalar a un balance en la dinámica mitocondrial.

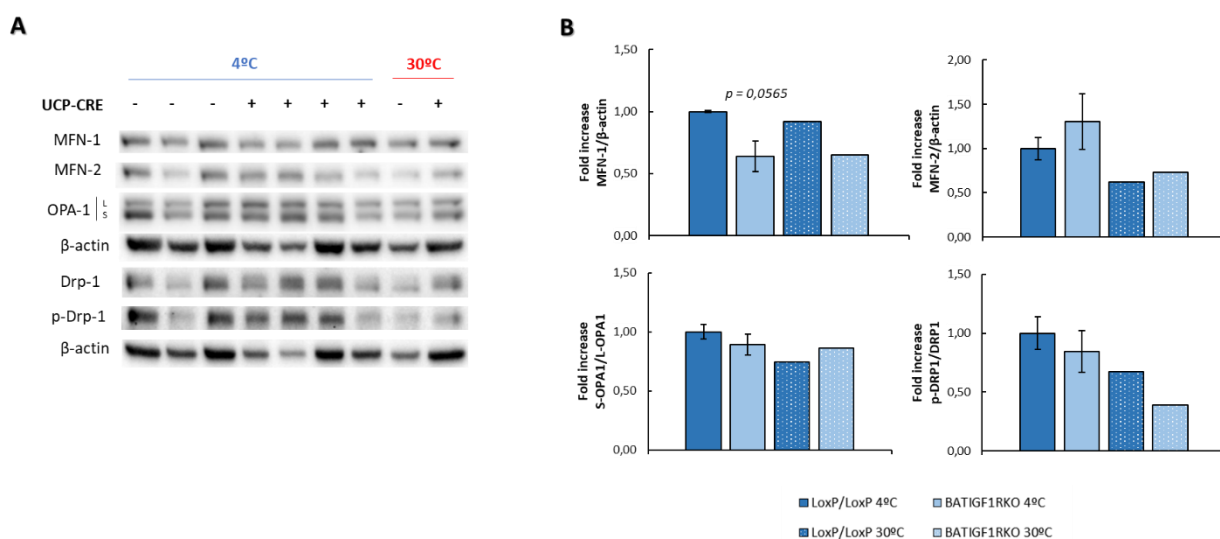


Figura 4.24 Estudio proteico de la dinámica mitocondrial en mWAT del modelo BATIGF1RKO tras la exposición al frío. **(A)** Inmunoblot representativo de proteínas de dinámica mitocondrial en homogeneizados de mWAT en ratones LoxP/LoxP y BATIGF1RKO. **(B)** Cuantificación de la expresión de dichas proteínas en el grupo control expuesto a 4°C (n=3), grupo BATIGF1RKO expuesto a 4°C

(n=4), grupo LoxP/LoxP a 30°C (n=1) y grupo BATIGF1RKO a 30°C (n=1). Se empleó β -actina como control de carga. La significación estadística se evaluó por la prueba t-Student de dos colas y muestras desapareadas vs. ratones LoxP/LoxP 4°C.

Por último, se evaluó de manera aproximada la lipólisis en todos los compartimentos de tejido adiposo blanco mediante la expresión de HSL, lipasa sensible a hormonas. Sólo en la región inguinal se observó una ligera disminución de esta expresión en el grupo BATIGF1RKO expuesto al frío comparado con su grupo control (Figura 4.25A). Sin embargo, el resto de los compartimentos no mostraron ninguna diferencia entre los animales *knock-out* y LoxP/LoxP (Figura 4.25), lo que podría indicar que la lipólisis no se encuentra más activa en el modelo murino BATIGF1RKO. En cualquier caso, sería necesario determinar la expresión de la forma activa de esta proteína: p-HSL.

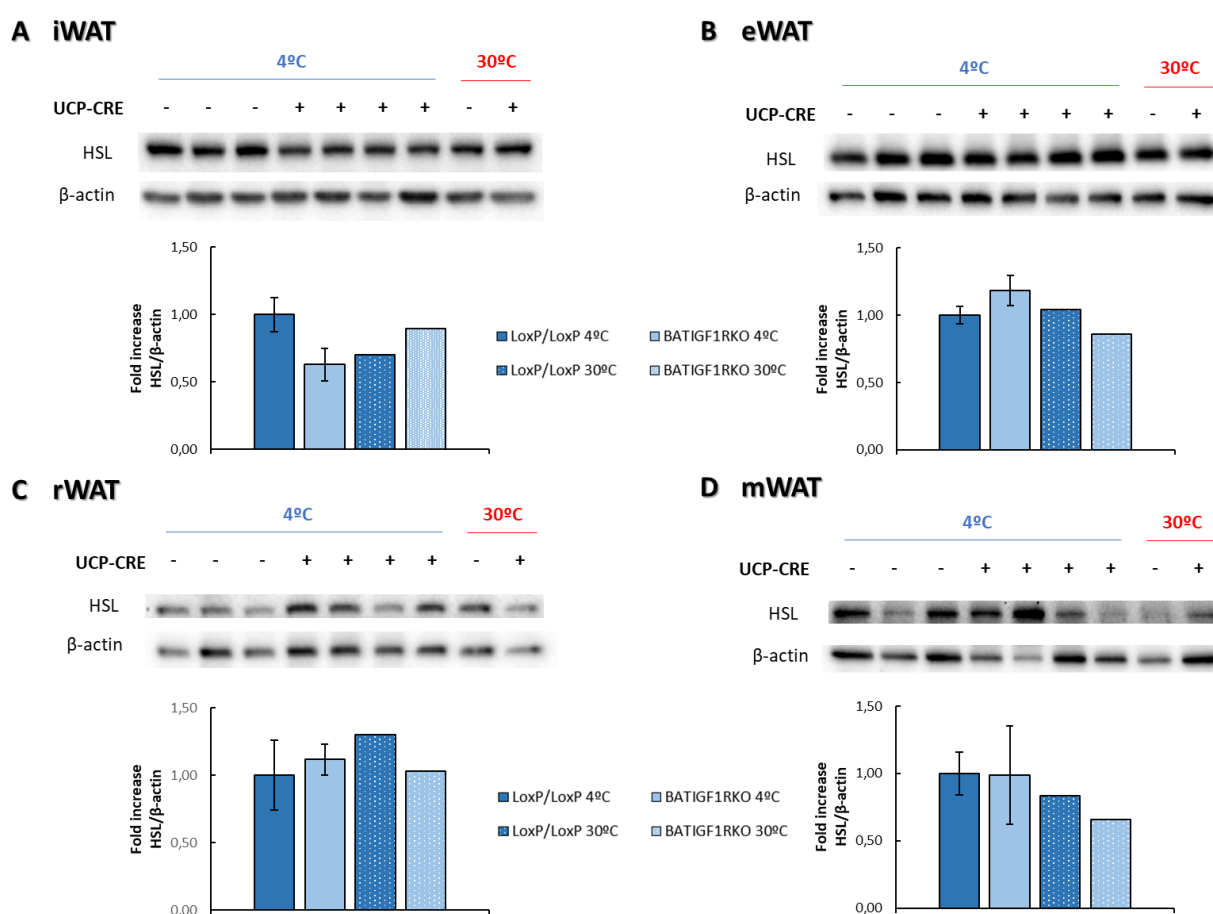


Figura 4.25 Estudio proteico aproximado de la lipólisis en WAT del modelo BATIGF1RKO tras la exposición al frío. **(A)** Inmunoblot representativo de HSL en homogeneizados de **iWAT** en ratones LoxP/LoxP y BATIGF1RKO (arriba); y cuantificación de la expresión de dicha proteína en el grupo control expuesto a 4°C (n=3), grupo BATIGF1RKO expuesto a 4°C (n=4), grupo LoxP/LoxP a 30°C (n=1) y grupo BATIGF1RKO a 30°C (n=1) (abajo). **(B)** Inmunoblot representativo de HSL en homogeneizados de **eWAT** en ratones LoxP/LoxP y BATIGF1RKO (arriba); y cuantificación de la expresión de dicha proteína en el grupo control expuesto a 4°C (n=3), grupo BATIGF1RKO expuesto a 4°C (n=4), grupo LoxP/LoxP a 30°C (n=1) y grupo BATIGF1RKO a 30°C (n=1) (abajo). **(C)** Inmunoblot representativo de HSL en homogeneizados de **rWAT** en ratones LoxP/LoxP y BATIGF1RKO (arriba); y cuantificación de la expresión de dicha proteína en el grupo control expuesto a 4°C (n=3), grupo BATIGF1RKO expuesto a 4°C (n=4), grupo LoxP/LoxP a 30°C (n=1) y grupo BATIGF1RKO a 30°C (n=1)

(abajo). **(D)** Inmunoblot representativo de HSL en homogeneizados de **mWAT** en ratones LoxP/LoxP y BATIGF1RKO (arriba); y cuantificación de la expresión de dicha proteína en el grupo control expuesto a 4°C (n=3), grupo BATIGF1RKO expuesto a 4°C (n=4), grupo LoxP/LoxP a 30°C (n=1) y grupo BATIGF1RKO a 30°C (n=1) (abajo). Se empleó β -actina como control de carga.

4.2 CONTRIBUCIÓN DE LA FUSIÓN MITOCONDRIAL EN LA TERMOGÉNESIS ADAPTATIVA

Como hemos podido observar previamente en el **apartado 4.1**, la dinámica mitocondrial desempeña un papel en la termogénesis adaptativa promoviendo el estado fisionado de las mitocondrias en el modelo BATIGF1RKO. Para comprobar dicho papel y gracias a la colaboración del Prof. Dr. Antonio Zorzano del Instituto de Investigaciones Biomédicas de Barcelona (IRB), se generaron dos modelos murinos carentes de diferentes proteínas de fusión específicamente en el tejido adiposo marrón: BATOPA1KO, *knock-out* de la proteína de fusión interna OPA-1; y BATMFN1KO, de la proteína de fusión externa MFN-1. De esta manera, se determinó la importancia de la fusión mitocondrial durante la termogénesis adaptativa y si la fisión mitocondrial es determinante para que este proceso de termorregulación tenga lugar.

Durante estos estudios, se utilizaron ratones macho LoxP/LoxP y pertenecientes a los modelos *knock-out*: BATOPA1KO y BATMFN1KO, con una edad aproximada de 5 meses puesto que se consideró que en este periodo los animales presentaban depósitos de grasa blanca más desarrollados y el tejido adiposo marrón era plenamente funcional. Así, se pudo examinar la contribución que podría tener la dinámica mitocondrial en el proceso de *browning* ante esta pérdida de expresión de dichas proteínas de fusión en el tejido adiposo marrón.

4.2.1 Perfil glucídico y análisis de la grasa corporal del modelo BATOPA1KO

En primer lugar, se evaluó el perfil glucídico del modelo carente de OPA-1 específicamente en el tejido adiposo marrón (BATOPA1KO) para identificar si la fusión mitocondrial regula la homeostasis glucídica. Los resultados no mostraron ninguna diferencia entre el grupo control y el modelo *knock-out* (**Figura 4.26**) aunque sí que se observó una ligera resistencia a insulina en los animales BATOPA1KO mayor que en los controles (**Figura 4.26B**).

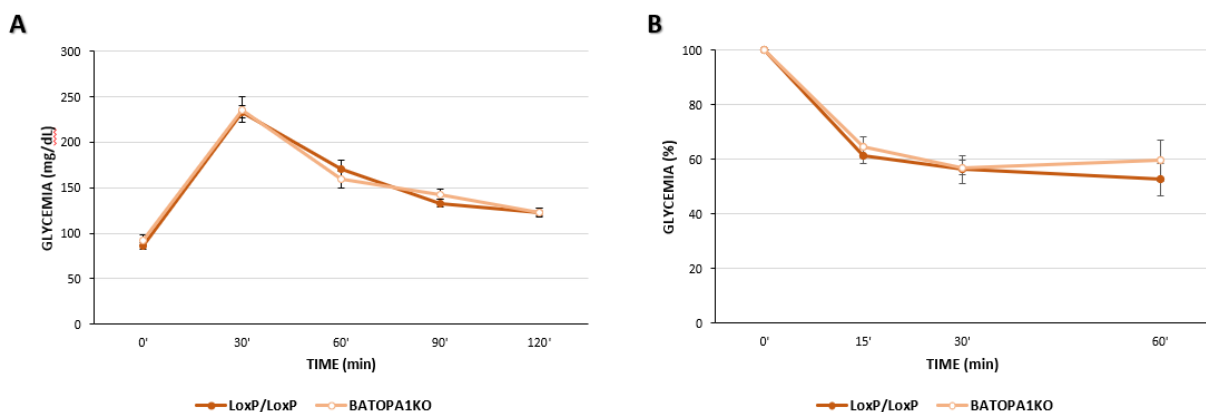


Figura 4.26 Perfil glucídico basal del modelo BATOPA1KO. Curvas obtenidas de los (A) test de tolerancia a glucosa (GTT) representada en mg/dL de glucosa en sangre y (B) test de tolerancia a

insulina (ITT) representada en porcentaje (%) en animales LoxP/LoxP (n=5) y BATOPA1KO (n=5). Los resultados se expresaron como media \pm SEM.

Posteriormente, se analizó la cantidad de grasa corporal que presentaba el modelo BATOPA1KO donde se determinó una disminución significativa del porcentaje de grasa en los ratones carentes de OPA-1 comparados con el grupo control (**Figura 4.27B**) sin ningún cambio en el peso corporal en estos animales (**Figura 4.27C**).

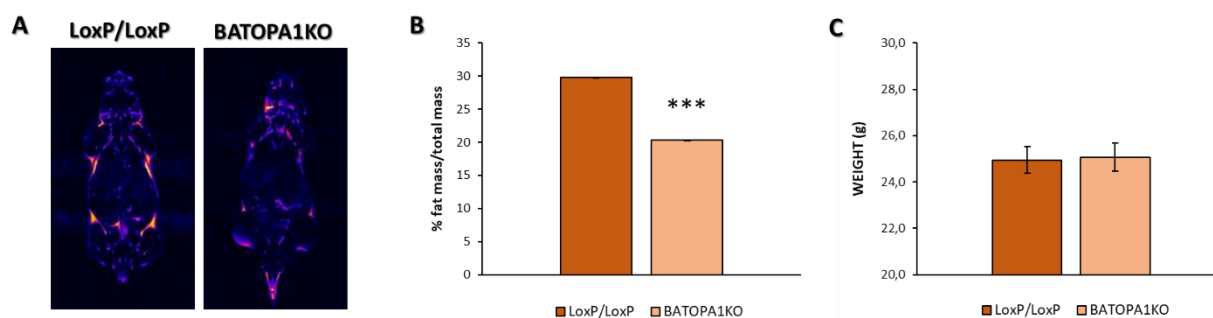


Figura 4.27 Parámetros de adiposidad y peso corporal en el modelo BATOP1KO. (A) Imágenes representativas de RMN de animales LoxP/LoxP y BATOPA1KO de 5 meses de edad y en una situación basal. (B) Cuantificación de las imágenes de RMN representada en porcentaje de masa grasa respecto a la masa total de animales LoxP/LoxP (n=2) y BATOPA1KO (n=4). (C) Histograma del peso corporal en animales LoxP/LoxP (n=4) y BATOPA1KO (n=8). Los resultados se expresaron como media \pm SEM. La significación estadística se evaluó por la prueba t-Student de dos colas y muestras desapareadas, y se representó como *** $p < 0,001$ vs. ratones LoxP/LoxP.

4.2.2 Capacidad termogénica y estudio proteico en el modelo BATOPA1KO tras la exposición al frío

A continuación, se realizó un experimento de exposición al frío (4°C) durante 12 horas para determinar la capacidad de adaptación del modelo BATOPA1KO. Lo primero que se detectó fue una temperatura basal significativamente más alta en los animales LoxP/LoxP comparado con el grupo *knock-out* (**Figura 4.28A**). Sin embargo, la adaptación termogénica de ambos grupos siguió la misma tendencia, sin mostrar ninguna diferencia entre sí (**Figura 4.28A**), indicando así la posibilidad de que la carencia de OPA-1 en el tejido adiposo marrón no altera la capacidad termogénica de los ratones. Asimismo, tras el sacrificio de los ratones, se analizó el tamaño del BAT interescapular (iBAT) que evidenció un incremento de peso en el tejido perteneciente al modelo BATOPA1KO, lo que sugirió la existencia de una hipertrofia de iBAT (**Figura 4.28B** y **4.28C**).

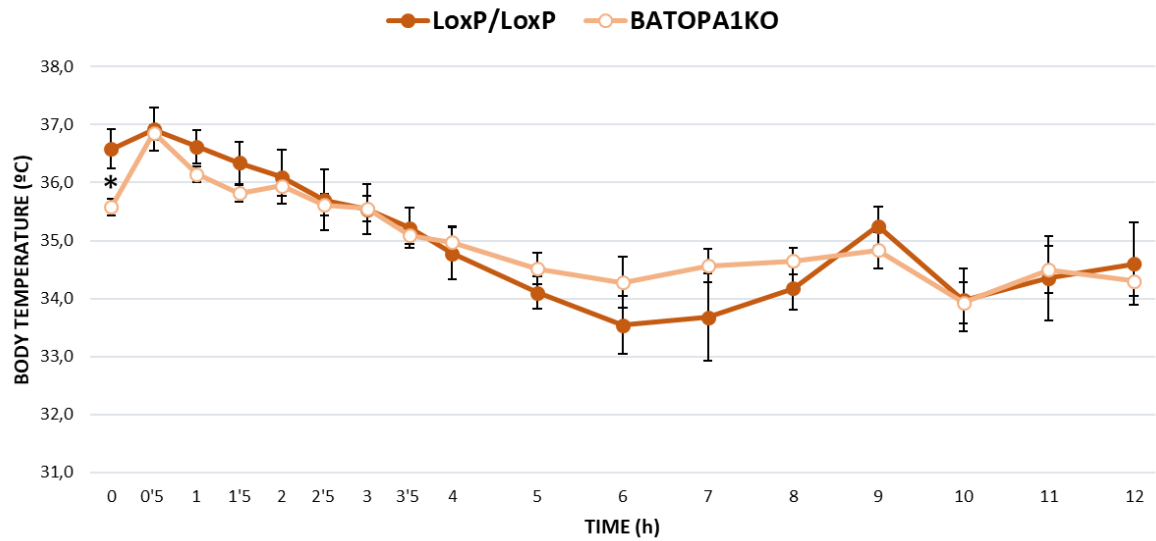
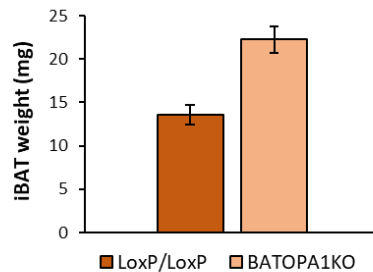
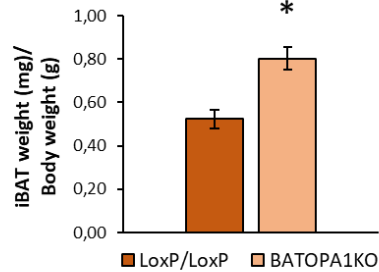
A**B****C**

Figura 4.28 Adaptación termogénica del modelo BATOPA1KO. (A) Representación gráfica de las temperaturas corporales durante las 12 horas de exposición al frío en animales LoxP/LoxP (n=5) y en el modelo BATOPA1KO (n=13). (B) Histograma del peso en miligramos (mg) del depósito interescapular del tejido adiposo marrón (iBAT) en el grupo control (n=3) y en el grupo *knock-out* (n=7). (C) Representación gráfica del peso de iBAT corregido por el peso corporal. Los resultados se expresaron como media \pm SEM. La significación estadística se evaluó por la prueba t-Student de dos colas y muestras desapareadas, y se representó como * = $p < 0,05$ y ** = $p < 0,01$ vs. ratones LoxP/LoxP.

El estudio de la morfología de iBAT no reveló ninguna diferencia entre los animales carentes de OPA-1 en el tejido adiposo marrón y el grupo control (Figura 4.29B). De igual modo, la proteína termogénica UCP-1 no mostró cambios de expresión entre ambos grupos estudiados (Figura 4.30).

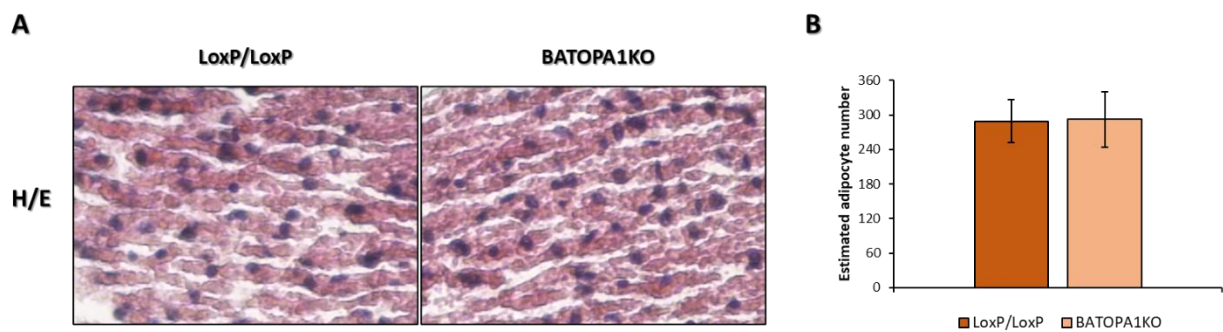


Figura 4.29 Aproximación del número de células en iBAT en el grupo control y en el modelo BATOPA1KO tras la exposición al frío. (A) Imágenes representativas de la tinción de hematoxilina/eosina de iBAT de animales control y el modelo *knock-out*. (B) Histograma del número estimado de células localizadas en iBAT del grupo control (n=3) y del grupo BATOPA1KO (n=5). Los resultados se expresaron como media \pm SEM.

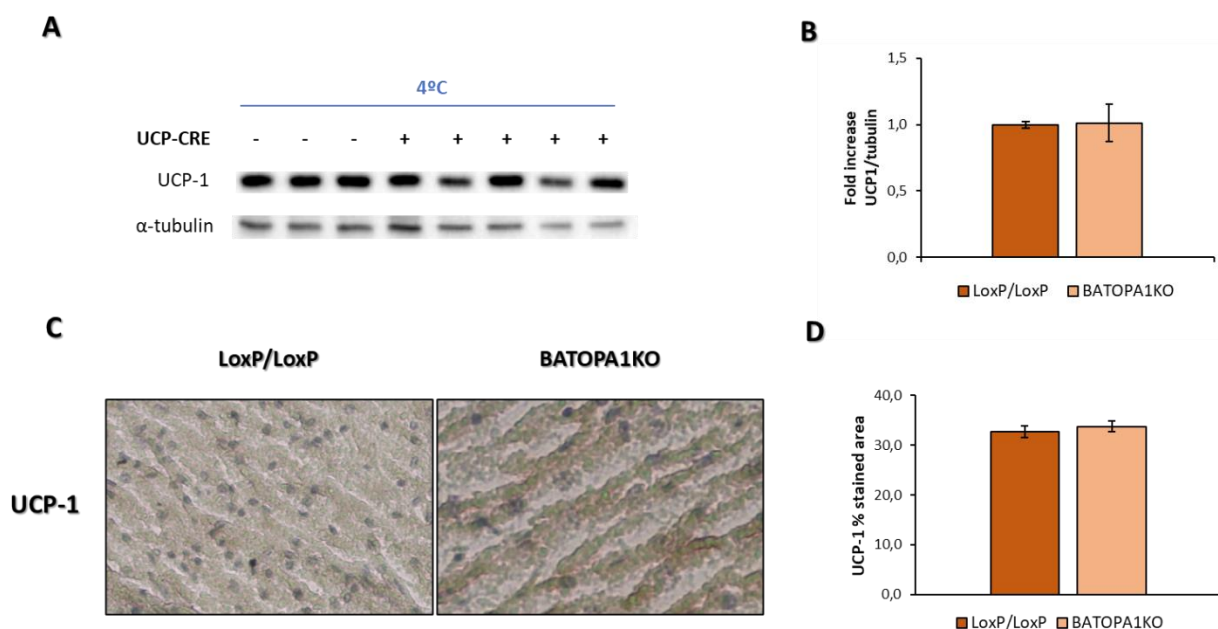


Figura 4.30 Activación de la termogénesis adaptativa mediante el mecanismo canónico de UCP-1 en el modelo BATOPA1KO tras la exposición al frío. (A) Inmunoblot representativo de UCP-1 en homogeneizados de iBAT en ratones LoxP/LoxP y BATOPA1KO. (B) Cuantificación de la expresión de UCP-1 en el grupo control (n=3) y grupo BATOPA1KO (n=5). Se empleó α -tubulina como control de carga. (C) Imágenes representativas de inmunohistoquímica de UCP-1 en iBAT del grupo control y del modelo BATOPA1KO. (D) Cuantificación de las imágenes de inmunohistoquímica de UCP-1 en animales LoxP/LoxP (n=3) y *knock-out* (n=5). Los resultados se expresaron como media \pm SEM.

Por último, se analizó el contenido mitocondrial mediante la expresión proteica de los marcadores mitocondriales HADHA y TOMM-20. Estos resultados indicaron un ligero aumento de la expresión de ambas proteínas en los ratones carentes de OPA-1 en el tejido adiposo marrón que no resultó significativo (Figura 4.31B). Además, la inmunohistoquímica de TOMM-20 en iBAT tampoco mostró ninguna diferencia entre ambos grupos (Figura 4.31D).

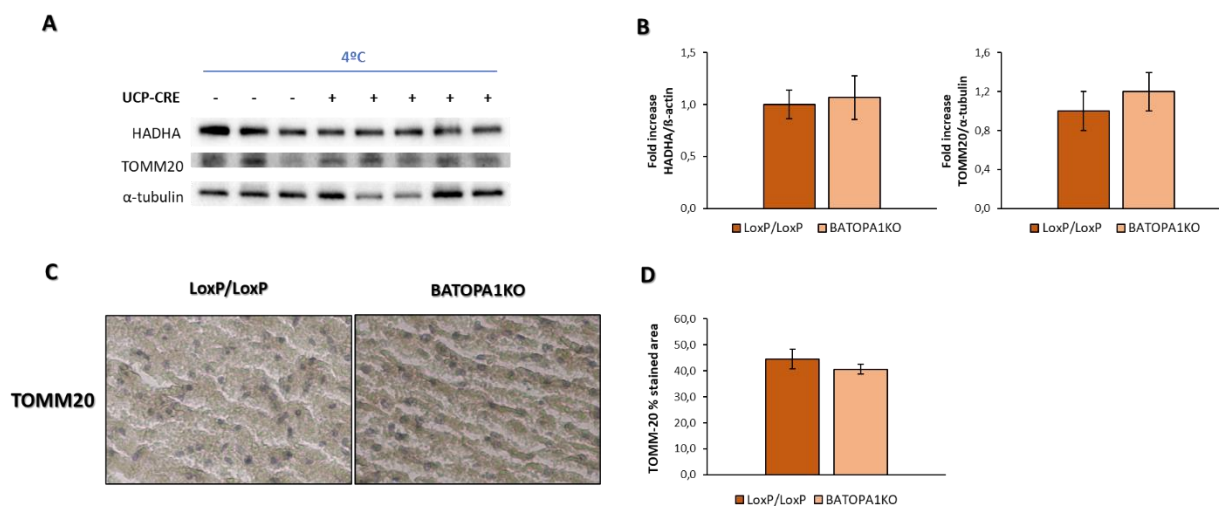


Figura 4.31 Estudio proteico del contenido mitocondrial en el modelo BATOPA1KO tras la exposición al frío. **(A)** Inmunoblot representativo de HADHA y TOMM-20 en homogeneizados de iBAT en ratones LoxP/LoxP y BATOPA1KO. **(B)** Cuantificación de la expresión de ambas proteínas en el grupo control (n=3) y el grupo BATOPA1KO (n=5). Se empleó α-tubulina como control de carga. **(C)** Imágenes representativas de inmunohistoquímica de TOMM-20 en iBAT del grupo control y del modelo BATOPA1KO expuestos al frío. **(D)** Cuantificación de las imágenes de inmunohistoquímica de TOMM-20 en animales LoxP/LoxP (n=3) y *knock-out* (n=5). Los resultados se expresaron como media ± SEM.

4.2.3 Análisis del estado mitocondrial y del mecanismo de control mitocondrial mitofagia en el modelo BATOPA1KO tras la exposición al frío

Puesto que el objetivo principal de esta tesis fue valorar si la dinámica mitocondrial puede actuar como un mecanismo adicional en la termogénesis adaptativa, se realizó el estudio de la plasticidad mitocondrial. El análisis de la expresión proteica de los marcadores de dinámica mitocondrial no mostró diferencias entre el modelo BATOPA1KO y el grupo control expuesto al frío (Figura 4.32B). No obstante, se observó una tendencia de disminución de todos los parámetros en el grupo *knock-out* (Figura 4.32B). De este modo, y puesto que en las imágenes tomadas por microscopía electrónica no se pudieron examinar el número, las formas e interior de las mitocondrias no se pudo determinar el estado mitocondrial de iBAT en el modelo BATOPA1KO tras la exposición al frío, así como el papel de OPA-1 en la integridad de las crestas mitocondriales.

A continuación, el estudio proteico de las proteínas involucradas en el mecanismo de eliminación mitocondrial vía PINK-1/Parkina determinó un incremento significativo en la expresión de PINK-1 en los animales carentes de OPA-1 comparados con los LoxP/LoxP (Figura 4.32D). Asimismo, existió un ligero aumento de la expresión de la forma lipídica de la proteína autofágica LC3B (LC3B-II) en el modelo BATOPA1KO (Figura 4.32D). Esta quinasa PINK-1 es conocida por su papel iniciador en la cascada de señalización de este tipo de mitofagia mientras que LC3B-II se encuentra unida a la membrana lipídica que rodea a la mitocondria

dañada previamente marcada por colas de poliubiquitinas, por lo que estos resultados podrían indicar una activación de la mitofagia en el iBAT del modelo BATOPA1KO expuesto al frío.

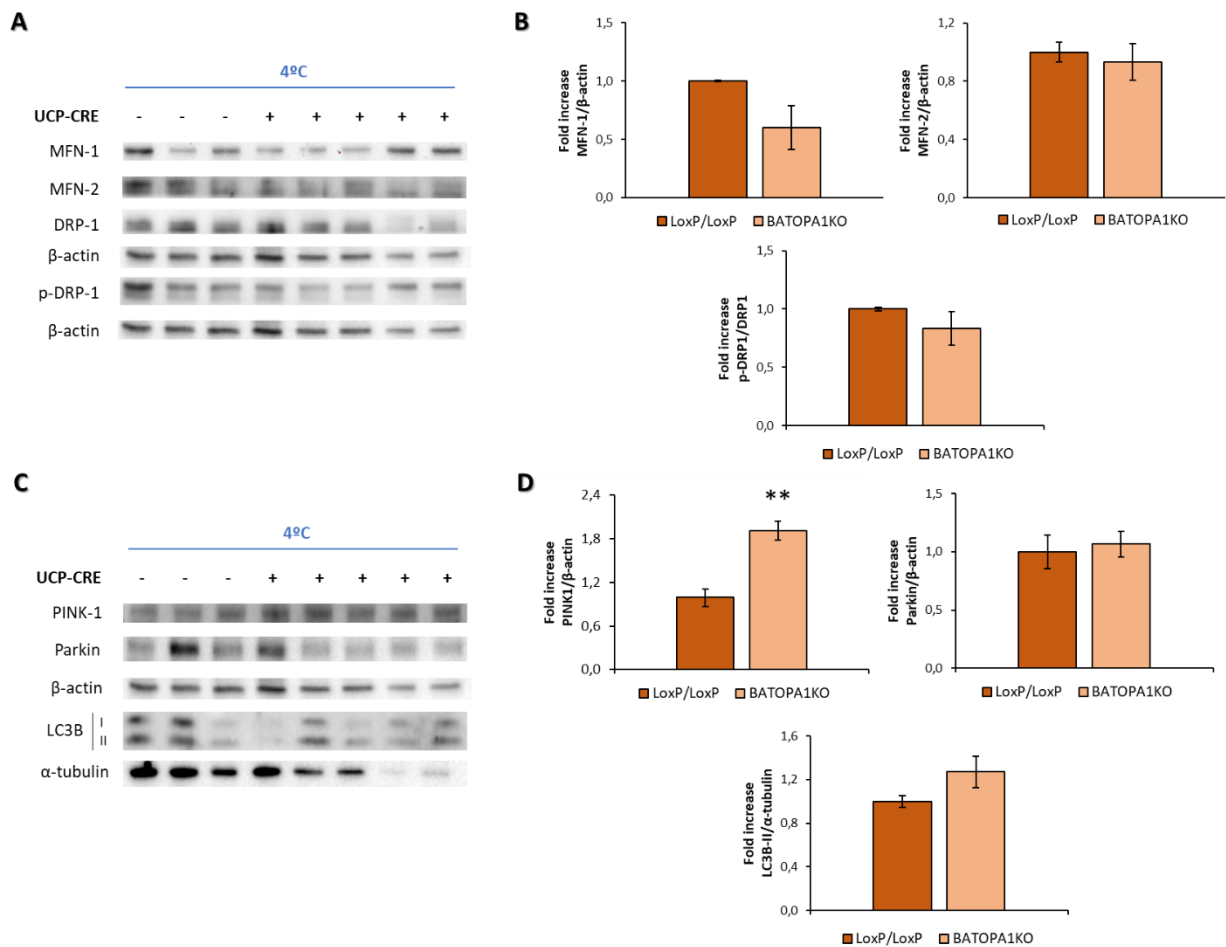


Figura 4.32 Análisis proteico de la dinámica mitocondrial y mitofagia en el modelo BATOPA1KO tras la exposición al frío. **(A)** Inmunoblot representativo de las proteínas de fusión MFN-1, MFN-2 y OPA-1, y de la proteína de fisión mitocondrial DRP-1 y su forma activada p-DRP-1 en homogeneizados de iBAT en animales LoxP/LoxP y BATOPA1KO. **(B)** Cuantificación de la expresión de dichas proteínas en el grupo control (n=3) y grupo BATOPA1KO (n=5). **(C)** Inmunoblot representativo de las proteínas implicadas en la vía mitofágica PINK-1/Parkina y en la fase final de la autofagia (LC3B-II) en homogeneizados de iBAT en ratones LoxP/LoxP y BATOPA1KO. **(D)** Cuantificación de la expresión de dichas proteínas en el grupo control (n=3) y grupo BATOPA1KO (n=5). Se empleó β-actina y α-tubulina como controles de carga. Los resultados se expresaron como media ± SEM. Se empleó β-actina y α-tubulina como controles de carga. Los resultados se expresaron como media ± SEM. La significación estadística se evaluó por la prueba t-Student de dos colas y muestras desapareadas, y se representó como ** = p < 0,01 vs. ratones LoxP/LoxP.

4.2.4 Proceso de *browning* o marronización en los compartimentos de tejido adiposo blanco en el modelo BATOPA1KO tras la exposición al frío

Al no poder determinar cambios en la dinámica mitocondrial en el iBAT del modelo BATOPA1KO, se evaluaron los compartimentos inguinal (iWAT) y epididimal (eWAT) de grasa blanca de los mismos grupos de animales expuestos durante 12 horas al frío.

En primer lugar, se analizó la expresión de UCP-1 y de diferentes marcadores mitocondriales en la región subcutánea o inguinal del tejido adiposo blanco (iWAT) ya que este compartimento presenta un *browning* UCP-1(+) (Sakers *et al.*, 2022). Este estudio no arrojó diferencias entre el grupo carente de OPA-1 y el control (Figura 4.33). Sin embargo, se observó un ligero aumento en la expresión de la proteína de matriz mitocondrial HADHA en los animales *knock-out* comparados con los animales LoxP/LoxP (Figura 4.33C).

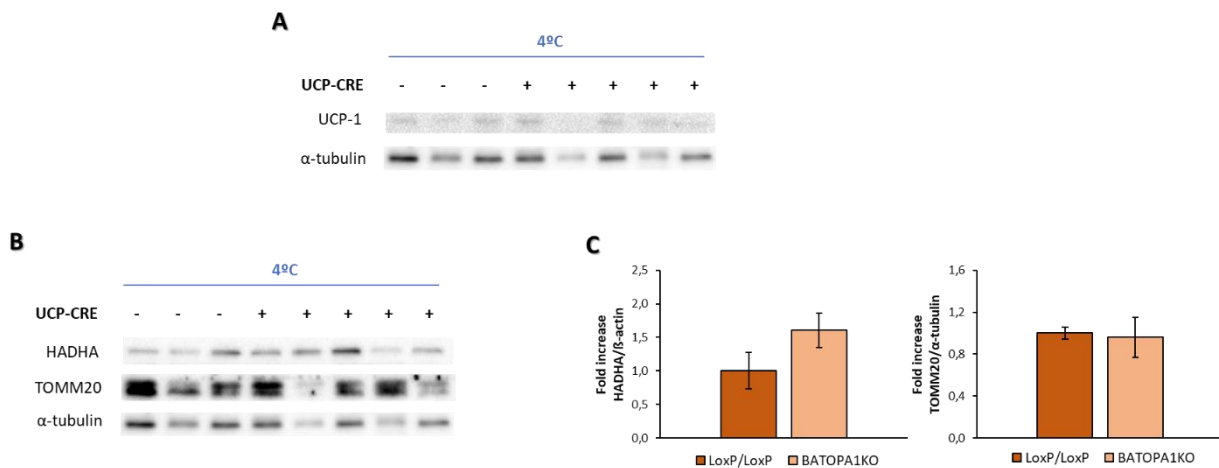


Figura 4.33 Estudio proteico de la activación termogénica y de contenido mitocondrial en iWAT del modelo BATOPA1KO tras la exposición al frío. (A) Inmunoblot representativo de UCP-1 en homogeneizados de iWAT en ratones LoxP/LoxP y BATOPA1KO. (B) Inmunoblot representativo de HADHA y TOMM-20 en homogeneizados de iWAT en ratones LoxP/LoxP y BATOPA1KO. (C) Cuantificación de la expresión de HADHA y TOMM-20 proteínas en el grupo control (n=3) y grupo BATOPA1KO (n=5). Se empleó α -tubulina como control de carga. Los resultados se expresaron como media \pm SEM.

Sin embargo, los resultados obtenidos del análisis de la dinámica mitocondrial y mitofagia revelaron un aumento significativo de la expresión de la proteína de fusión MFN-2 en iWAT del modelo BATOPA1KO comparado con el grupo control, ambos expuestos al frío (Figura 4.34B). Además, este dato junto con la ligera disminución de la proteína de fisión DRP-1 percibida (Figura 4.34B), podría indicar un incremento del estado fusionado de las mitocondrias pertenecientes a iWAT de los animales *knock-out* tras la exposición al frío.

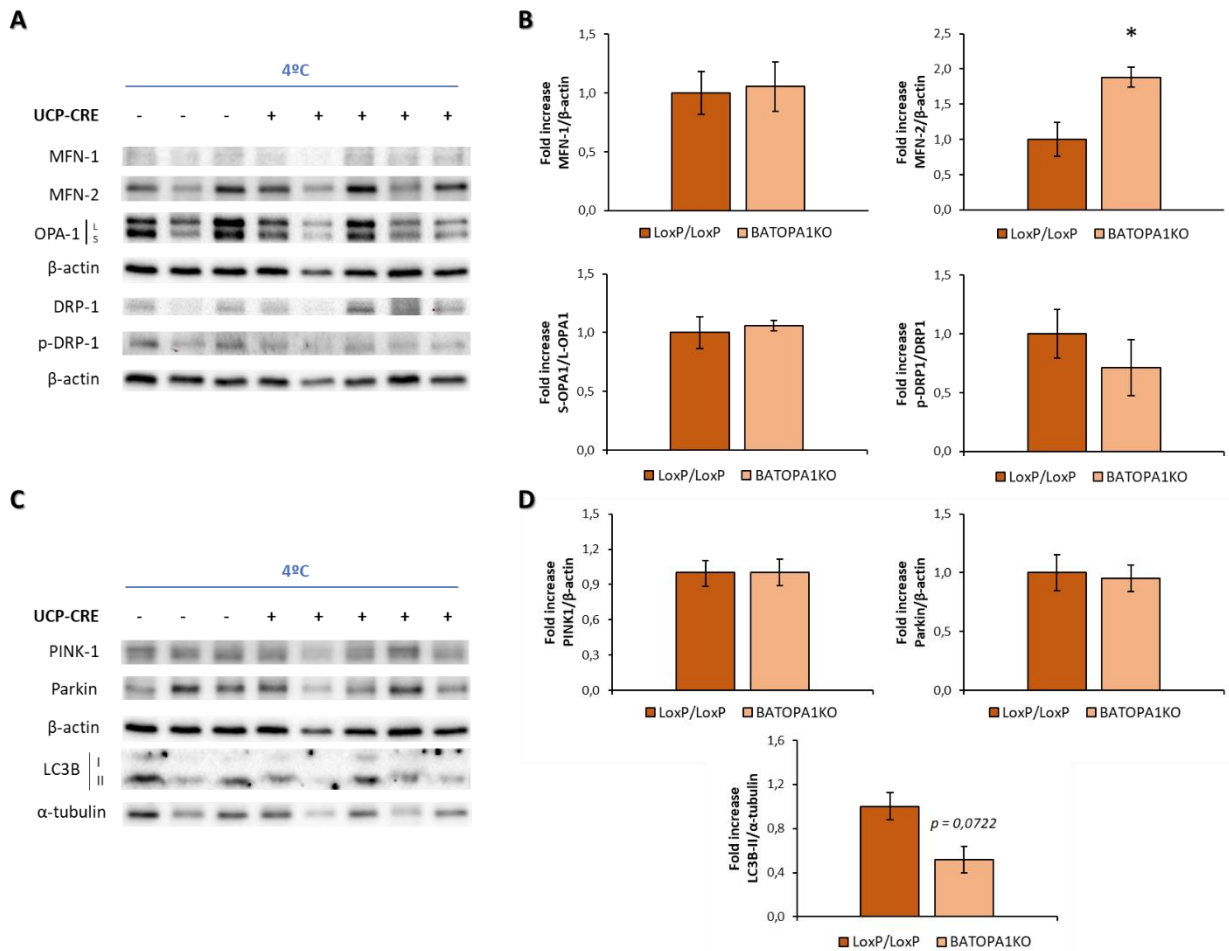


Figura 4.34 Estudio proteico de la dinámica mitocondrial y mitofagia en iWAT del modelo BATOPA1KO tras la exposición al frío. **(A)** Inmunoblot representativo de proteínas de dinámica mitocondrial en homogeneizados de iWAT en ratones LoXP/LoXP y BATOPA1KO. **(B)** Cuantificación de la expresión de dichas proteínas en el grupo control (n=3) y el grupo BATOPA1KO (n=5). **(C)** Inmunoblot representativo de proteínas involucradas en la mitofagia en homogeneizados de iWAT en ratones LoXP/LoXP y BATOPA1KO. **(D)** Cuantificación de la expresión de dichas proteínas en el grupo control (n=3) y el grupo BATOPA1KO (n=5). Se empleó β-actina y α-tubulina como controles de carga. La significación estadística se evaluó por la prueba t-Student de dos colas y muestras desapareadas, y se representó como * p < 0,05 vs. ratones LoXP/LoXP.

Por otro lado, se estudió el proceso de marronización en la región epididimal del tejido adiposo blanco (eWAT) de dichos animales expuestos al frío. Debido a que se ha descrito en la bibliografía que este compartimento puede sufrir un *browning* independiente de la expresión de UCP-1 (Sakers *et al.*, 2022), se examinó también la proteína involucrada en la biogénesis mitocondrial PGC-1α. Este análisis mostró un aumento en la expresión de PGC-1α al igual que un incremento significativo de HADHA en el modelo BATOPA1KO comparado con el grupo control expuesto al frío (Figura 4.35B y 4.35D), señalando así la posibilidad de una marronización en este tejido.

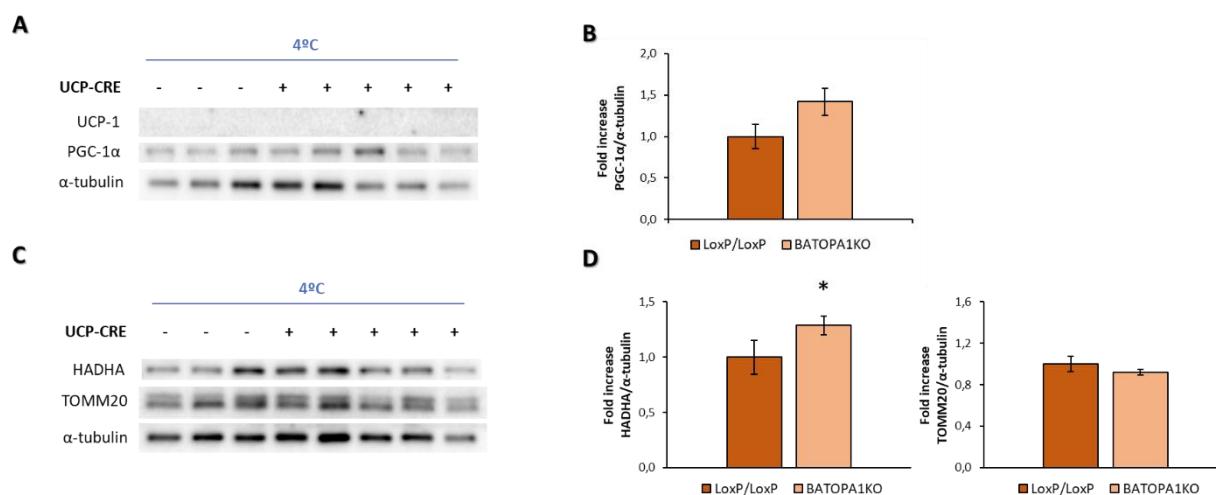


Figura 4.35 Estudio proteico de la activación termogénica, biogénesis mitocondrial y de contenido mitocondrial en eWAT del modelo BATOPA1KO tras la exposición al frío. **(A)** Inmunoblot representativo de UCP-1 y PGC-1α en homogeneizados de eWAT en ratones LoXP/LoXP y BATOPA1KO. **(B)** Cuantificación de la expresión de PGC-1 α en el grupo control (n=3) y en el modelo BATOPA1KO (n=5). **(C)** Inmunoblot representativo de HADHA y TOMM-20 en homogeneizados de eWAT en ratones LoXP/LoXP y BATOPA1KO. **(D)** Cuantificación de la expresión de dichas proteínas en el grupo control (n=3) y el grupo BATOPA1KO (n=5). Se empleó α-tubulina como control de carga. La significación estadística se evaluó por la prueba t-Student de dos colas y muestras desapareadas, y se representó como * $p < 0,05$ vs. ratones LoXP/LoXP.

Posteriormente, se evaluó la dinámica mitocondrial y mitofagia del compartimento epididimal blanco (eWAT) tras la exposición al frío. Los resultados obtenidos del análisis proteico no revelaron ninguna diferencia entre los animales LoXP/LoXP y *knock-out* en cuanto a la plasticidad mitocondrial (Figura 4.36B), de igual modo que no mostraron cambios sobre la actividad de la mitofagia aunque se observó una ligera disminución de la expresión de LC3B-II (Figura 4.36D). Por ello, no se pudo determinar el estado mitocondrial de eWAT en el modelo BATOPA1KO tras la exposición al frío.

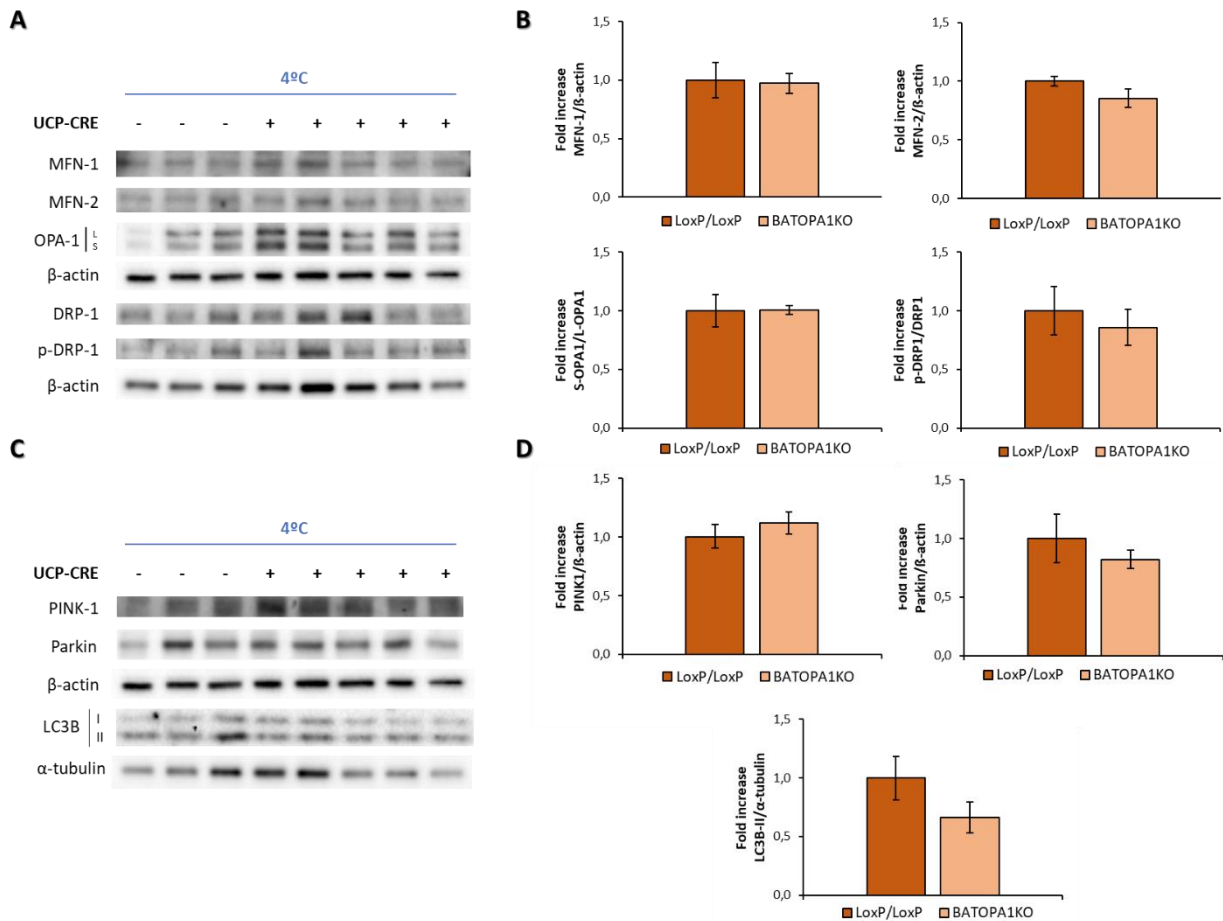


Figura 4.36 Estudio proteico de la dinámica mitocondrial y mitofagia en eWAT del modelo BATOPA1KO tras la exposición al frío. **(A)** Inmunoblot representativo de proteínas de dinámica mitocondrial en homogeneizados de eWAT en ratones LoXP/LoXP y BATOPA1KO. **(B)** Cuantificación de la expresión de dichas proteínas en el grupo control (n=3) y el grupo BATOPA1KO (n=5). **(C)** Inmunoblot representativo de proteínas involucradas en la mitofagia en homogeneizados de eWAT en ratones LoXP/LoXP y BATOPA1KO. **(D)** Cuantificación de la expresión de dichas proteínas en el grupo control (n=3) y el grupo BATOPA1KO (n=5). Se empleó β-actina y α-tubulina como controles de carga.

4.2.5 Evaluación de la activación prolongada vía farmacológica de la termogénesis adaptativa en el modelo BATOPA1KO

Se ha descrito en la bibliografía que el órgano adiposo presenta receptores β3-adrenérgicos que pueden estimular una respuesta termogénica a través del sistema nervioso simpático (Cao *et al.*, 2004) y, además, se ha visto que promueve el proceso de *browning* en los compartimentos de grasa blanca (Loncar, Afzelius & Cannon, 1988; Wang *et al.*, 2013). Asimismo, estudios recientes sobre la acción del agonista β3-adrenérgico CL-316243 han mostrado un aumento en la actividad metabólica de iBAT tras la estimulación adrenérgica crónica, indicando su uso como un estímulo similar al frío (Labbé *et al.*, 2016).

Como hemos observado previamente en el **apartado 4.2.2**, el modelo BATOPA1KO se adapta en el estímulo del frío durante un periodo de 12 horas. Puesto que esta duración se puede considerar como una situación aguda, se examinó el papel de OPA-1 en una termogénesis adaptativa inducida farmacológicamente prolongada en el tiempo. Para ello, se utilizó el mismo modelo animal carente de la proteína de fusión interna OPA-1 específicamente en el tejido adiposo marrón (BATOPA1KO) a una edad de 5 meses. Durante los 14 días previos al sacrificio, se administró intraperitonealmente el agonista β_3 -adrenérgico *CL-316243* a una dosis de 1 mg/kg/día y se usó suero salino como control del tratamiento.

El primer tejido examinado en este experimento fue el tejido adiposo marrón interescapular (**iBAT**). En el análisis proteico de la activación termogénica y del contenido mitocondrial se observó un ligero aumento de la expresión de UCP-1 en el modelo BATOPA1KO tratado con CL-316243 comparado con el control sin tratar, efecto que no sucedió en los animales LoxP/LoxP (**Figura 4.37B**). Igualmente, se determinó un incremento significativo de la proteína de membrana externa mitocondrial TOMM-20 y un ligero aumento de la expresión de HADHA en el grupo *knock-out* tratado con CL-316243 comparado con los animales *knock-out* con suero salino (**Figura 4.37D**). Sin embargo, los datos mostraron una disminución significativa en la expresión de TOMM-20 del grupo BATOPA1KO comparado con el grupo control, ambos sin tratar (**Figura 4.37D**).

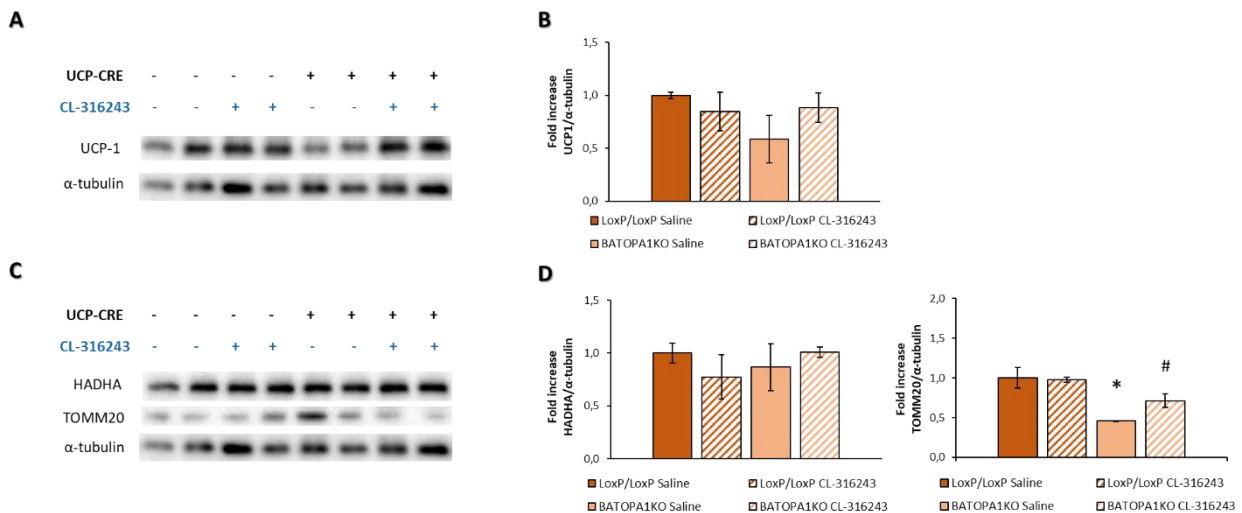


Figura 4.37 Estudio proteico de la activación termogénica y de contenido mitocondrial en iBAT del modelo BATOPA1KO tras el tratamiento con el agonista β_3 -adrenérgico CL-316243. (A) Inmunoblot representativo de UCP-1 en homogeneizados de iBAT en ratones LoxP/LoxP sin tratar (n=2), tratados con CL-316243 (n=2), ratones BATOPA1KO sin tratar (n=2) y tratados con CL-316243 (n=2). **(B)** Cuantificación de la expresión de UCP-1 en el grupo control sin tratar (n=2), grupo control tratado con CL-316243 (n=2), en el modelo BATOPA1KO sin tratar (n=2) y tratado con CL-316243 (n=2). **(C)** Inmunoblot representativo de HADHA y TOMM-20 en homogeneizados de iBAT en ratones sin tratar (n=2), tratados con CL-316243 (n=2), ratones BATOPA1KO sin tratar (n=2) y tratados con CL-316243 (n=2). **(D)** Cuantificación de la expresión de dichas proteínas en el grupo control sin tratar (n=2), grupo control tratado con CL-316243 (n=2), en el modelo BATOPA1KO sin tratar (n=2) y tratado con CL-316243 (n=2). Se empleó α -tubulina como control de carga. La significación estadística se evaluó por la prueba t-Student de dos colas y muestras desapareadas, y se representó como * p < 0,05 vs. ratones LoxP/LoxP Saline y # p < 0,05 vs. ratones BATOPA1KO Saline.

A continuación, se analizó el efecto del agonista β 3-adrenérgico *CL-316243* en el estado mitocondrial y la activación de la mitofagia del iBAT perteneciente al modelo BATOPA1KO. Los resultados determinaron una disminución significativa de los marcadores de fusión MFN-1 y MFN-2 que se acompañó de un incremento altamente significativo de la proteína de fisión p-DRP-1 en el modelo BATOPA1KO comparado con el grupo LoxP/LoxP de manera basal, es decir, sin el tratamiento con el agonista (**Figura 4.38B**). Al tratar los animales *knock-out* con *CL-316243*, se observó un ligero aumento en la expresión de las mitofusinas, siendo prácticamente significativo en el caso de MFN-2, y un descenso significativo en la expresión de p-DRP-1 cuando se comparó con el grupo BATOPA1KO tratado con suero salino (**Figura 4.38B**). No obstante, existió una ligera disminución de todos los parámetros de dinámica mitocondrial en el grupo control tratado con *CL-316243* comparado con el grupo LoxP/LoxP sin tratar, siendo más clara en la expresión de MFN-1 (**Figura 4.38B**).

Respecto al estudio proteico del mecanismo de control mitocondrial, pareció incrementarse la expresión de los marcadores mitofágicos PINK-1 y Parkina, al igual que se observó un aumento significativo de la expresión de la proteína adaptadora p62 involucrada en la autofagia en el modelo BATOPA1KO cuando fue tratado con el agonista β 3-adrenérgico comparado con los ratones *knock-out* sin tratar (**Figura 4.38 D**). Esta tendencia a la alta de los marcadores mitofágicos se advirtió en el grupo control tratado con *CL-316243* comparado con los animales sin tratar (**Figura 4.38D**). Además, al comparar los grupos tratados con suero salino, tanto control como el carente de OPA-1, se percibió un ligero descenso de la expresión de todos los marcadores mito- y autofágicos siendo significativo este en la expresión de p62 (**Figura 4.38D**).

Para dilucidar el estado mitocondrial del iBAT tras la estimulación β 3-adrenérgica con *CL-316243*, se tomaron imágenes de microscopía electrónica. Este estudio indicó un ligero aumento en el número de mitocondrias de los grupos tratados con el agonista β 3-adrenérgico pero no se observaron diferencias entre los animales LoxP/LoxP y el modelo BATOPA1KO (**Figura 4.39B**), lo que podría indicar que la mitofagia no se encuentra sobreestimulada tras el tratamiento con el agonista en el modelo BATOPA1KO comparado con el grupo control. Asimismo, se determinó un aumento del tamaño de las mitocondrias en los animales carentes de OPA-1 comparados con LoxP/LoxP, viéndose incrementada el área mitocondrial cuando eran tratados con *CL-316243* (**Figura 4.39C**). Estos datos combinados con los obtenidos del análisis proteico de dinámica mitocondrial sugieren un estado fisionado en el modelo BATOPA1KO de manera basal que, tras el tratamiento con el agonista β 3-adrenérgico *CL-316243*, se produce una elongación o aumento del tamaño de las mitocondrias. Es decir, la fusión mitocondrial se ve favorecida por la acción β 3-adrenérgica cuando OPA-1 no está presente. Nuevamente, la calidad de las imágenes tomadas no permitió el análisis de las crestas mitocondriales.

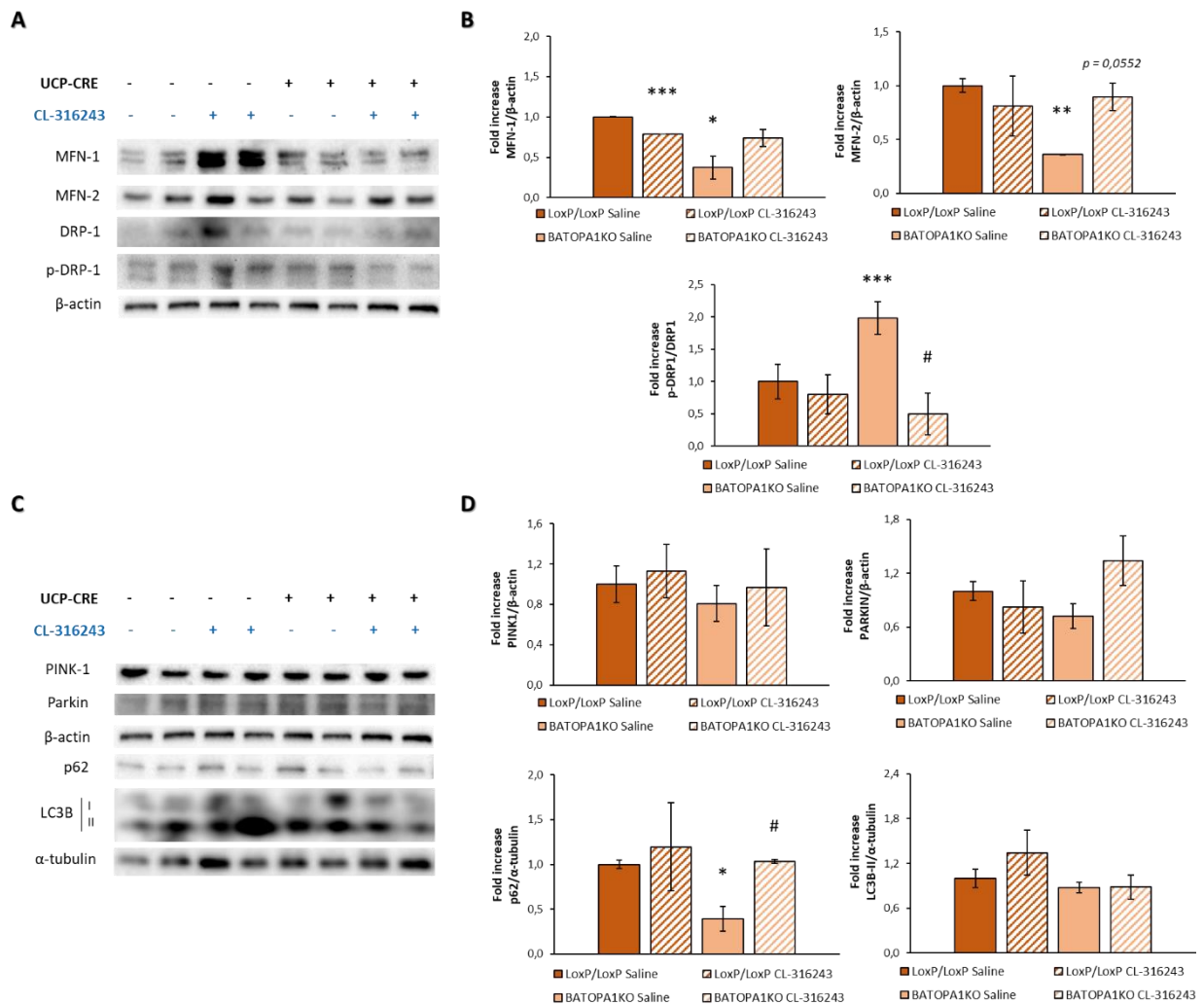


Figura 4.38 Estudio proteico de la dinámica mitocondrial y mitofagia en iBAT del modelo BATOPA1KO tras el tratamiento con el agonista β 3-adrenérgico CL-316243. (A) Inmunoblot representativo de proteínas de dinámica mitocondrial en homogeneizados de iBAT en ratones LoxP/LoxP y BATOPA1KO, tratados con CL-316243 y con suero salino. **(B)** Cuantificación de la expresión de dichas proteínas en el grupo control sin tratar ($n=2$), tratado con CL-316243 ($n=2$), grupo BATOPA1KO sin tratar ($n=2$) y tratado con CL-316243 ($n=2$). **(C)** Inmunoblot representativo de proteínas involucradas en la mitofagia en homogeneizados de iBAT en ratones LoxP/LoxP y BATOPA1KO, tratados con CL-316243 y con suero salino. **(D)** Cuantificación de la expresión de dichas proteínas en el grupo control sin tratar ($n=2$), tratado con CL-316243 ($n=2$), grupo BATOPA1KO sin tratar ($n=2$) y tratado con CL-316243 ($n=2$). Se empleó β -actina y α -tubulina como controles de carga. La significación estadística se evaluó por la prueba t-Student de dos colas y muestras desapareadas, y se representó como * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$ vs. ratones LoxP/LoxP Saline; y # $p < 0,05$ y $p = 0,0552$ vs. ratones BATOPA1KO Saline.

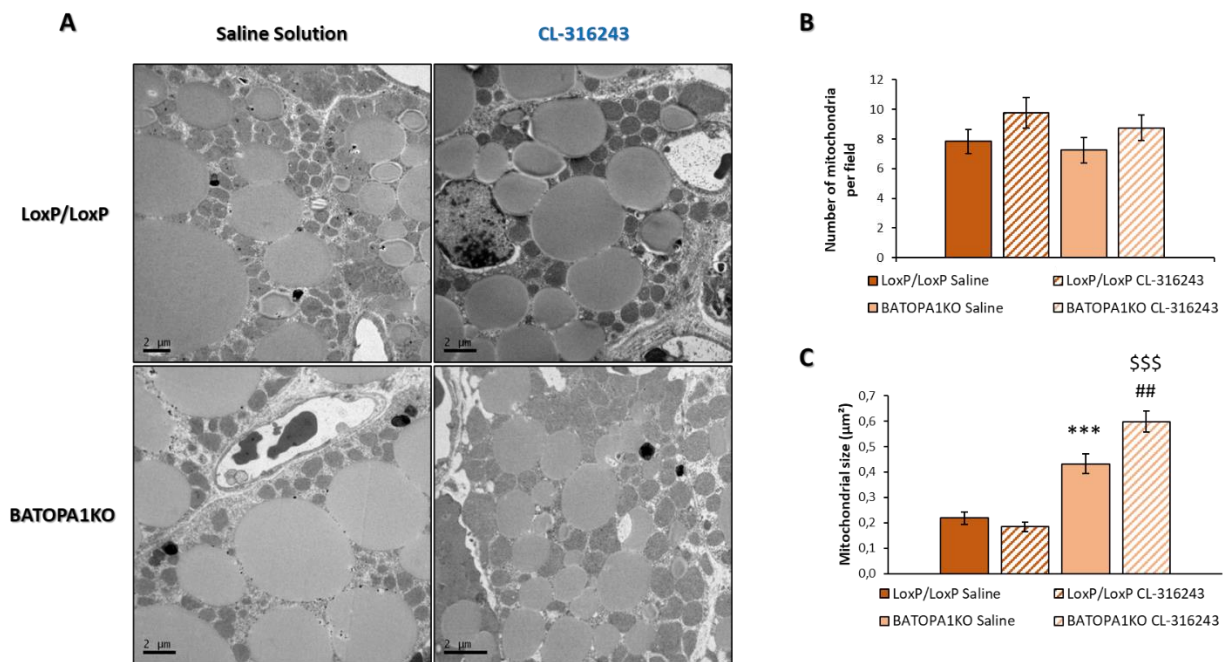


Figura 4.39 Estudio mitocondrial en el modelo BATOPA1KO tras el tratamiento con el agonista β 3-adrenérgico CL-316243. **(A)** Imágenes representativas de microscopía electrónica tomadas de iBAT pertenecientes al grupo control tratado con suero salino y CL-316243, y al grupo BATOPA1KO tratado con suero salino y CL-316243. **(B)** Cuantificación del número de mitocondrias en fotografías de microscopía electrónica del grupo control sin tratar (n=2), tratado con CL-316243 (n=2), grupo BATOPA1KO sin tratar (n=2) y tratado con CL-316243 (n=2). **(C)** Cuantificación del tamaño de mitocondrias en μm^2 en fotografías de microscopía electrónica del grupo control sin tratar (n=2), tratado con CL-316243 (n=2), grupo BATOPA1KO sin tratar (n=2) y tratado con CL-316243 (n=2). Los resultados se expresaron como media \pm SEM. Los resultados se expresaron como media \pm SEM. La significación estadística se evaluó por la prueba t-Student de dos colas y muestras desapareadas, y se representó como *** $p < 0,001$ vs. ratones LoxP/LoxP Saline; ## $p < 0,01$ vs. ratones BATOPA1KO Saline; y \$\$\$ $p < 0,001$ vs. ratones LoxP/LoxP CL-316243.

Por último, se evaluó la actividad lipolítica presente en iBAT del modelo BATOPA1KO tras la estimulación del tejido con el agonista β 3-adrenérgico CL-316243. Para ello, se determinó la acumulación de lípidos mediante la tinción de Oil Red-O, lo que mostró una disminución significativa del área teñida con esta técnica en los grupos tratados con el agonista, tanto en animales LoxP/LoxP como *knock-out* (Figura 4.40B), lo que sugirió una activación de la lipólisis favorecida por la acción del β 3-adrenérgico CL-316243. No obstante, la acumulación de lípidos fue significativamente mayor en el modelo BATOPA1KO comparado con el grupo control, ambos tratados con el agonista (Figura 4.40B), indicando así la posibilidad de que OPA-1 sea necesaria para el correcto funcionamiento de la lipólisis.

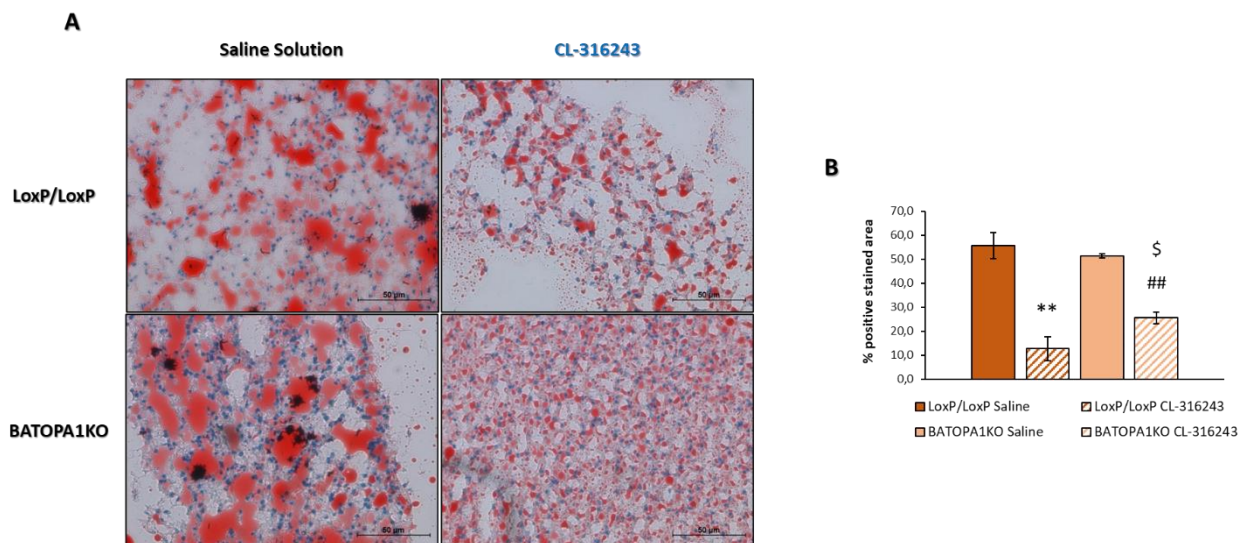


Figura 4.40 Evaluación de la actividad lipolítica en el modelo BATIGA1RKO tras el tratamiento con el agonista β 3-adrenérgico CL-316243. **(A)** Imágenes representativas de la tinción Oil Red-O, marcaje de lípidos, en iBAT del grupo control LoxP/LoxP tratado con suero salino y CL-316243, y del grupo BATOPA1KO tratado con suero salino y CL-316243. **(B)** Cuantificación de las imágenes de la tinción de Oil Red-O en animales LoxP/LoxP sin tratar (n=2), tratados con CL-316243 (n=2), animales BATOPA1KO sin tratar (n=2) y tratados con CL-316243 (n=2). Los resultados se expresaron como media \pm SEM. La significación estadística se evaluó por la prueba t-Student de dos colas y muestras desapareadas, y se representó como ** p < 0,01 vs. ratones LoxP/LoxP Saline; ## p < 0,01 vs. ratones BATOPA1KO Saline; y \$ p < 0,05 vs. ratones LoxP/LoxP CL-316243.

A continuación, y puesto que el agonista β 3-adrenérgico CL-316243 promueve el proceso de *browning* en los tejidos adiposos blancos (Labbé *et al.*, 2016), se analizó el compartimento inguinal (iWAT) del modelo BATOPA1KO tras el tratamiento con este estímulo termogénico. Los datos obtenidos evidenciaron un proceso de marronización dependiente de UCP-1 en los animales tratados con CL-316243 (Figura 4.41B), que se acompañó de un aumento significativo en la expresión de la proteína mitocondrial HADHA en los mismos grupos (Figura 4.41D). Este incremento significativo también se observó en la expresión de TOMM-20 en el modelo BATOPA1KO tratado con el agonista β 3-adrenérgico cuando se comparó con el grupo control también tratado con CL-316243 y los animales BATOPA1KO sin tratar (Figura 4.41D).

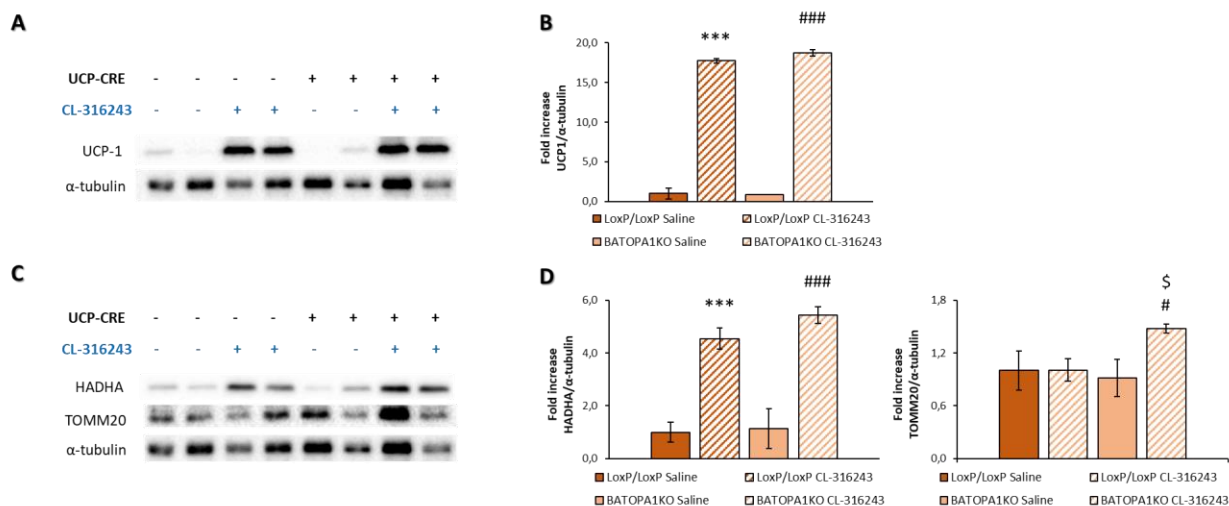


Figura 4.41 Estudio proteico de la activación termogénica y de contenido mitocondrial en iWAT del modelo BATOPA1KO tras el tratamiento con el agonista β 3-adrenérgico CL-316243. **(A)** Inmunoblot representativo de UCP-1 en homogeneizados de iWAT en ratones LoxP/LoxP tratados con suero salino y CL-316243, y en ratones BATOPA1KO tratado con suero salino y CL-316243. **(B)** Cuantificación de la expresión de UCP-1 en animales LoxP/LoxP sin tratar (n=2), tratados con CL-316243 (n=2), animales BATOPA1KO sin tratar (n=2) y tratados con CL-316243 (n=2). **(C)** Inmunoblot representativo de HADHA y TOMM-20 en homogeneizados de iWAT en ratones LoxP/LoxP tratados con suero salino y CL-316243, y en ratones BATOPA1KO tratado con suero salino y CL-316243. **(D)** Cuantificación de la expresión de HADHA y TOMM-20 en animales LoxP/LoxP sin tratar (n=2), tratados con CL-316243 (n=2), animales BATOPA1KO sin tratar (n=2) y tratados con CL-316243 (n=2). Se empleó α -tubulina como control de carga. Los resultados se expresaron como media \pm SEM. La significación estadística se evaluó por la prueba t-Student de dos colas y muestras desapareadas, y se representó como *** $p < 0,001$ vs. ratones LoxP/LoxP Saline; # $p < 0,05$ y ### $p < 0,001$ vs. ratones BATOPA1KO Saline; y \$ $p < 0,05$ vs. ratones LoxP/LoxP CL-316243.

Respecto al estudio de la dinámica mitocondrial en iWAT, el tratamiento con el agonista β 3-adrenérgico CL-316243 mostró un incremento de todos los marcadores mitocondriales en ambos grupos (**Figura 4.42B**) y pareció promoverse un estado fusionado de las mitocondrias debido al aumento significativo de las proteínas de fusión en el grupo BATOPA1KO tratado con CL-316243 comparado con los animales BATOPA1KO sin tratar (**Figura 4.42B**). Por otro lado, no se encontraron diferencias entre todos los grupos estudiados en el análisis proteico de la mito- y autofagia (**Figura 4.42D**). No obstante, en el grupo LoxP/LoxP tratado con el agonista β 3-adrenérgico se determinó un incremento significativo de la expresión de la forma lipidada de LC3B cuando se comparó con los animales control sin tratar (**Figura 4.42D**).

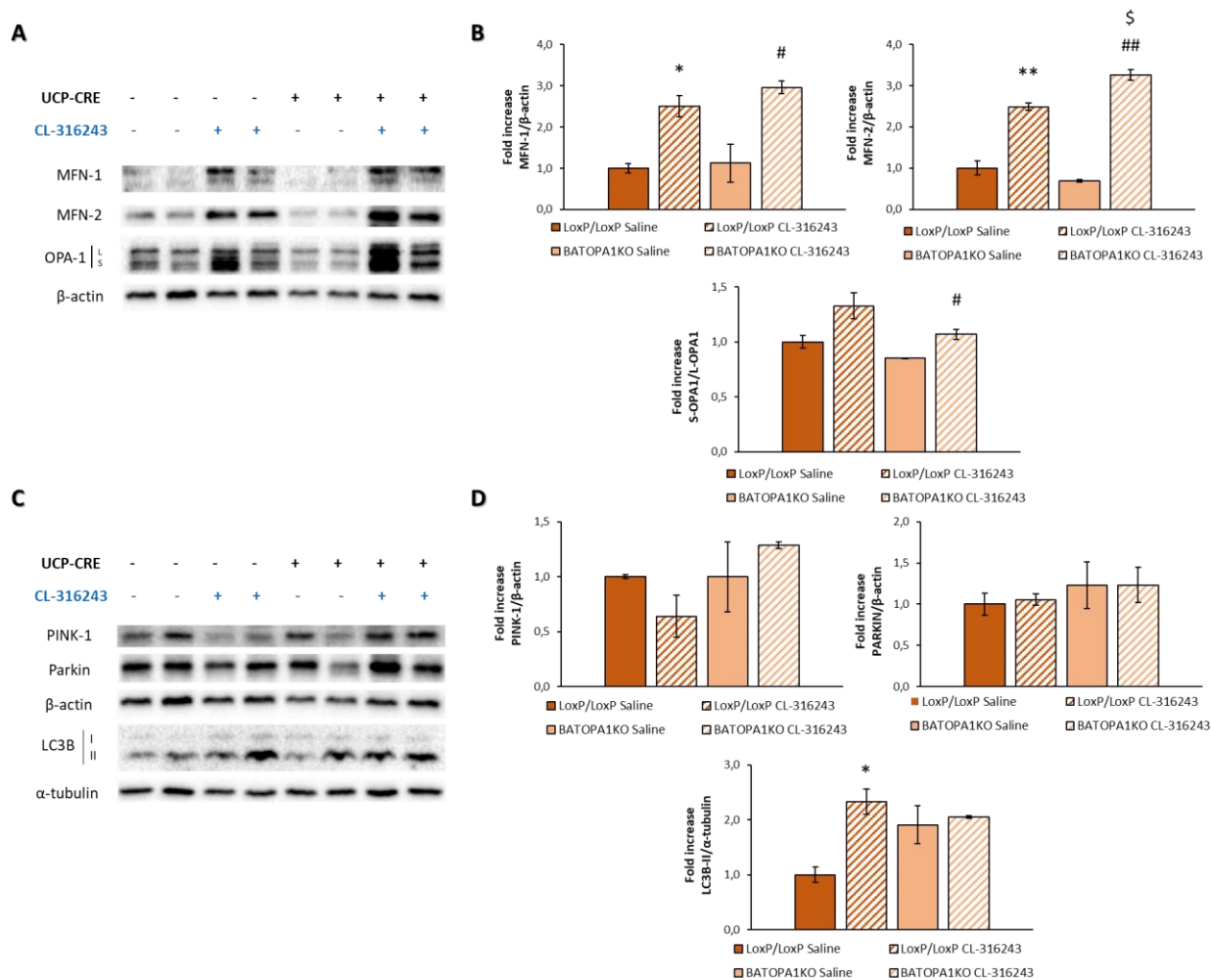


Figura 4.42 Estudio proteico de la dinámica mitocondrial y mitofagia en iWAT del modelo BATOPA1KO tras el tratamiento con el agonista β 3-adrenérgico CL-316243. (A) Inmunoblot representativo de las proteínas implicadas en la fusión mitocondrial en homogeneizados de iWAT en ratones LoxP/LoxP tratados con suero salino y CL-316243, y en ratones BATOPA1KO tratado scon suero salino y CL-316243. **(B)** Cuantificación de la expresión de dichas proteínas en animales LoxP/LoxP sin tratar (n=2), tratados con CL-316243 (n=2), animales BATOPA1KO sin tratar (n=2) y tratados con CL-316243 (n=2). **(C)** Inmunoblot representativo de los marcadores de mitofagia en homogeneizados de iWAT en ratones LoxP/LoxP tratados con suero salino y CL-316243, y en ratones BATOPA1KO tratado scon suero salino y CL-316243. **(D)** Cuantificación de la expresión de dichas proteínas en animales LoxP/LoxP sin tratar (n=2), tratados con CL-316243 (n=2), animales BATOPA1KO sin tratar (n=2) y tratados con CL-316243 (n=2). Se empleó β -actina y α -tubulina como controles de carga. Los resultados se expresaron como media \pm SEM. La significación estadística se evaluó por la prueba t-Student de dos colas y muestras desapareadas, y se representó como * p < 0,05 y ** p < 0,01 vs. ratones LoxP/LoxP Saline; # p < 0,05 y ## p < 0,01 vs. ratones BATOPA1KO Saline; y \$ p < 0,05 vs. ratones LoxP/LoxP CL-316243.

4.2.6 Efecto de la delección de MFN1 en la termogénesis adaptativa: estudio preliminar

Para finalizar, se generó el modelo carente de MFN-1 específicamente en el tejido adiposo marrón (BATMFN1KO) para continuar con el estudio de la contribución de la fusión mitocondrial en la termogénesis adaptativa. En este caso, se utilizaron machos de una edad aproximada de 5 meses que posteriormente fueron expuestos al frío durante 12 horas.

En primer lugar, se evaluó el perfil glucídico de dichos animales para determinar si la delección de MFN1 en BAT alteraba la homeostasis glucídica. Los resultados mostraron una menor sensibilidad a glucosa que no fue significativa (**Figura 4.43A**) y una ligera resistencia a insulina en el modelo BATMFN1KO comparado con el grupo control (**Figura 4.43B**).

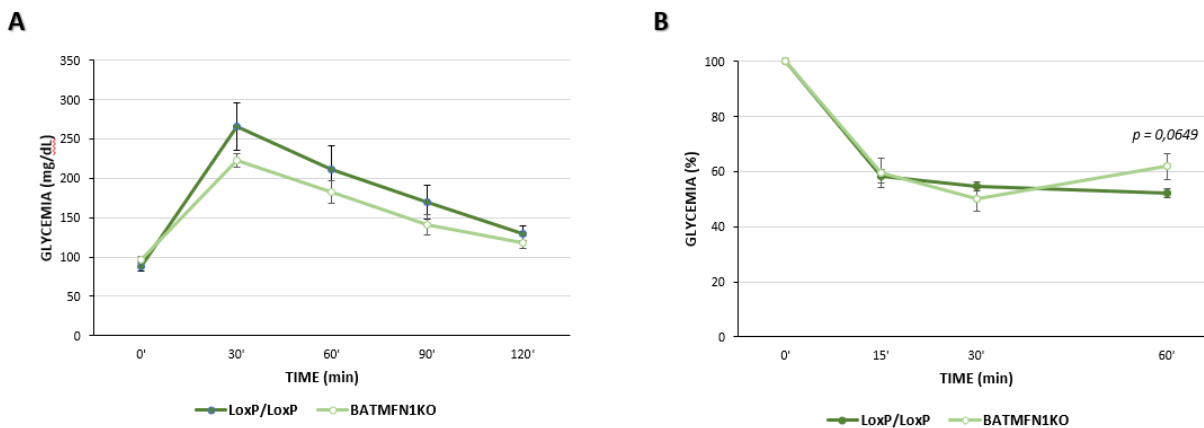


Figura 4.43 Perfil glucídico basal del modelo BATMFN1KO. Curvas obtenidas de los (A) test de tolerancia a glucosa (GTT) representada en mg/dL de glucosa en sangre y (B) test de tolerancia a insulina (ITT) representada en porcentaje (%) en animales LoxP/LoxP (n=6) y BATMFN1KO (n=4). Los resultados se expresaron como media \pm SEM. Los resultados se expresaron como media \pm SEM. La significación estadística se evaluó por la prueba t-Student de dos colas y muestras desapareadas, y se representó como $p = 0,0649$ vs. ratones LoxP/LoxP.

A continuación, el modelo BATMFN1KO se expuso al frío (4°C) durante 12 horas para determinar la capacidad de adaptación termogénica que este presenta. Pese a que el modelo BATMFN1KO mostró una temperatura basal significativamente más alta que el grupo control, este disminuyó su temperatura corporal tras el transcurso de las 5 primeras horas y la mantuvo alrededor de 33°C hasta el final del experimento (**Figura 4.44A**). Cuando se comparó con la adaptación termogénica de los ratones LoxP/LoxP, los animales carentes de MFN-1 evidenciaron una temperatura significativamente más baja (**Figura 4.44A**), sugiriendo que la delección de MFN-1 provoca una peor adaptación al frío.

Asimismo, no se encontraron diferencias entre los pesos corporales de ambos grupos (**Figura 4.44B**) aunque sí una ligera disminución del tamaño de iBAT en el modelo BATMFN1KO comparado con los animales LoxP/LoxP (**Figura 4.44C** y **4.44D**), que podría relacionarse con el empeoramiento de la adaptación termogénica del modelo *knock-out*.

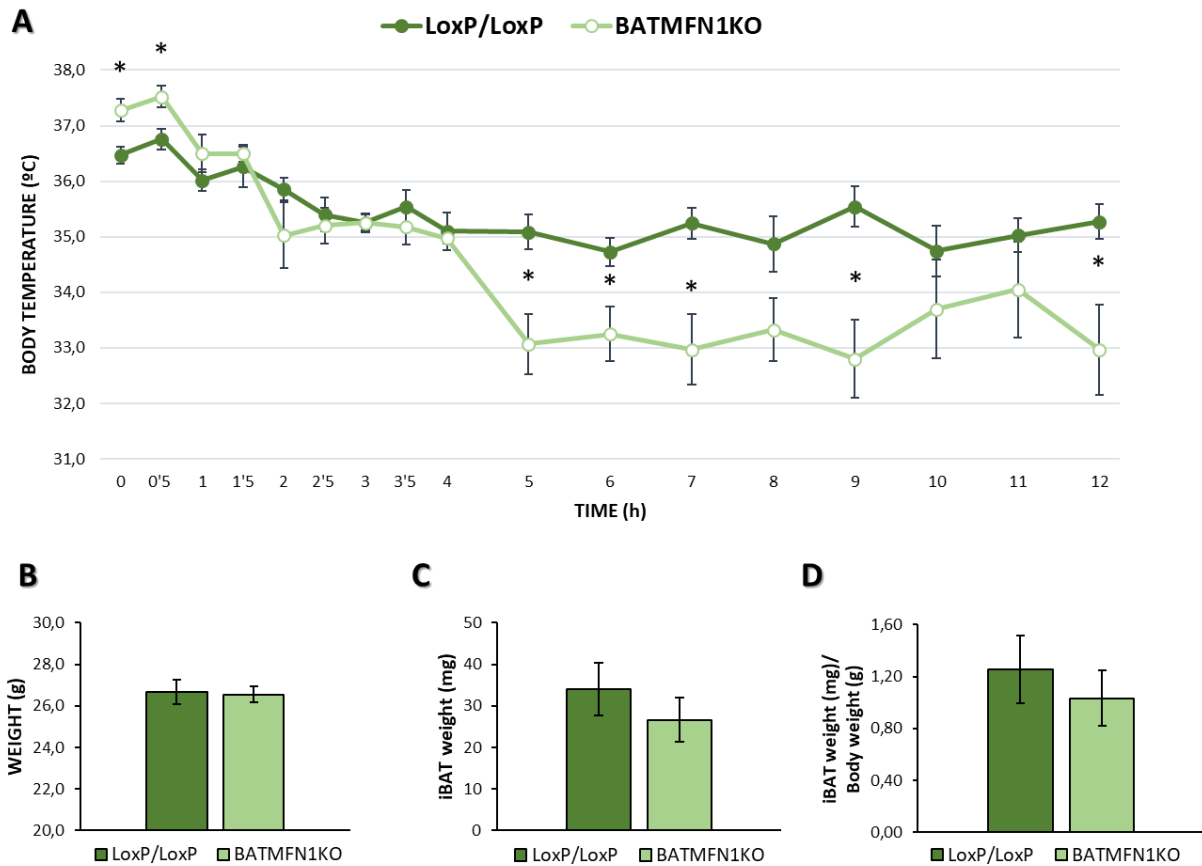


Figura 4.44 Adaptación termogénica del modelo BATMFN1KO. (A) Representación gráfica de las temperaturas corporales durante las 12 horas de exposición al frío en animales LoxP/LoxP (n=6) y en el modelo BATMFN1KO (n=4). (B) Histograma del peso corporal en gramos (g) del grupo control y el modelo BATMFN1KO. (C) Histograma del peso en miligramos (mg) del depósito interescapular del tejido adiposo marrón (iBAT) en el grupo control (n=6) y en el grupo *knock-out* (n=4). (D) Representación gráfica del peso de iBAT corregido por el peso corporal. Los resultados se expresaron como media \pm SEM. La significación estadística se evaluó por la prueba t-Student de dos colas y muestras desapareadas, y se representó como * = $p < 0,05$ vs. ratones LoxP/LoxP.

El estudio proteico preliminar de la activación de la termogénesis mediada por UCP-1 junto con el análisis del contenido mitocondrial sugirió un tenue aumento de la expresión de ambas proteínas (Figura 4.45B y 4.45D). Por otro lado, la expresión de las proteínas involucradas en la fusión mitocondrial (MFN-2 y OPA-1) se observó ligeramente incrementada en el modelo BATMFN1KO comparado con los animales LoxP/LoxP, lo que se acompañó de un leve descenso en la expresión de la proteína de fisión p-DRP-1 (Figura 4.46B). Además, los marcadores de mitofagia PINK-1 y Parkina también mostraron un ligero aumento en su expresión en el ratón *knock-out* comparado con los animales LoxP/LoxP (Figura 4.46D).

Puesto que el número de ratones por grupo no es el adecuado, no se pueden sacar conclusiones claras de dicho experimento.

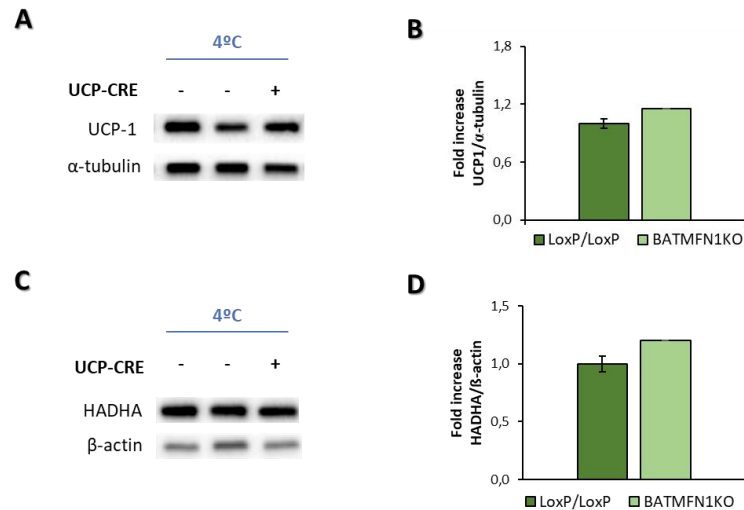


Figura 4.45 Estudio proteico de la activación termogénica y del contenido mitocondrial en iBAT del modelo BATMFN1KO tras la exposición al frío. **(A)** Inmunoblot representativo de UCP-1 en homogeneizados de iBAT en ratones LoXP/LoXP y BATMFN1KO. **(B)** Cuantificación de la expresión de UCP-1 en el grupo control (n=6) y en el modelo BATMFN1KO (n=1). **(C)** Inmunoblot representativo de HADHA en homogeneizados de iBAT en ratones LoXP/LoXP y BATMFN1KO. **(D)** Cuantificación de la expresión de dichas proteínas en el grupo control (n=6) y el grupo BATMF1KO (n=1). Se empleó α-tubulina y β-actina como controles de carga. Los resultados se expresaron como media ± SEM.

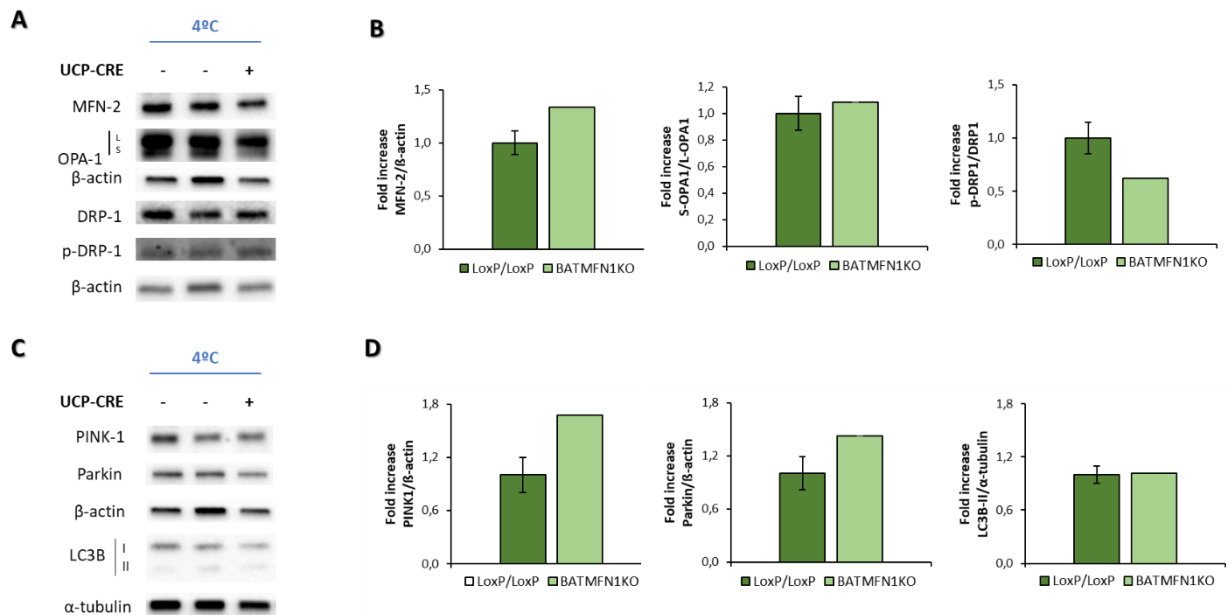


Figura 4.46 Estudio proteico de la dinámica mitocondrial y mitofagia en iBAT del modelo BATMFN1KO tras la exposición al frío. **(A)** Inmunoblot representativo de las proteínas implicadas en la dinámica mitocondrial en homogeneizados de iBAT en ratones LoXP/LoXP y BATMFN1KO. **(B)** Cuantificación de la expresión de dichas proteínas en el grupo control (n=6) y en el modelo BATMFN1KO (n=1). **(C)** Inmunoblot representativo de las proteínas involucradas en la mitofagia en homogeneizados de iBAT en ratones LoXP/LoXP y BATMFN1KO. **(D)** Cuantificación de la expresión de dichas proteínas en el grupo control (n=6) y el grupo BATMF1KO (n=1). Se empleó α-tubulina y β-actina como controles de carga. Los resultados se expresaron como media ± SEM.

4.3 EVALUACIÓN DE DIFERENTES COMPUESTOS DESACOPLANTES MITOCONDRIALES COMO NUEVOS ACTIVADORES SUGERIDOS DE UCP-1

En los últimos años se ha demostrado que la generación de calor mediada por la proteína desacoplante UCP-1 no es el único mecanismo termogénico en BAT aunque se considera el canónico en el mantenimiento de la homeotermia (Sakers *et al.*, 2022). De esta manera, es importante comprender por completo el método de acción de UCP-1 para la búsqueda de nuevos procesos que contribuyan en la termogénesis adaptativa y que puedan ser utilizados como dianas terapéuticas debido a que los tratamientos basados en la activación de dicha proteína no han resultado ser seguros.

En este proyecto, se utilizaron mitocondrias aisladas de ratones *knock-out* de manera constitutiva de UCP-1 (UCP1-KO) y que fueron comparadas con las correspondientes aisladas de los animales *wild-type* (WT). Con este modelo, se examinó hasta qué punto la presencia de UCP-1 afectaba a la respuesta termogénica de estas mitocondrias ante la acción de diferentes agentes desacoplantes, tales como la carbonilcianida-4trifluorometoxifenilhidrazona (FCCP) y el 2,4-dinitrofenol (DNP).

Recientemente, se ha propuesto que tanto FCCP como DNP funcionan a través de la activación de UCP-1 pero esta teoría sólo se ha basado mediante la realización de la técnica de *patch-clamp* (Bertholet *et al.*, 2022). Para establecer que esto explica realmente el proceso de desacoplamiento clásico inducido por estas moléculas, se valoró realizar de nuevo comparaciones directas entre mitocondrias de grasa parda de ratones WT que expresan UCP-1 y de ratones con UCP-1 inactivada. Ya se habían realizado algunos experimentos de este tipo con FCCP en el laboratorio del Prof. Dr. Jan Nedergaard y la Prof. Dra. Barbara Cannon en el instituto Wenner-Gren de la Universidad de Estocolmo (Suecia), lo que demostró la viabilidad de abordar esta cuestión con este método, pero no se había indagado en el mecanismo de acción del DNP y si este funciona de forma similar al FCCP.

Con este estudio, se espera poder avanzar en la comprensión de la función de la UCP-1, con implicaciones en cuestiones como la termogénesis inducida por la dieta y, por tanto, en el intento de retrasar el desarrollo de obesidad.

Para ello, se realizaron varios estudios en paralelo sobre la respiración de mitocondrias aisladas del modelo murino UCP1-KO de una edad aproximada a 7-9 semanas y mantenidos en 21°C durante una semana. Primero, se determinaron diferentes parámetros que miden la cantidad y calidad en el aislamiento mitocondrial. Estos resultados mostraron un aumento en el tamaño de los depósitos de tejido adiposo marrón (BAT) en el grupo *knock-out* comparado con los animales WT (**Figura 4.47A**) y se determinó que el rendimiento del aislamiento mitocondrial fue mayor en el modelo UCP1-KO comparado con el grupo control

(Figura 4.47B). Por último, no se encontraron cambios en la concentración mitocondrial en la grasa parda comparando ambos grupos de ratones (Figura 4.47C). Todo ello demostró una hipertrofia del tejido adiposo marrón ante la ausencia de UCP-1 en el tejido adiposo marrón que no conllevaba una pérdida de mitocondrias.

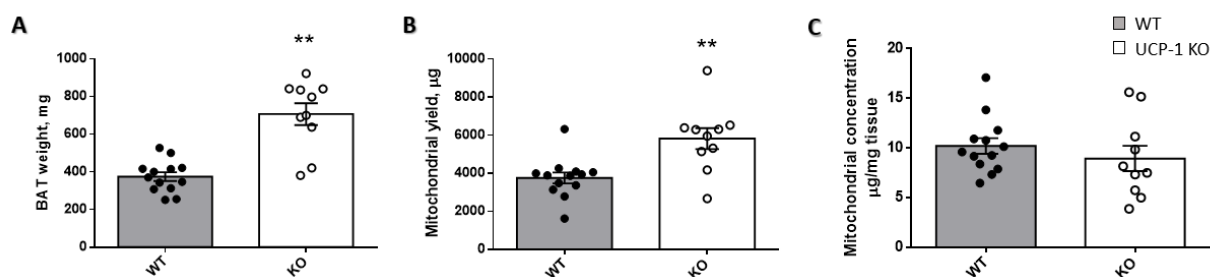


Figura 4.47 Parámetros de calidad mitocondrial en el modelo UCP1-KO. (A) Histograma de peso en mg de todos los depósitos de grasa parda en animales *wild-type* (n=13) y UCP1-KO (n=10). (B) Histograma representativo del rendimiento del aislamiento mitocondrial en µg en animales *wild-type* (n=13) y UCP1-KO (n=10). (C) Histograma de la concentración de mitocondrias por peso de tejido adiposo marrón en animales *wild-type* (n=13) y UCP1-KO (n=10). Los resultados se expresaron como media ± SEM. La significación estadística se evaluó por la prueba t-Student de dos colas y muestras desapareadas, y se representó como ** p < 0,01 vs. ratones WT.

4.3.1 Acción dependiente de UCP-1 de oleato en la respiración mitocondrial y el potencial de membrana

Los ácidos grasos de cadena larga son los activadores alostéricos más aceptados de UCP-1 y se ha propuesto un modelo de activación en el que estos compiten directamente por el sitio de unión con los nucleótidos de purina desplazándolos y provocando el cambio de conformación activo de UCP-1 (Shabalina *et al.*, 2004). Para este estudio, se valoró la acción del oleato en la respiración de mitocondrias aisladas de grasa parda como control de dependencia de la actividad de UCP-1. El oleato es un anión de ácido graso C18 monoinsaturado de cadena larga, y la base conjugada del ácido oleico que surge como consecuencia de la desprotonación del grupo del ácido carboxílico. En estos experimentos se utilizó oleato sódico (Figura 4.48D).

Los datos de respiración mitocondrial mostraron que la actividad del oleato era dependiente de UCP-1 puesto que la respiración máxima se alcanzaba antes en el grupo WT que en los animales UCP1-KO (Figura 4.48A y 4.48B). Además, se observó un desplazamiento de la acción de este ácido graso cuando la concentración de GDP era mayor en los ratones WT y, por tanto, la inhibición de UCP-1 era más eficaz (Figura 4.48C).

Comparativamente, las mitocondrias aisladas de los animales WT presentaron una mayor sensibilidad al oleato, en relación con el diferencial de la respiración mitocondrial tras la inhibición de UCP-1 por GDP, que el grupo UCP1-KO (Figura 4.49A). Igualmente, la respiración disminuyó significativamente en el grupo WT cuando se inhibía la UCP-1 con una concentración más alta de GDP (3mM) (Figura

4.49B) y se mantuvo en las mitocondrias aisladas de los ratones UCP1-KO independientemente de la adición de GDP, ya que no expresan UCP-1 (Figura 4.49C). Todo esto remarcaría la competencia directa con los nucleótidos de purina por el sitio de unión de UCP-1 que presentan los ácidos grasos de cadena larga.

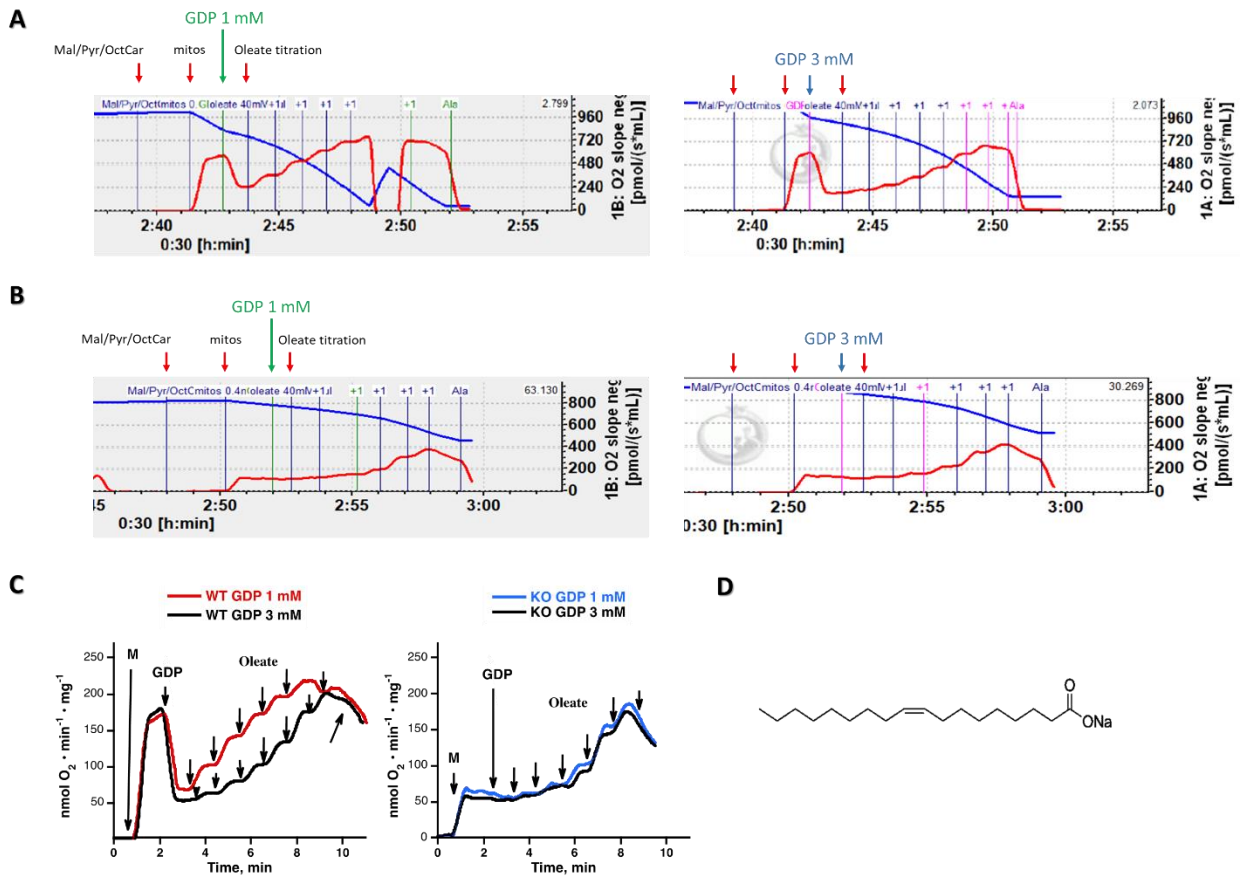


Figura 4.48 Respiración de mitocondrias aisladas en el modelo UCP1-KO ante el estímulo del ácido graso oleato. (A) Gráfica representativa obtenida del respirómetro Oroboros-O2k del grupo WT ante la acción del oleato, a la izquierda con una concentración baja (1 mM) del inhibidor de actividad de UCP-1 GDP y a la derecha a una concentración más alta (3mM). (B) Gráfica representativa obtenida del respirómetro Oroboros-O2k del grupo KO ante la acción del oleato, a la izquierda con una concentración baja (1 mM) del inhibidor de actividad de UCP-1 GDP y a la derecha a una concentración más alta (3mM). (C) Representación gráfica de la respiración mitocondrial según la acción del oleato en animales *wild-type* y UCP1-KO. (D) Estructura molecular del oleato sódico.

Respecto al potencial de membrana, se advirtió un aumento más rápido de la fluorescencia indicativa del voltaje en las mitocondrias aisladas de los ratones WT cuando la concentración de GDP era más baja (Figura 4.50C, gráfico izquierdo). Sin embargo, en los animales UCP1-KO no se percibió ningún cambio entre la adición de GDP 1 mM y 3 mM (Figura 4.50C, gráfico derecho).

Cuando se compararon ambos grupos genéticos, se determinó una despolarización de membrana más marcada y rápida en las mitocondrias aisladas de los animales WT que en los ratones UCP1-KO (Figura 4.51A). Esta despolarización del grupo WT se definió como significativamente más gradual cuando la concentración de GDP era mayor (Figura 4.51B) pero equivalente en el

grupo UCP1-KO independiente de [GDP] (**Figura 4.51C**). Los cambios observados en el potencial de membrana ante el estímulo del ácido graso oleato apoyaron la dependencia de la actividad UCP-1 para su mecanismo de acción y su competencia con los nucleótidos de purina por el sitio de unión en la proteína desacoplante.

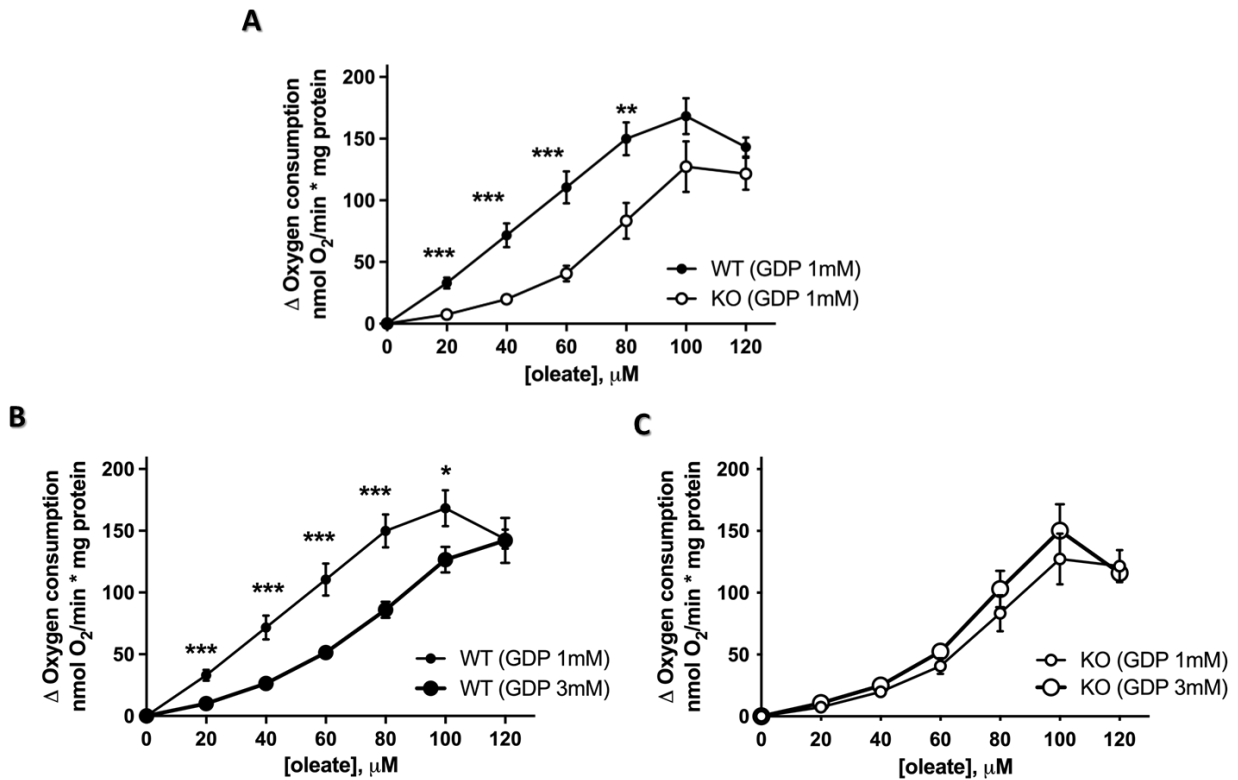


Figura 4.49 Respiración de mitocondrias aisladas en el modelo UCP1-KO y el grupo WT ante el estímulo del ácido graso oleato. **(A)** Representación gráfica del diferencial de respiración del grupo WT (n=5) y el modelo UCP1-KO (n=6) ante la acción del oleato, con una concentración baja (1 mM) del inhibidor de actividad de UCP-1 GDP. **(B)** Representación gráfica del diferencial de respiración del grupo WT ante la acción del oleato, con una concentración de GDP 1 mM (n=5) y una más alta de GDP 3 mM (n=4). **(C)** Representación gráfica del diferencial de respiración del modelo UCP1-KO ante la acción del oleato, con una concentración de GDP 1 mM (n=6) y una más alta de GDP 3 mM (n=4). Los resultados se expresaron como media \pm SEM. La significación estadística se evaluó por la prueba t-Student de dos colas y muestras desapareadas, y se representó como * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$ vs. ratones KO GDP 1 mM en **A** y vs. ratones WT GDP 3 mM en **B**.

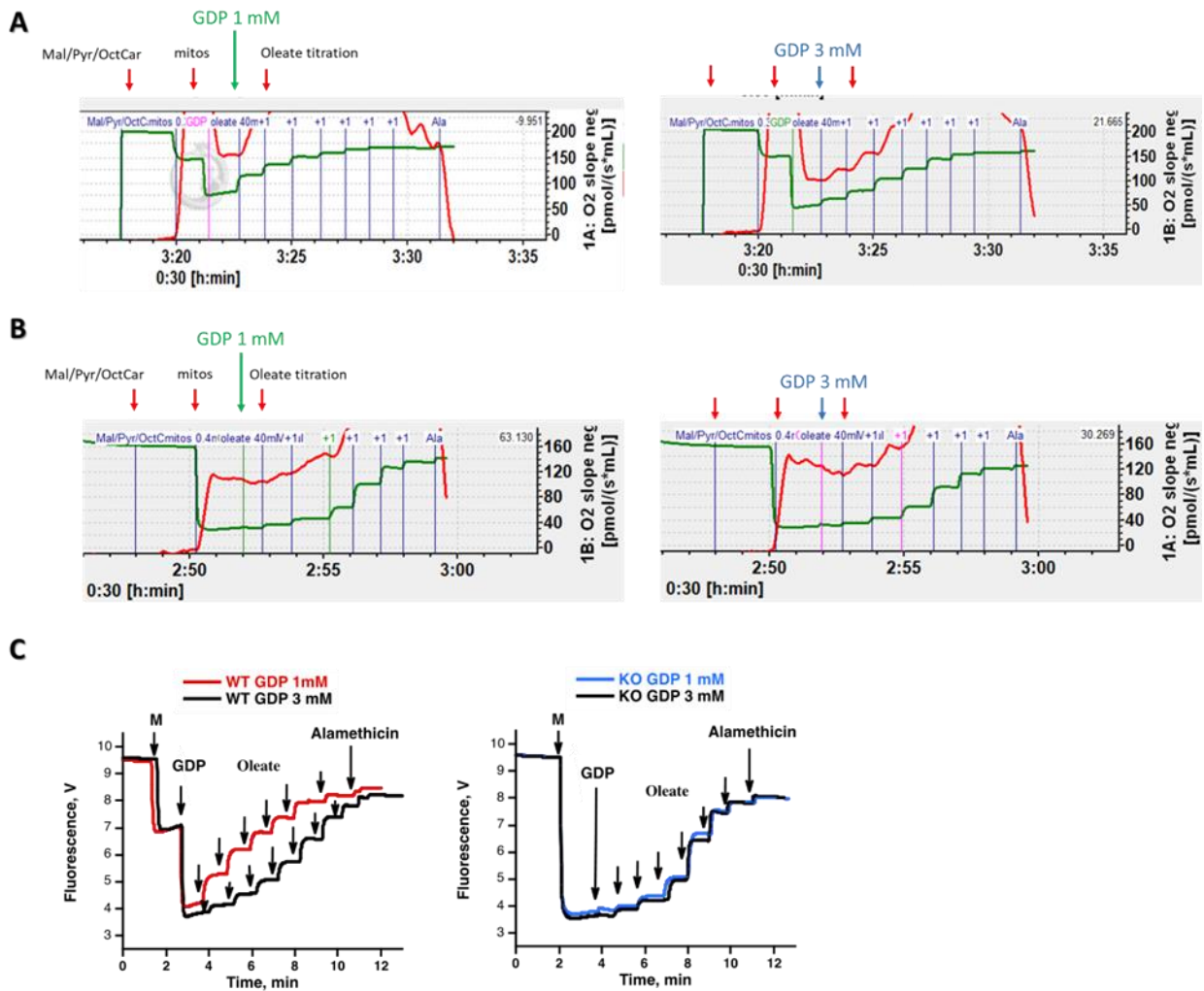


Figura 4.50 Evaluación del potencial de membrana de mitocondrias aisladas en el modelo UCP1-KO ante el estímulo del ácido graso oleato. **(A)** Gráfica representativa obtenida del respirómetro Oroboros-O2k del grupo WT ante la acción del oleato, a la izquierda con una concentración baja (1 mM) del inhibidor de actividad de UCP-1 GDP y a la derecha a una concentración más alta (3mM). **(B)** Gráfica representativa obtenida del respirómetro Oroboros-O2k del grupo KO ante la acción del oleato, a la izquierda con una concentración baja (1 mM) del inhibidor de actividad de UCP-1 GDP y a la derecha a una concentración más alta (3mM). **(C)** Representación gráfica del voltaje relativo de la fluorescencia emitida por la acción del oleato en animales *wild-type* y UCP1-KO.

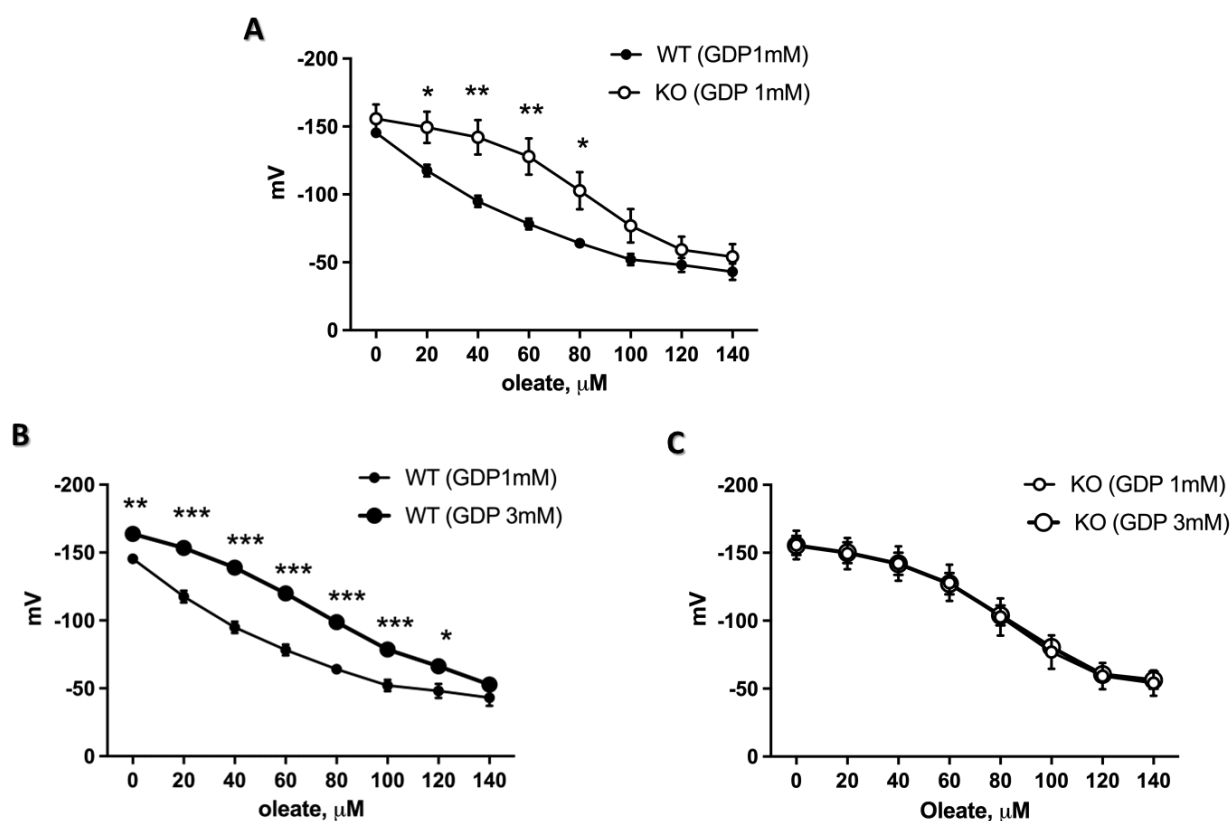


Figura 4.51 Evaluación del potencial de membrana de mitocondrias aisladas en el modelo UCP1-KO y el grupo WT ante el estímulo del ácido graso oleato. **(A)** Representación gráfica del potencial de membrana en mV del grupo WT (n=6) y el modelo UCP1-KO (n=6) ante la acción del oleato, con una concentración baja (1 mM) del inhibidor de actividad de UCP-1 GDP. **(B)** Representación gráfica del potencial de membrana en mV del grupo WT ante la acción del oleato, con una concentración de GDP 1 mM (n=6) y una más alta de GDP 3 mM (n=6). **(C)** Representación del potencial de membrana en mV del modelo UCP1-KO ante la acción del oleato, con una concentración de GDP 1 mM (n=6) y una más alta de GDP 3 mM (n=6). Los resultados se expresaron como media ± SEM. La significación estadística se evaluó por la prueba t-Student de dos colas y muestras desapareadas, y se representó como * p < 0,05; ** p < 0,01 y *** p < 0,001 vs. ratones WT GDP 1 mM.

4.3.2 Acción independiente de UCP-1 de FCCP en la respiración mitocondrial y el potencial de membrana

El carbonilcianida-4trifluorometoxifenilhidrazona (FCCP) es un ionóforo o portador de iones móvil que entra en la mitocondria en su forma protonada, disipando así el gradiente electroquímico formado durante la respiración, para salir posteriormente como un anión (**Figura 4.52D**). Este proceso puede repetirse millones de veces, de modo que una cantidad minúscula de FCCP puede catalizar el movimiento de enormes cantidades de protones y un exceso de este puede suponer una inhibición de la actividad de la cadena respiratoria (Masaki *et al.*, 2000).

En esta tesis doctoral se comprobó la dependencia del FCCP por la activación de UCP-1 mediante estudios de respiración y potencial mitocondriales como los que se llevaron a cabo con el oleato. Primero, los resultados de la respiración de mitocondrias aisladas de BAT de los animales WT al igual que de aquellas extraídas

del grupo UCP1-KO no mostraron diferencias en cuanto a la inhibición de UCP-1 por GDP (**Figura 4.52A y 4.52B**). Además, se obtuvieron representaciones gráficas de la valoración del FCCP, así como respiraciones máximas similares en ambos grupos (**Figura 4.52C**).

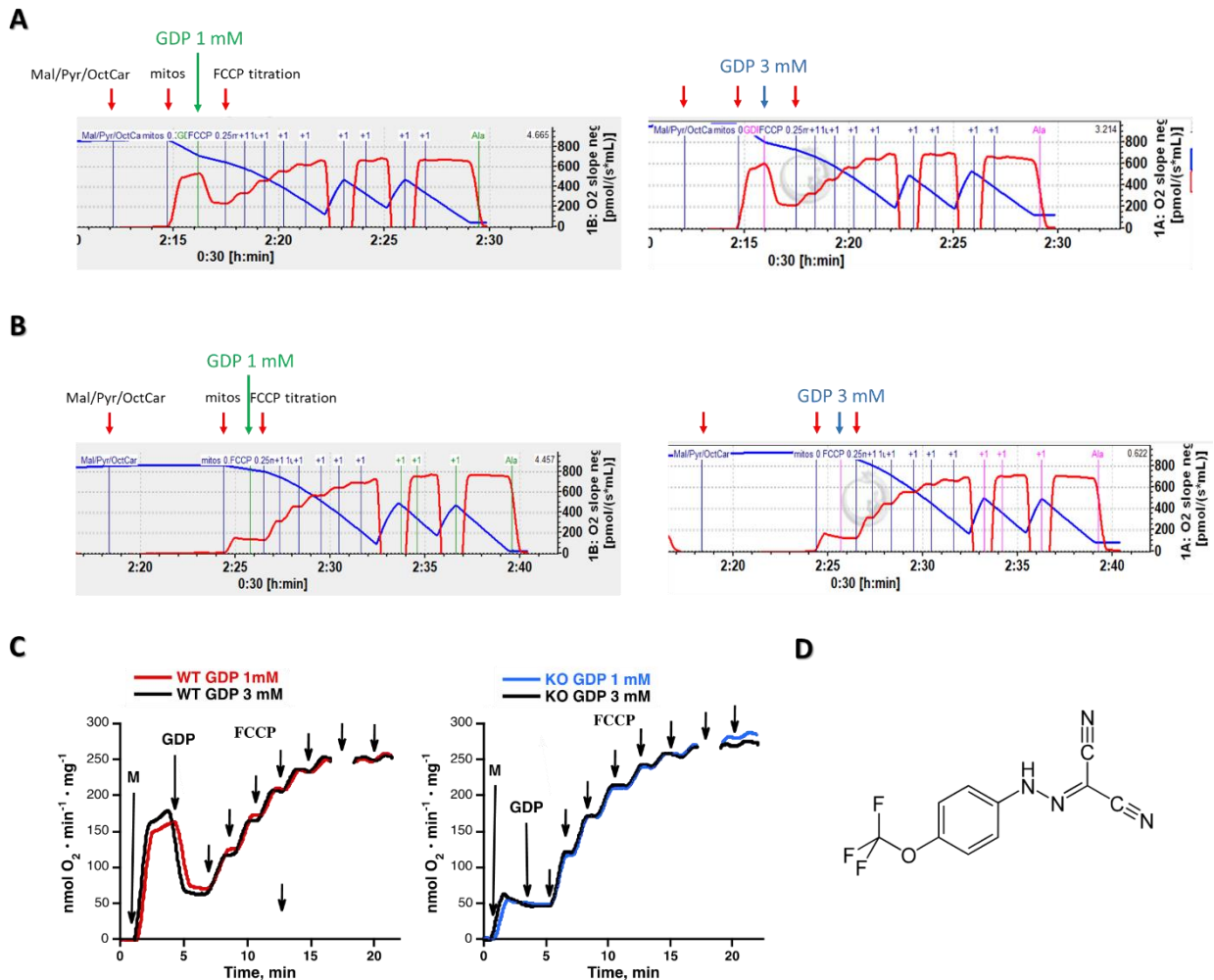


Figura 4.52 Respiración de mitocondrias aisladas en el modelo UCP1-KO ante el estímulo de FCCP. **(A)** Gráfica representativa obtenida del respirómetro Oroboros-O2k del grupo WT ante la acción de FCCP, a la izquierda con una concentración baja (1 mM) del inhibidor de actividad de UCP-1 GDP y a la derecha a una concentración más alta (3mM). **(B)** Gráfica representativa obtenida del respirómetro Oroboros-O2k del grupo KO ante la acción de FCCP, a la izquierda con una concentración baja (1 mM) del inhibidor de actividad de UCP-1 GDP y a la derecha a una concentración más alta (3mM). **(C)** Representación gráfica de la respiración mitocondrial según la acción de FCCP en animales *wild-type* y UCP1-KO. **(D)** Estructura molecular de FCCP.

Cuando se comparó la respiración de las mitocondrias aisladas del grupo WT con el modelo UCP1-KO, tampoco se observaron diferencias entre ambos grupos (**Figura 4.53**). Asimismo, el estudio del potencial de membrana tampoco reveló diferencias entre los grupos ni una acción dependiente de la inhibición de UCP-1 por GDP (**Figura 4.54 y Figura 4.55**). Esto demostraría el efecto independiente de la activación de UCP-1 que muestra el desacoplante FCCP y no una acción dependiente como sugiere Bertholet *et al.*, 2022.

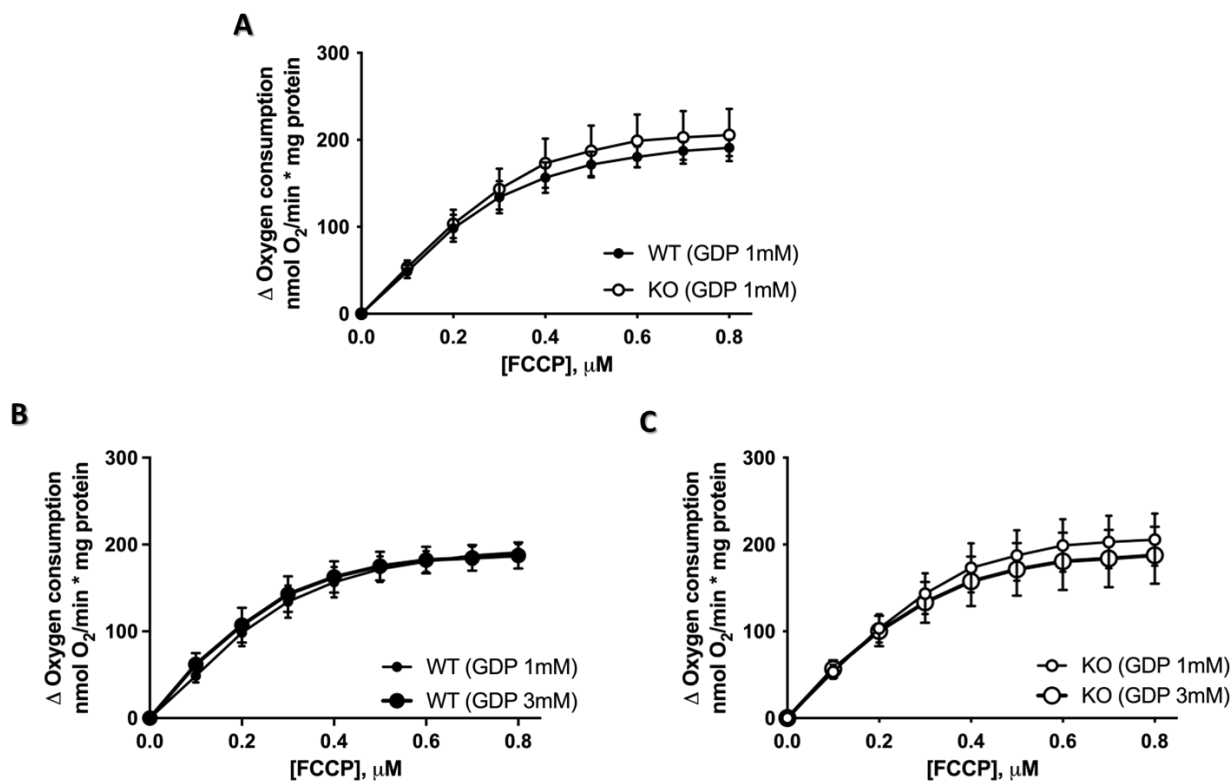


Figura 4.53 Respiración de mitocondrias aisladas en el modelo UCP1-KO y el grupo WT ante el estímulo de FCCP. **(A)** Representación gráfica del diferencial de respiración del grupo WT (n=5) y el modelo UCP1-KO (n=5) ante la acción de FCCP, con una concentración baja (1 mM) del inhibidor de actividad de UCP-1 GDP. **(B)** Representación gráfica del diferencial de respiración del grupo WT ante la acción de FCCP, con una concentración de GDP 1 mM (n=5) y una más alta de GDP 3 mM (n=5). **(C)** Representación gráfica del diferencial de respiración del modelo UCP1-KO ante la acción del oleato, con una concentración de GDP 1 mM (n=5) y una más alta de GDP 3 mM (n=5). Los resultados se expresaron como media \pm SEM.

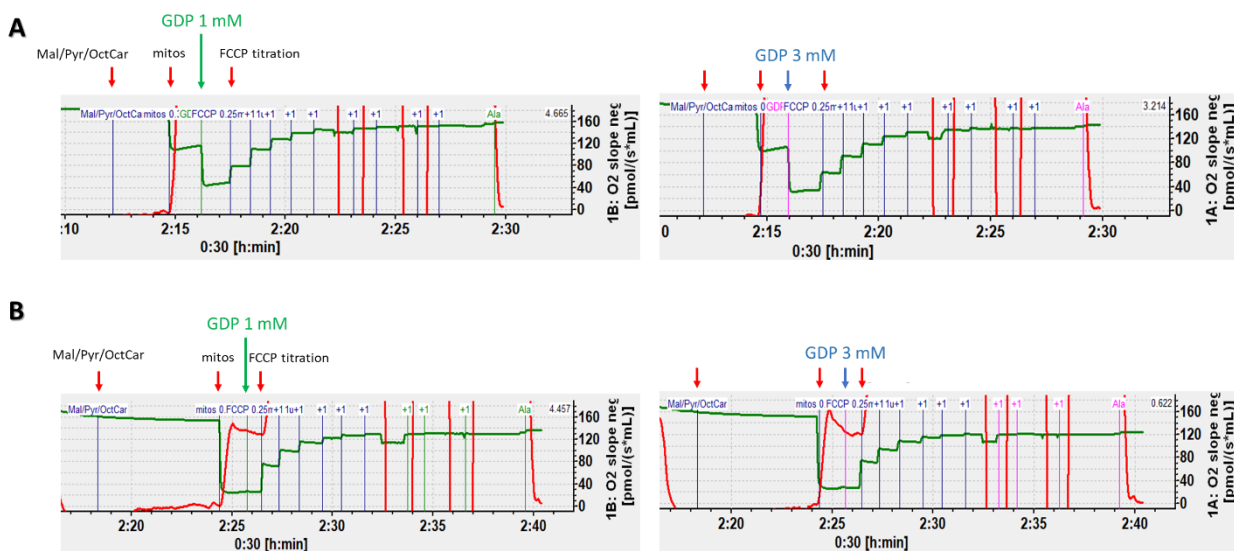


Figura 4.54 Evaluación del potencial de membrana de mitocondrias aisladas en el modelo UCP1-KO ante el estímulo de FCCP. **(A)** Gráfica representativa obtenida del respirómetro Oroboros- O_2 k del grupo WT ante la acción de FCCP, a la izquierda con una concentración baja (1 mM) del inhibidor de actividad de UCP-1 GDP y a la derecha a una concentración más alta (3mM). **(B)** Gráfica representativa obtenida del respirómetro Oroboros- O_2 k del grupo KO ante la acción de

FCCP, a la izquierda con una concentración baja (1 mM) del inhibidor de actividad de UCP-1 GDP y a la derecha a una concentración más alta (3mM).

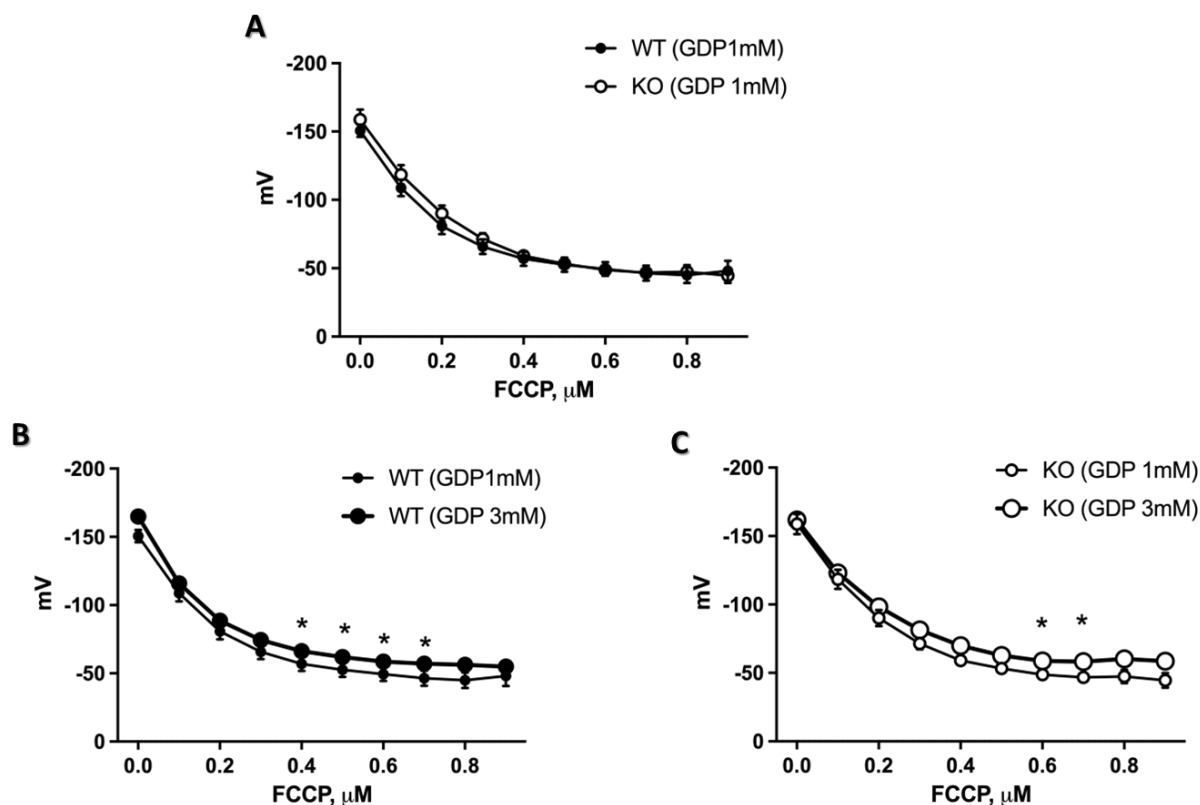


Figura 4.55 Evaluación del potencial de membrana de mitocondrias aisladas en el modelo UCP1-KO y el grupo WT ante el estímulo de FCCP. **(A)** Representación gráfica del potencial de membrana en mV del grupo WT (n=6) y el modelo UCP1-KO (n=6) ante la acción de FCCP, con una concentración baja (1 mM) del inhibidor de actividad de UCP-1 GDP. **(B)** Representación gráfica del potencial de membrana en mV del grupo WT ante la acción de FCCP, con una concentración de GDP 1 mM (n=6) y una más alta de GDP 3 mM (n=6). **(C)** Representación del potencial de membrana en mV del modelo UCP1-KO ante la acción de FCCP, con una concentración de GDP 1 mM (n=6) y una más alta de GDP 3 mM (n=6). Los resultados se expresaron como media \pm SEM. La significación estadística se evaluó por la prueba t-Student de dos colas y muestras desapareadas, y se representó como * $p < 0,05$ vs. ratones GDP 1 mM.

4.3.3 Acción parcialmente dependiente de UCP-1 de DNP en la respiración mitocondrial y el potencial de membrana

En los años 30, el 2,4-dinitrofenol (DNP) se anunciaba como una píldora dietética eficaz (Tainter, Cutting & Stockton, 1934) puesto que desacopla el transporte de electrones de la síntesis de ATP y permite una oxidación rápida de los sustratos, lo que favorece la movilización de los hidratos de carbono y las grasas. Como la energía se pierde en forma de calor, no se fomenta la biosíntesis y la pérdida de peso es muy notable. Sin embargo, aparecieron muchas complicaciones cardíacas con el tratamiento e, incluso, llegó a provocar la muerte de varios pacientes (Racker, 1976).

Para establecer si el DNP (**Figura 4.56D**) funciona a través de la activación de UCP-1, como se ha propuesto recientemente (Bertholet *et al.*, 2022), se realizaron los

mismos experimentos descritos previamente. En cuanto a la respiración de las mitocondrias aisladas del grupo WT, se observó un ligero descenso cuando la inhibición de UCP-1 era más fuerte (GDP 3mM) (**Figura 4.56C**, gráfico *izquierdo*), pero la respiración máxima y la curva obtenida de la valoración de FCCP en el grupo WT fue similar en los animales UCP1-KO, en cuyo caso la concentración de GDP no varió la acción del desacoplante (**Figura 4.56C**, gráfico *derecho*).

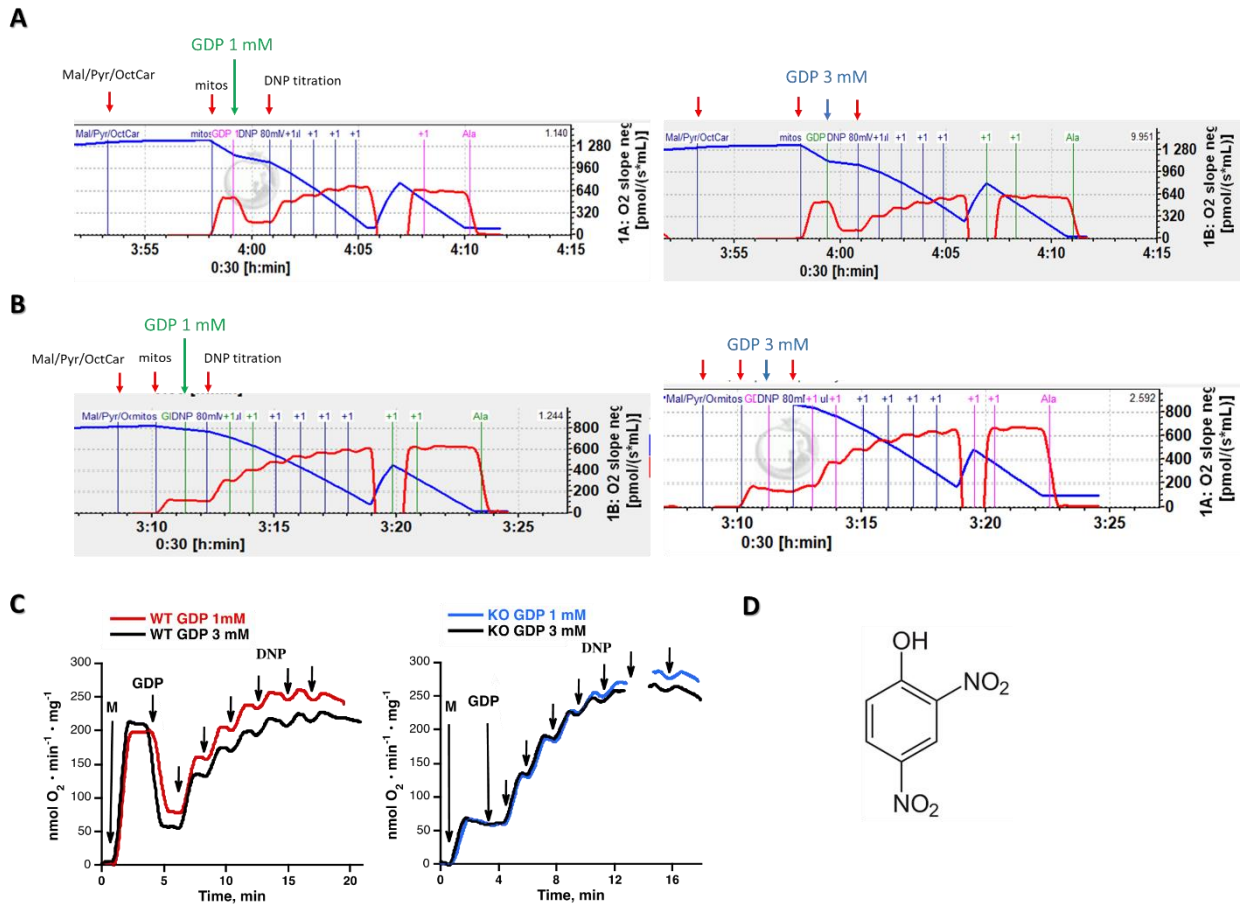


Figura 4.56 Respiración de mitocondrias aisladas en el modelo UCP1-KO ante el estímulo de DNP. **(A)** Gráfica representativa obtenida del respirómetro Oroboros-O2k del grupo WT ante la acción de DNP, a la izquierda con una concentración baja (1 mM) del inhibidor de actividad de UCP-1 GDP y a la derecha a una concentración más alta (3mM). **(B)** Gráfica representativa obtenida del respirómetro Oroboros-O2k del grupo KO ante la acción de DNP, a la izquierda con una concentración baja (1 mM) del inhibidor de actividad de UCP-1 GDP y a la derecha a una concentración más alta (3mM). **(C)** Representación gráfica de la respiración mitocondrial según la acción de DNP en animales *wild-type* y UCP1-KO. **(D)** Estructura molecular de DNP.

Cuando se comparó la respiración de las mitocondrias aisladas de BAT entre ambos grupos, no se encontraron diferencias (**Figura 4.57A**). No obstante, como cabía esperar por los resultados obtenidos previamente (**Figura 4.56**), se percibió un ligero descenso en la respiración del grupo WT cuando se adicionó GDP 3 mM, lo que supuso una mayor inhibición de UCP-1 (**Figura 4.57B**).

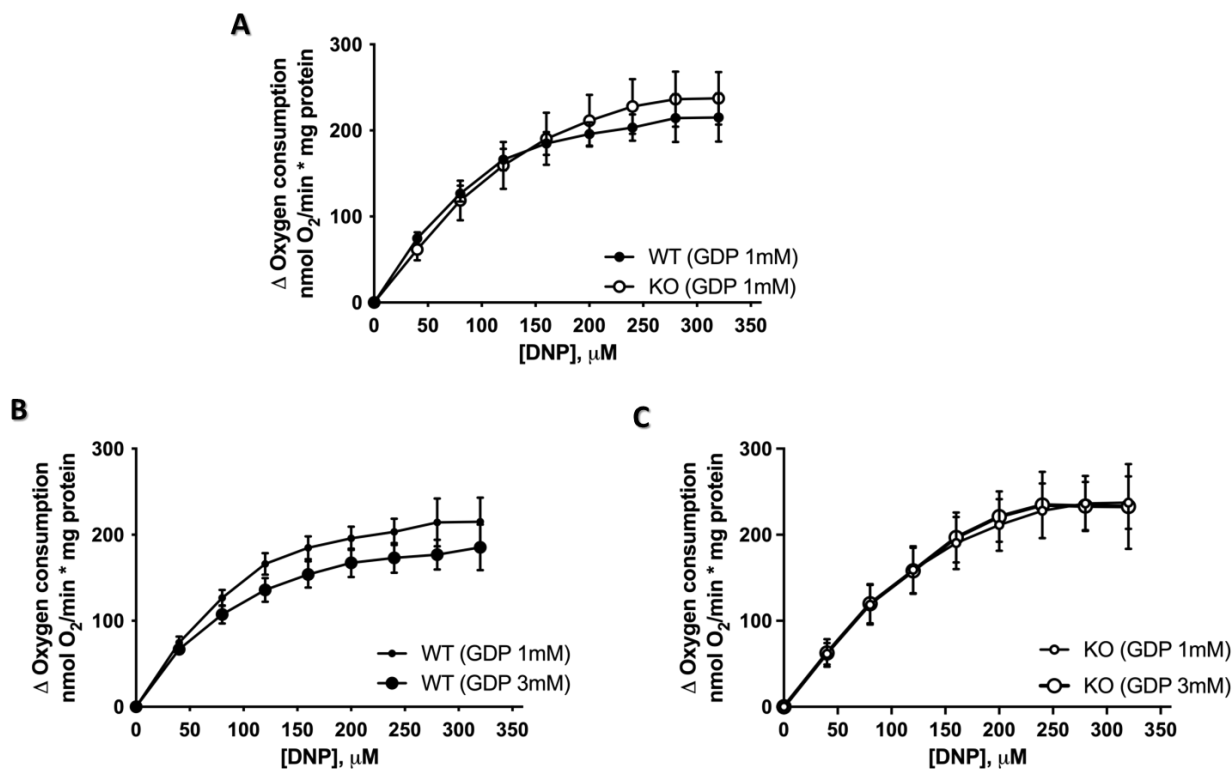


Figura 4.57 Respiración de mitocondrias aisladas en el modelo UCP1-KO y el grupo WT ante el estímulo de DNP. **(A)** Representación gráfica del diferencial de respiración del grupo WT (n=12) y el modelo UCP1-KO (n=7) ante la acción de DNP, con una concentración baja (1 mM) del inhibidor de actividad de UCP-1 GDP. **(B)** Representación gráfica del diferencial de respiración del grupo WT ante la acción de DNP, con una concentración de GDP 1 mM (n=12) y una más alta de GDP 3 mM (n=10). **(C)** Representación gráfica del diferencial de respiración del modelo UCP1-KO ante la acción del DNP, con una concentración de GDP 1 mM (n=7) y una más alta de GDP 3 mM (n=7). Los resultados se expresaron como media \pm SEM.

Respecto al potencial de membrana, los datos obtenidos mostraron un ligero descenso en la polarización de membrana del grupo UCP1-KO comparado con las mitocondrias aisladas de los animales WT (**Figura 4.58**). Este descenso se hizo más notable tras el análisis de la fluorescencia emitida y su posterior conversión en mV (**Figura 4.59A**). Asimismo, este mismo efecto observado con el DNP, con respecto al potencial de membrana de las mitocondrias aisladas, se observó con la concentración de GDP más alta en los ratones WT y, por tanto, con una inhibición casi completa de UCP-1 (**Figura 4.59B**). No obstante, la despolarización de membrana se consideró similar cuando UCP-1 no se expresaba independientemente de la concentración de GDP añadida (**Figura 4.59C**).

Para evaluar si realmente la acción de DNP es dependiente de la activación de UCP-1, se examinaron los resultados obtenidos del desacoplante dependiente previamente descrito. Así, no se encontraron diferencias en la conducta de las mitocondrias aisladas, ni en la respiración ni en el potencial, entre el efecto de oleato y DNP cuando se comparaban los grupos WT y UCP1-KO (**Figura 4.60**). No obstante, se determinó un comportamiento similar ante diferentes grados de inhibición de UCP-1 por GDP, a una concentración más alta (3 mM) se observó una disminución de la respiración mitocondrial y una despolarización de membrana

que fueron significativamente más marcadas cuando se valoraba el oleato (Figura 4.61).

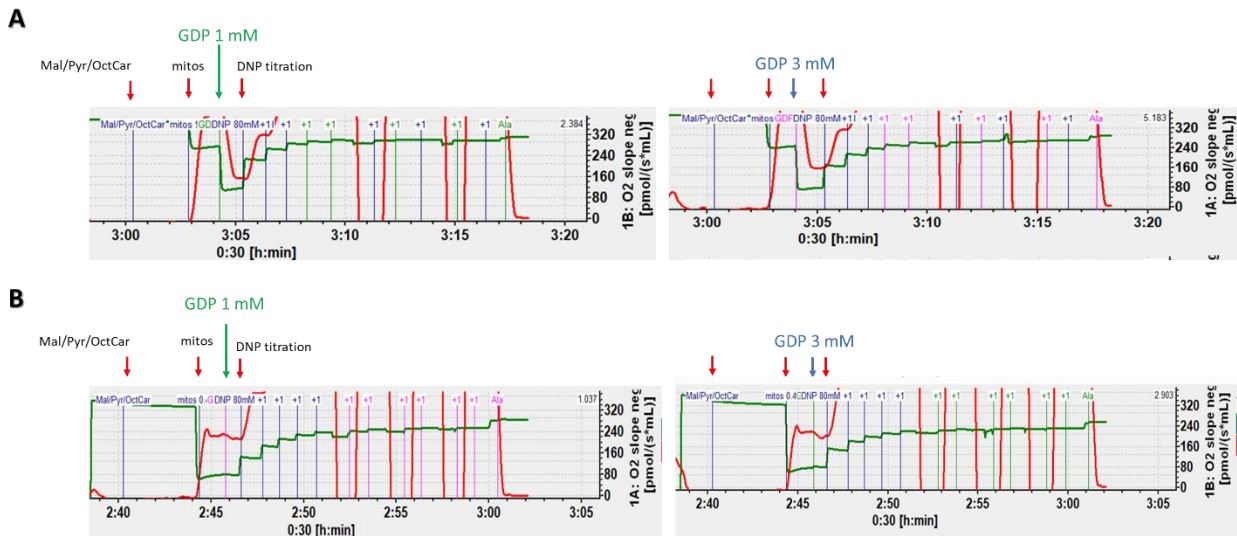


Figura 4.58 Evaluación del potencial de membrana de mitocondrias aisladas en el modelo UCP1-KO ante el estímulo de DNP. **(A)** Gráfica representativa obtenida del respirómetro Oroboros-O2k del grupo WT ante la acción de DNP, a la izquierda con una concentración baja (1 mM) del inhibidor de actividad de UCP-1 GDP y a la derecha a una concentración más alta (3mM). **(B)** Gráfica representativa obtenida del respirómetro Oroboros-O2k del grupo KO ante la acción de DNP, a la izquierda con una concentración baja (1 mM) del inhibidor de actividad de UCP-1 GDP y a la derecha a una concentración más alta (3mM).

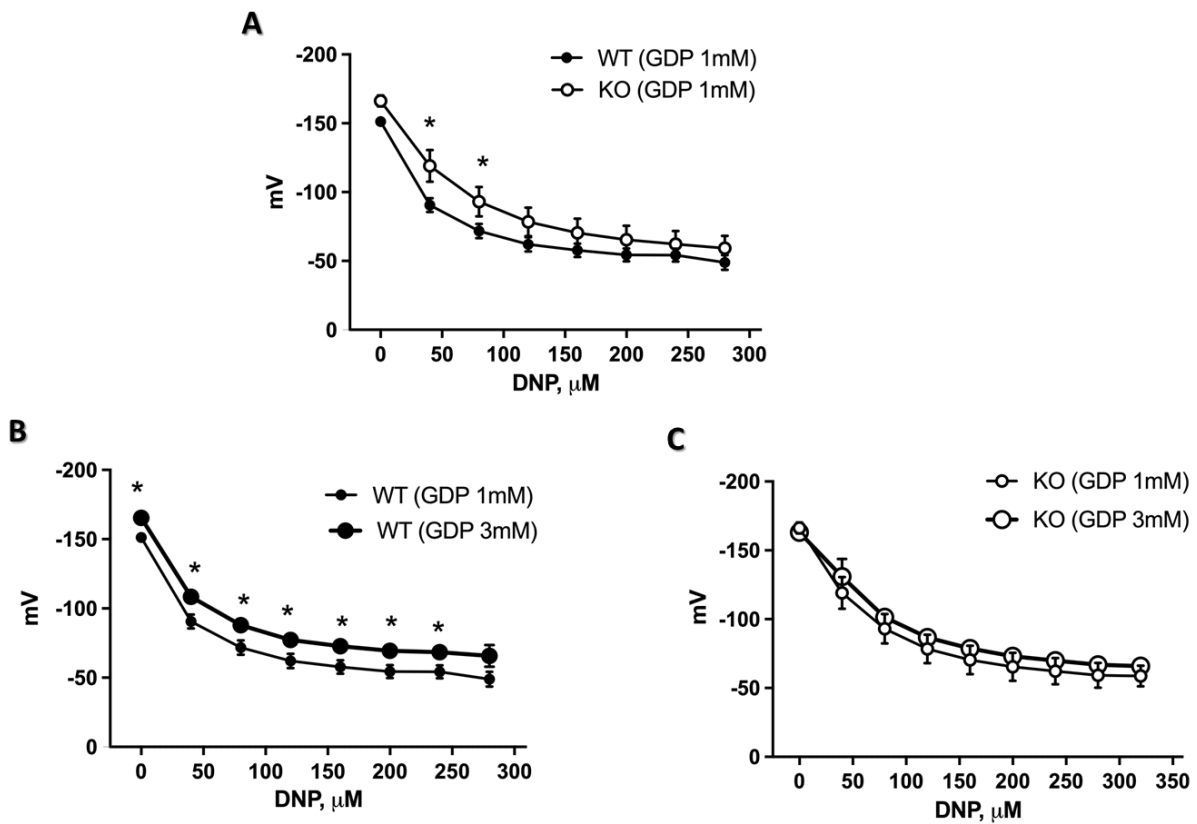


Figura 4.59 Evaluación del potencial de membrana de mitocondrias aisladas en el modelo UCP1-KO y el grupo WT ante el estímulo de DNP. **(A)** Representación gráfica del potencial de membrana en mV del grupo WT (n=7) y el modelo UCP1-KO (n=3) ante la acción de DNP, con una

concentración baja (1 mM) del inhibidor de actividad de UCP-1 GDP. **(B)** Representación gráfica del potencial de membrana en mV del grupo WT ante la acción de DNP, con una concentración de GDP 1 mM (n=7) y una más alta de GDP 3 mM (n=7). **(C)** Representación del potencial de membrana en mV del modelo UCP1-KO ante la acción de DNP, con una concentración de GDP 1 mM (n=3) y una más alta de GDP 3 mM (n=3). Los resultados se expresaron como media \pm SEM. La significación estadística se evaluó por la prueba t-Student de dos colas y muestras desapareadas, y se representó como * $p < 0,05$ vs. ratones WT GDP 1 mM.

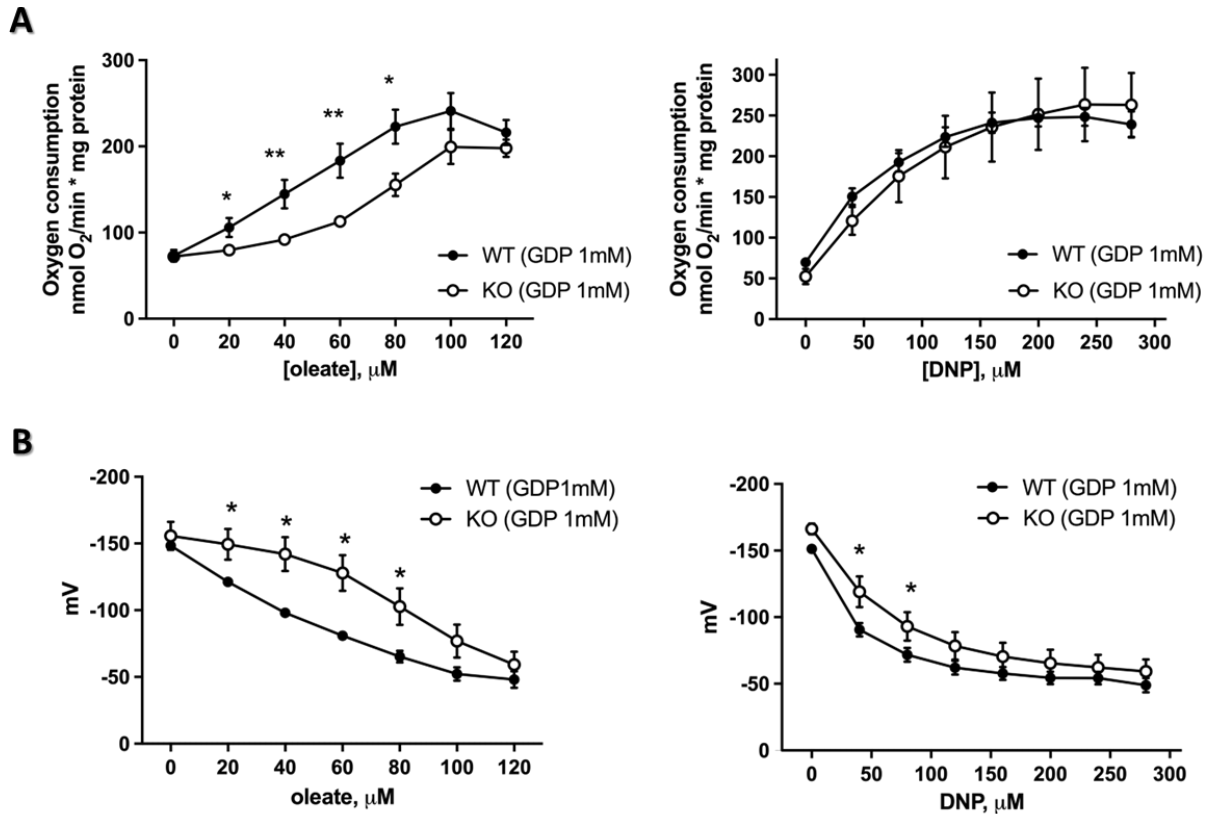


Figura 4.60 Estudio comparativo de respiración y potencial de membrana de mitocondrias aisladas en el modelo UCP1-KO y el grupo WT ante el estímulo dependiente de UCP-1 oleato para determinar el mecanismo de acción de DNP. **(A)** Representación gráfica de la respiración mitocondrial del grupo WT (n=5) y el modelo UCP1-KO (n=6) ante la acción del oleato (izquierda), y del grupo WT (n=7) y el modelo UCP1-KO (n=3) ante la acción de DNP (derecha), con una concentración baja (1 mM) del inhibidor de actividad de UCP-1 GDP. **(B)** Representación gráfica del potencial de membrana en mV del grupo WT y UCP1-KO ante la acción de oleato (izquierda), y del grupo WT y UCP1-KO ante la acción de DNP (derecha), con una concentración de GDP 1 mM. Los resultados se expresaron como media \pm SEM. La significación estadística se evaluó por la prueba t-Student de dos colas y muestras desapareadas, y se representó como * $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$ vs. ratones KO en **A** y WT en **B**.

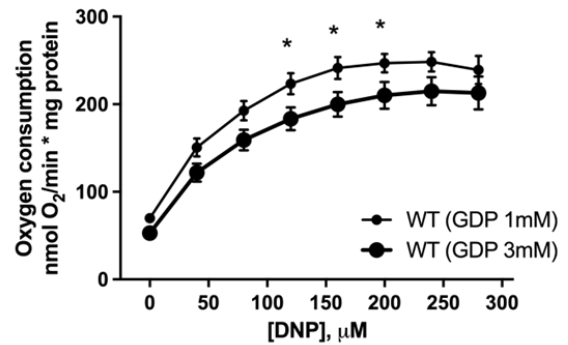
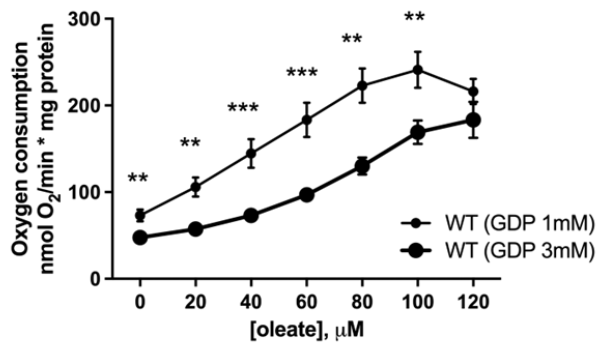
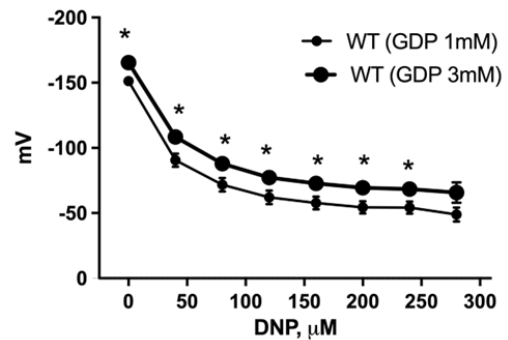
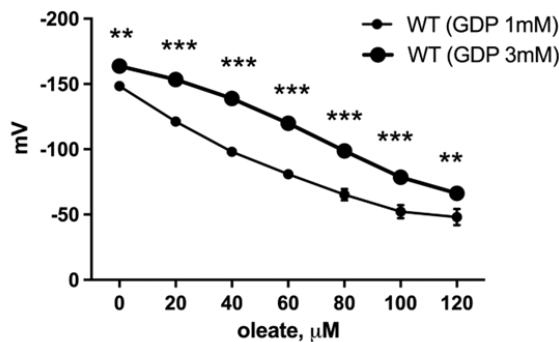
A**B**

Figura 4.61 Estudio comparativo de respiración y potencial de membrana de mitocondrias aisladas en el grupo WT ante el estímulo dependiente de UCP-1 oleato a diferentes concentraciones de GDP para determinar el mecanismo de acción de DNP. **(A)** Representación gráfica de la respiración mitocondrial del grupo WT ante la acción del oleato en un ambiente con GDP 1 mM (n=7) y con GDP 3 mM (n=6) (izquierda), y del grupo WT ante la acción de DNP con GDP 1 mM (n=7) y con GDP 3 mM (n=7) (derecha). **(B)** Representación gráfica del potencial de membrana en mV del grupo WT ante la acción del oleato en un ambiente con GDP 1 mM (n=7) y con GDP 3 mM (n=6) (izquierda), y del grupo WT ante la acción de DNP con GDP 1 mM (n=7) y con GDP 3 mM (n=7) (derecha). Los resultados se expresaron como media \pm SEM. La significación estadística se evaluó por la prueba t-Student de dos colas y muestras desapareadas, y se representó como * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$ vs. ratones WT GDP 3 mM en **A** y WT GDP 1mM en **B**.

Este estudio mitocondrial reveló que la acción del desacoplante DNP es parcialmente dependiente de la activación de UCP-1 siempre que esta proteína se exprese puesto que ante la ausencia de UCP-1 se comportará como un desacoplante independiente como FCCP, llegando a ser igual de potente (**Figura 4.62**). Esto conlleva a pensar que DNP no tiene un efecto activador de UCP-1.

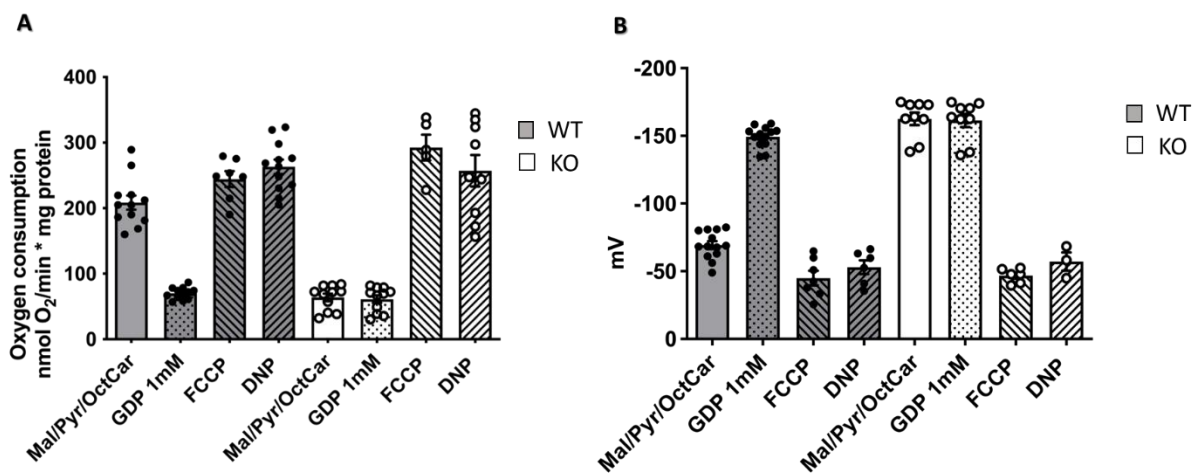


Figura 4.62 Respiración mitocondrial y despolarización de membrana de mitocondrias aisladas en el grupo WT y el modelo UCP1-KO ante diferentes desacoplantes. (A) Histograma de la respiración mitocondrial basal (Mal/Pyri/OctCar) del grupo WT (n=12) y del grupo UCP1-KO (n=11); la respiración obtenida de la inhibición de UCP-1 (GDP) del grupo WT (n=12) y del grupo UCP1-KO (n=11); la respiración máxima por FCCP del grupo WT (n=7) y del grupo UCP1-KO (n=5); y la respiración máxima por DNP del grupo WT (n=12) y del grupo UCP1-KO (n=9). (B) Histograma del potencial de membrana basal (Mal/Pyri/OctCar) del grupo WT (n=13) y del grupo UCP1-KO (n=9); el potencial obtenido de la inhibición de UCP-1 (GDP) del grupo WT (n=13) y del grupo UCP1-KO (n=9); la máxima despolarización de membrana por FCCP del grupo WT (n=7) y del grupo UCP1-KO (n=6); y la máxima despolarización de membrana por DNP del grupo WT (n=6) y del grupo UCP1-KO (n=3). Los resultados se expresaron como media ± SEM.

4.3.4 Efecto de metil-β-ciclodextrina (MβCD) en la respiración de mitocondrias aisladas

Las ciclodextrinas son una familia de oligosacáridos cíclicos, formados por un anillo macrocíclico de subunidades de glucosa unidas por enlaces α-1,4 glucosídicos, y se producen a partir del almidón mediante conversión enzimática. Con un interior hidrófobo y un exterior hidrófilo, las ciclodextrinas forman complejos con compuestos hidrófobos. Se han utilizado para administrar diversos fármacos, como hidrocortisona, prostaglandina, nitroglicerina y cloranfenicol puesto que confiere solubilidad y estabilidad a estos fármacos (Pitha *et al.*, 1988).

Estudios previos en ratones indicaron que la delección del colesterol mitocondrial, que es el principal componente de los microdominios de tipo balsa o mDRMs, por metil-β-ciclodextrina (MβCD) perjudicaba la bioenergética mitocondrial (Ziolkowski *et al.*, 2010). Sin embargo, existen diversos artículos que utilizan esta ciclodextrina para mejorar la capacidad respiratoria con el precedente de que elimina los ácidos grasos presentes en la mitocondria y ofrece un análisis más viable de la respiración mitocondrial puesto que limita su efecto en UCP-1 (Bertholet *et al.*, 2022).

Por ello, se analizó el efecto de MβCD en la respiración de las mitocondrias aisladas de los grupos WT y UCP1-KO mediante la técnica proporcionada por el respirómetro Oroboros O2k. Se observó que en un medio con MβCD la capacidad

respiratoria disminuía en los animales WT y UCP1-KO tanto durante la valoración del desacoplante DNP como FCCP. No obstante, la respiración basal no se veía alterada por el medio (Figura 4.63A y 4.63B). Asimismo, la respiración máxima obtenida por estos desacoplantes se mostró reducida significativamente en el grupo WT en presencia de M β CD cuando se comparaba con un medio de respiración normal (Figura 4.63C), dato observado previamente tras la primera adición de DNP y FCCP. Estos resultados apoyan la conclusión obtenida de Ziolkowski *et al.*, 2010 y recalcan la importancia de seleccionar un buen componente para el análisis fiable de la respiración mitocondrial.

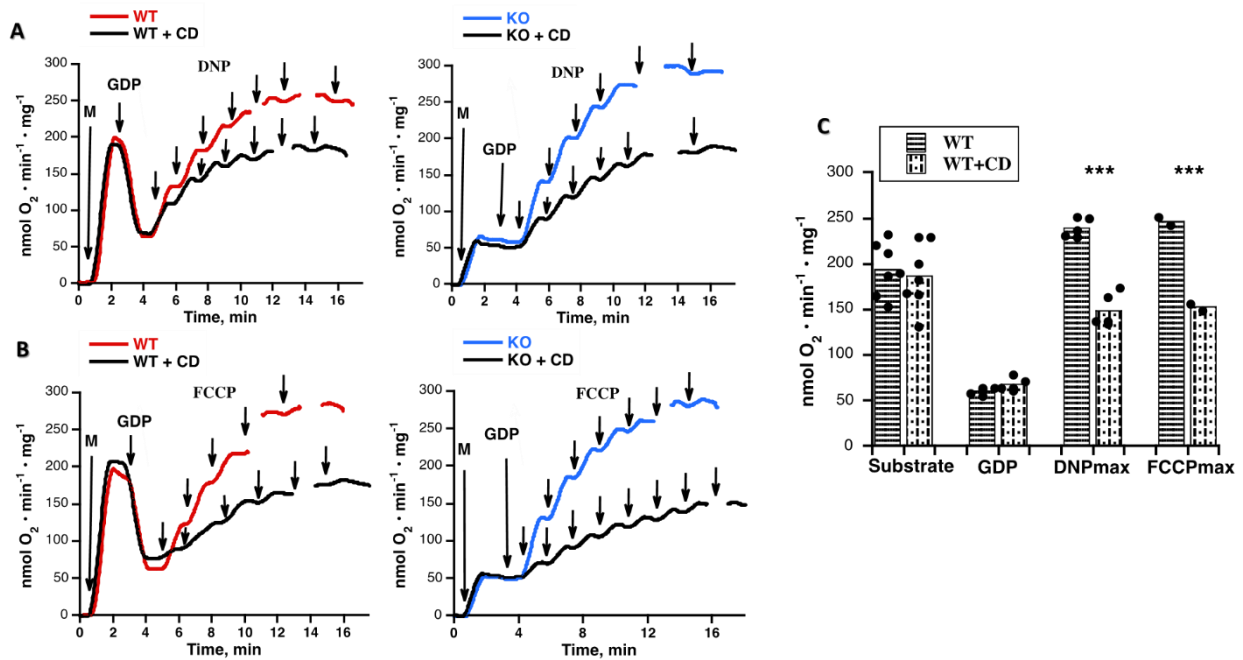



Figura 4.63 Respiración mitocondrial de mitocondrias aisladas en el grupo WT y el modelo UCP1-KO en un medio con M β CD. (A) Representación gráfica de la respiración mitocondrial según la acción de DNP en animales *wild-type* y UCP1-KO en un medio con M β CD. (B) Representación gráfica de la respiración mitocondrial según la acción de FCCP en animales *wild-type* y UCP1-KO en un medio con M β CD. (C) Histograma de la respiración mitocondrial basal (Substrate) del grupo WT en un medio normal (n=7) y con M β CD (n=7); la respiración obtenida de la inhibición de UCP-1 (GDP) del grupo WT en un medio normal (n=4) y con M β CD (n=4); la respiración máxima por DNP del grupo WT en un medio normal (n=5) y con M β CD (n=4); y la respiración máxima por FCCP del grupo WT en un medio normal (n=2) y con M β CD (n=2). Los resultados se expresaron como media \pm SEM. La significación estadística se evaluó por la prueba t-Student de dos colas y muestras desapareadas, y se representó como *** p < 0,001 vs. ratones WT.

DISCUSIÓN

***“Nada en la vida es para ser temido,
es sólo para ser comprendido.
Ahora es el momento de entender más
de modo que podamos temer menos.”***

Marie Curie

Física y química



La obesidad es una patología multifactorial caracterizada por una acumulación excesiva de grasa en el organismo y cuyo desarrollo comienza por un desequilibrio en el balance energético, siendo mayor el almacenaje de energía que el gasto. En los últimos años, la prevalencia de la obesidad junto con las complicaciones asociadas a esta patología se ha visto incrementada en todo el mundo, alcanzando casi un 30% en Europa (OMS, 2022). De este modo, dicha enfermedad supone una carga importante a nivel individual y poblacional puesto que afecta a la calidad de vida así como a la productividad socioeconómica de un país.

Los enfoques terapéuticos actuales basados en cambios en el estilo de vida y/o tratamientos farmacológicos no aportan beneficios a largo plazo (Heymsfield & Wadden, 2017), lo que favorece la búsqueda de nuevas estrategias para el tratamiento y la prevención de la obesidad.

El tejido adiposo marrón o grasa parda (BAT) es ampliamente conocido por su papel fundamental en la termogénesis adaptativa. La abundante cantidad de mitocondrias permite a este tejido la generación de calor ya sea por el desacoplamiento de la cadena respiratoria por la acción de UCP-1 o por otros mecanismos independientes de esta proteína desacoplante como el ciclo de la creatina o del calcio (Sakers *et al.*, 2022). Es por ello por lo que han aumentado exponencialmente los estudios que relacionan la activación del tejido adiposo marrón, y su consecuente generación de calor, con una mejora en el gasto energético (Singh *et al.*, 2021; Ouellet *et al.*, 2012).

Esta tesis doctoral se ha centrado en el estudio del papel de la dinámica mitocondrial en la termogénesis adaptativa, haciendo hincapié en la importancia de la plasticidad mitocondrial en la activación del tejido adiposo marrón. Los adipocitos marrones activos son capaces de pasar por una transición temporal de alta a baja eficiencia bioenergética durante la cual la energía obtenida de la oxidación de nutrientes se destina casi por completo a la generación de calor (Liesa & Shirihai, 2013). Los cambios en la disponibilidad de nutrientes y la demanda de energía pueden favorecer formas específicas en la arquitectura de las mitocondrias. Una situación de mayor eficiencia energética como es la restricción energética promoverá el estado elongado o fusionado de este orgánulo, mientras que la escisión en mitocondrias más pequeñas será el resultado de una eficiencia energética reducida como sucede en la obesidad o situaciones de exceso de nutrientes. Es importante recalcar que este último escenario está acompañado de una respiración desacoplada (Liesa & Shirihai, 2013).

Estudios *in vivo* previos de nuestro laboratorio han demostrado que el receptor de IGF-1 (IGF-1R) no es esencial para el desarrollo del tejido adiposo marrón, posiblemente por la presencia del receptor de insulina (IR) o la activación de un mecanismo compensatorio dependiente de los niveles circulantes de IGF-1, los cuales se vieron aumentados en el modelo carente de IGF-1R (Viana-Huete *et al.*, 2016). Además, se determinó una ligera afectación de la función termogénica en el


modelo BATIGF1RKO siendo más clara en las primeras horas del experimento de exposición al frío durante 12 horas (Viana-Huete *et al.*, 2016).

Puesto que se había descrito esta ligera inadaptación al comienzo de la exposición al frío en el **modelo BATIGF1RKO** y no se había explorado previamente la homeostasis mitocondrial del BAT, nuestro proyecto se enfocó en el estudio del proceso de dinámica mitocondrial en este modelo. En una situación basal, en la que los animales se encontraban a 23°C, existió un aumento de las formas elongadas de las mitocondrias en el BAT del modelo BATIGF1RKO, así como un incremento de la masa mitocondrial. Estos resultados podrían indicar que la delección de IGF-1R afecta de algún modo a la red mitocondrial de BAT promoviendo un estado de un mayor rendimiento energético (Liesa & Shirihai, 2013).

Al igual que sucedía en el estudio de caracterización del modelo BATIGF1RKO (Viana-Huete *et al.*, 2016), estos animales presentaron una ligera afectación en su adaptación termogénica durante las 4 primeras horas de la exposición al frío. Sin embargo, se determinó una mejora en la respuesta termogénica en el modelo BATIGF1RKO puesto que desde las 5 horas hasta las 12 horas su curva de respuesta al frío se mantuvo estable, llegando a alcanzar incluso temperaturas corporales más altas al final del experimento que el grupo control. Los resultados del análisis de expresión de la proteína desacoplante UCP-1, considerada como la vía canónica de la termogénesis adaptativa, mostraron un ligero incremento en el modelo BATIGF1RKO que no explicaba íntegramente la mejora en la adaptación al frío.

En los adipocitos, el proceso predominante de liberación de ácidos grasos libres, generalmente los que son de cadena larga, es a través de la lipólisis dependiente de la proteína quinasa A (PKA), pudiendo ser activada por la exposición al frío (Chouchani & Kajimura, 2019). Los datos obtenidos del estudio de este proceso en BAT del modelo BATIGF1RKO mostraron un aumento en la actividad lipolítica en los animales carentes de IGF-1R tras la exposición al frío, indicando el uso de ácidos grasos como fuente de energía en estas células. El análisis de la respiración de las mitocondrias aisladas de BAT de los animales carentes de IGF-1R expuestos al frío determinó una respiración basal y máxima más alta en este grupo de ratones, reforzando así los resultados de la lipólisis observados. Asimismo, en las mitocondrias aisladas del modelo BATIGF1RKO no existió una disminución de la tasa respiratoria cuando UCP-1 se inhibió por la adición de ADP. Esto sugirió la existencia de un mecanismo compensatorio independiente de UCP-1 que probablemente se activa ante la imposibilidad de la adaptación termogénica y que explicaría la demora temporal observada en esta.

Para dilucidar y profundizar en este mecanismo implicado en la mejora termogénica del modelo BATIGF1RKO, se evaluó el estado de la red mitocondrial a través del estudio de la *dinámica mitocondrial*, así como el proceso involucrado en el mantenimiento de la población sana de las mitocondrias denominado *mitofagia*. Trabajos previos en nuestro laboratorio describieron una disminución de los parámetros de fisión mitocondrial en un modelo carente de IGF-1R e IR



específicamente en BAT (modelo BATIGF1RKO), cuya característica principal es la atrofia severa de BAT y su consecuente fallo en la adaptación termogénica (Viana-Huete *et al.*, 2018). Los datos recogidos en esta tesis doctoral han mostrado un aumento del número de mitocondrias, siendo significativamente de menor tamaño y acompañado de un incremento en la expresión de la proteína activa p-DRP-1 en el BAT de los animales carentes de IGF-1R expuestos al frío, lo que corrobora un desequilibrio en el balance a favor de la fisión mitocondrial. En este sentido, los animales con alteraciones negativas en la termogénesis están asociados con un impedimento del proceso de división o escisión mitocondrial mientras que aquellos ratones capaces de adaptarse correctamente al frío presentan un incremento de la fisión mitocondrial, ratificando el papel de la dinámica mitocondrial en la termogénesis adaptativa.


Es necesaria la activación de un proceso de degradación selectivo de mitocondrias eficiente para mantener una buena homeostasis mitocondrial. Esta mitofagia está estrechamente relacionada con el ciclo mitocondrial, más específicamente con la fisión, de tal manera que cuando una mitocondria se escinde, sus mitocondrias hijas presentarán diferentes potenciales de membrana: una de ellas se encontrará ligeramente despolarizada y la célula considerará que no es funcional. Las mitocondrias dañadas no podrán volver a conectarse con la red al no poder fusionarse con ninguna otra mitocondria y serán degradadas por este mecanismo. En este contexto, el bloqueo del flujo autofágico tras la administración de la cloroquina, mostró un incremento de todos los parámetros proteicos implicados en la eliminación de mitocondrias dañadas cuando los animales habían sido expuestos al frío, aunque no se determinaron diferencias entre el grupo control y el modelo BATIGF1RKO. Así, estos resultados demostraron que el frío actúa como un estímulo en la activación de la mitofagia, hecho que ya se había comprobado en trabajos anteriores (Lu *et al.*, 2018). Sorprendentemente, cuando la autofagia estaba impedida por la acción de la cloroquina en la situación de frío existió un aumento en los marcadores proteicos de fusión mitocondrial que, junto al descenso drástico de la expresión de p-DRP-1, sugirieron un estado elongado en las mitocondrias. Previamente en la literatura se ha descrito que MFN-2 está asociada a la mitofagia (Chen & Dorn, 2013; Ashraf & Kumar, 2022), lo que encajaría con los resultados obtenidos relacionados con la administración de cloroquina. Esto, a su vez, iría en consonancia con la teoría de que la fusión podría funcionar como un mecanismo protector en la eliminación de mitocondrias durante situaciones que favorecen el desacoplamiento de la cadena respiratoria y una despolarización de membrana, como sucedería en la exposición al frío. Por desgracia, el número de animales utilizados en el experimento con cloroquina no es el adecuado debido a factores externos que afectaron la generación de nuevos ratones, lo que nos dificulta la búsqueda de diferencias entre el modelo BATIGF1RKO y el grupo control.

Un proceso ampliamente estudiado en los últimos años es el *browning* o *beiging*, por el cual aparecen adipocitos termogénicos transitorios (células *beige*) ante diferentes estímulos como la exposición al frío o la activación β -adrenérgica del

sistema nervioso simpático (Sakers *et al.*, 2022). Asimismo, se sabe que este proceso puede ser dependiente o no de UCP-1, lo que dificulta en gran medida su estudio, no siendo el objetivo principal del trabajo. Investigaciones en adipocitos *beige* humanos han relacionado la fragmentación mitocondrial con la actividad de UCP-1, de tal forma que la delección parcial de DRP-1 disminuye la respiración desacoplada (Pisani *et al.*, 2018). Tras la demostración de que la dinámica mitocondrial, además de ser imprescindible en la plasticidad de estos orgánulos, tiene otra función relacionada con el mantenimiento de una buena termogénesis adaptativa a través de BAT en roedores, esta tesis doctoral exploró el efecto del *browning* en la dinámica de diferentes regiones de tejido adiposo blanco (WAT). Nuestros resultados corroboraron un incremento de la fusión mitocondrial en los compartimentos inguinal y retroperitoneal de WAT del modelo BATIGF1RKO tras la exposición al frío que iba acompañado de un aumento en los marcadores mitofágicos PINK-1 y Parkina. Además, el tejido retroperitoneal mostró un aumento significativo de UCP-1 en el modelo BATIGF1RKO, sugiriendo una mayor capacidad de marronización en este área. El conjunto de estos datos indica que las regiones que presentan un proceso de *browning* UCP-1(+), inguinal y retroperitoneal, tienden a la elongación de sus mitocondrias favoreciéndose el acoplamiento y la generación de ATP. De esta manera, UCP-1 se encontraría desacoplando la cadena respiratoria sin ocasionar la degradación inmediata de estos orgánulos y manteniendo un equilibrio en el ciclo mitocondrial ante la situación de frío. Como resultado final, estos compartimentos de WAT estarían contribuyendo a la termogénesis del modelo BATIGF1RKO, lo que explica también la demora en la adaptación.

Para esclarecer el papel de la fusión mitocondrial en la termogénesis y examinar su función protectora en situaciones que favorecen el daño mitocondrial como la exposición al frío, se estudiaron las delecciones específicas en BAT de dos proteínas de fusión: OPA-1 y MFN-1.

En relación con el **modelo BATOPA1KO**, carente de la proteína de fusión interna OPA-1, se determinó una buena adaptación termogénica que fue similar a la que se observó en el grupo control durante las 4 primeras horas de la exposición al frío, pero más estable pasado ese periodo de tiempo. Curiosamente, estos animales mostraron un descenso en el porcentaje de grasa corporal que estuvo acompañado de un aumento de la masa de BAT interescapular sin cambios en la expresión de UCP-1. Un estudio previo en el cual generaron el mismo modelo animal determinó un mayor número de gotas uniloculares, características de los adipocitos blancos, en el BAT del modelo en una situación basal (Pereira *et al.*, 2021), sugiriendo un proceso de blanqueamiento o *whitening* de los adipocitos marrones carentes de OPA-1 en BAT. Esto concuerda con nuestros resultados indicando que este mecanismo promueve el aumento de la masa de BAT observada en nuestro modelo BATOPA1KO. Al igual que en nuestro estudio, observaron una reducción en el porcentaje de masa grasa total mientras que la masa magra aumentó en los ratones carentes de OPA-1 de 20 semanas/5 meses de edad (Pereira *et al.*, 2021) que podía



ser explicado por la activación del pardeamiento de los adipocitos blancos y su consecuente pérdida de grasa en los tejidos adiposos blancos. Curiosamente, la delección de OPA-1 afecta a la lipólisis de BAT, de tal manera que tras la activación farmacológica de la termogénesis por CL-316243 la cantidad de lípidos en el modelo BATOPA1KO es mayor que en el grupo control, coincidiendo con la estimulación del blanqueamiento adipocítico previamente mencionado.

No obstante, el análisis proteico del estado mitocondrial no arrojó ningún dato claro en nuestro modelo animal BATOPA1KO expuesto al frío. Probablemente, esto fue a consecuencia de que las imágenes tomadas por microscopía electrónica no permitieron examinar la morfología de las mitocondrias, así como no se llevó a cabo la respirometría de las mitocondrias aisladas de estos animales al sufrir retrasos en la generación de nuevos animales BATOPA1KO. Pese a eso, el estudio ultraestructural de las mitocondrias aisladas de los animales carentes de OPA-1 de Pereira *et al.*, 2021 mostró mitocondrias más fragmentadas cuyas crestas se encontraron estructuralmente alteradas, y también estos orgánulos presentaron una disfunción bioenergética, recalcando el papel de OPA-1 en la integridad de las crestas y, consecuentemente, en la respiración mitocondrial.

Teniendo en cuenta los datos obtenidos del modelo BATOPA1KO tras la exposición al frío, los ratones fueron tratados con el agonista β 3-adrenérgico CL-316243 durante 14 días puesto que estimula la respuesta termogénica a través del sistema nervioso simpático y favorece un incremento en la actividad metabólica de BAT (Cao *et al.*, 2004; Labbé *et al.*, 2016). Así, obtuvimos una situación prolongada de termogénesis activa. En este modelo animal no se encontraron diferencias significativas en la expresión de UCP-1 en BAT entre el grupo tratado y sin tratar, aunque existió una tendencia al alza en aquellos a los que se les administró el CL-316243. Este hecho era esperable ya que previamente durante la exposición al frío tampoco hubo cambios en su expresión. Por otro lado, la fisión mitocondrial estaba favorecida en el modelo BATOPA1KO en la situación basal, dato previamente observado en la bibliografía donde se determinó una fragmentación de mitocondrias ocasionada por la delección de OPA-1 en BAT (Pereira *et al.*, 2021), y tras el tratamiento con el agonista β 3-adrenérgico los parámetros de fusión aumentaron considerablemente impidiendo la fisión. De esta forma, la administración de CL-316243 promueve un estado bioenergéticamente más eficiente en BAT en el modelo BATOPA1KO, apoyando la fusión mitocondrial como un mecanismo protector del daño ocasionado durante la termogénesis adaptativa.

Respecto al estudio proteico de las regiones de tejido adiposo blanco más abundantes en el ratón, la evaluación de *browning* condujo a la observación de un incremento de la masa mitocondrial en la grasa subcutánea (iWAT) y visceral (eWAT), que en el último caso estuvo acompañada por un aumento del factor de biogénesis mitocondrial PGC-1 α , en el modelo BATOPA1KO expuesto al frío. A falta del análisis histológico de dichos compartimentos, previamente se ha postulado que la delección de OPA-1 en BAT promueve la inervación simpática de WAT


conduciendo a una activación del pardeamiento de los adipocitos blancos como mecanismo compensatorio de la disfunción mitocondrial presente en los animales *knock-out* (Pereira *et al.*, 2021). Por ello, el mantenimiento de la temperatura corporal durante la exposición al frío del modelo BATOPA1KO podría correlacionarse con el proceso de marronización de los compartimentos inguinal y epididimal de grasa blanca.

En consonancia con la activación del *browning* en WAT del modelo BATOPA1KO tras la exposición al frío, nuestros resultados enfocados en el estudio de una termogénesis activa prolongada en el tiempo por la administración del agonista β 3-adrenérgico CL-316243 determinaron un incremento significativo tanto en la expresión de UPC-1 como de marcadores mitocondriales en el iWAT del modelo BATOPA1KO comparado con el grupo control. Esto iría en el mismo sentido a lo descrito anteriormente de que la región subcutánea presenta un proceso de pardeamiento más activo debido a la delección de OPA-1. Asimismo, el estudio proteico de la dinámica mitocondrial reveló en estos animales una predisposición más clara a mitocondrias elongadas sugiriendo así mayor generación de ATP y favoreciendo el acoplamiento de la respiración mitocondrial.

En conjunto, nuestros datos y los del grupo de Dale Abel (Pereira *et al.*, 2021) sugieren que la mejora del equilibrio energético y de la termorregulación observada en los ratones BATOPA1KO se produce independientemente de la activación termogénica canónica de BAT.

Una vez observado el efecto de la delección de OPA-1 en BAT y la implicación de esta proteína de fusión en la termogénesis adaptativa, se evaluó la participación de MFN-1 en este proceso mediante la generación del **modelo BATMFN1KO**. La delección de MFN-1 en el tejido adiposo marrón ha sido previamente estudiada en poca profundidad debido a la determinación de que no afectaba a la funcionalidad de BAT en una exposición al frío de 5 horas de duración (Boutant *et al.*, 2017). No obstante, en este estudio previo concluyeron que MFN-2, de la misma familia de proteínas de fusión que MFN-1, juega un papel directo en las interacciones mitocondria-gotas lipídicas completamente necesario para la correcta actividad termogénica del tejido adiposo marrón (Boutant *et al.*, 2017). Nuestros resultados determinaron una inadaptación termogénica pasadas las 5 horas en el modelo BATMFN1KO, que van en concordancia con el estudio de Boutant *et al.*, 2017. En nuestro estudio preliminar y puesto que el número de ratones por grupo no es el adecuado, no se pueden sacar conclusiones claras de dicho experimento, pero probablemente la fisión no se vea favorecida, lo que no permite su adaptación al frío. Además, posiblemente la delección de MFN-1 promueva la mitofagia para el aclaramiento de las mitocondrias dañadas.

En relación con los resultados obtenidos en el **modelo UCP1-KO** para la evaluación de la dependencia de UCP-1 en la acción de algunos desacoplantes como FCCP, se llegó a la conclusión de que, aunque Bertholet *et al.*, 2022 muestra datos muy convincentes de que UCP-1 está implicada en la acción de FCCP en estudios de




patch-clamp de mitoplastos de grasa parda, estos no son traducibles a efectos directos sobre la termogénesis inducida por este desacoplante. De este modo, se podría sugerir que la falta de diferencia de potencial de membrana entre los tipos mitocondriales WT y KO se debe a un aumento del transportador de nucleótidos de adenina (AAC) en las mitocondrias UCP1-KO (Shabalina *et al.*, 2006), pero los resultados sobre la inactividad de los nucleótidos hacen que esta sugerencia sea poco probable.

Asimismo, no se puede determinar a partir de los experimentos clásicos aquí mostrados si el FCCP o el DNP en otras mitocondrias no pertenecientes a la grasa parda actúan a través de AAC. Sin embargo, podemos generalizar a partir de nuestras observaciones que la comparación entre los estudios clásicos de termogénesis en mitocondrias y los realizados por Bertholet *et al.*, 2022 mediante la técnica *patch-clamp* demuestran que los resultados de los estudios con este último procedimiento no pueden trasladarse sin reservas a los estudios mitocondriales clásicos. Es por ello por lo que el concepto defendido por Bertholet *et al.*, 2022 de que el efecto de FCCP y DNP depende de UCP-1, más específicamente de AAC, no se corrobora con los datos obtenidos en esta tesis doctoral. Con todo, la acción de DNP en la respiración mitocondrial de los animales WT indicó una cierta dependencia a la actividad de UCP-1. Cuando esta proteína se encontraba fuertemente inhibida por concentraciones más altas de GDP, la respiración apareció disminuida, efecto que no se determinó en las mitocondrias aisladas del modelo UCP1-KO.

Además, se ha sugerido que el mecanismo de acción de FCCP y DNP ha sido hasta ahora sustancialmente malinterpretado y que el mecanismo de acción dominante de los desacoplantes químicos es a través de la activación UCP-1 y AAC (Bertholet *et al.*, 2022). Debido a nuestros resultados de respiración en el modelo UCP1-KO tras el desacoplamiento mitocondrial por FCCP y DNP, se considera prematuro renunciar al concepto clásico de que estos desacoplantes químicos actúan en las mitocondrias de forma independiente a UCP-1 y/o AAC.

Los niveles fisiológicos de ácidos grasos libres alteran la conformación de UCP-1 sobre la cinética de unión del análogo de nucleótido inhibidor GDP a las mitocondrias aisladas de BAT provenientes de rata (Divakaruni, Humphrey & Brand, 2012), de esta manera el oleato y el GDP mostraron una cinética de tipo competitiva para el control de la respiración de las mitocondrias aisladas de BAT en ratón considerándose el oleato como un antagonista del efecto de GDP. No obstante, la acción del oleato depende de la actividad de UCP-1 como mostró el estudio en el modelo UCP1-KO donde existió un considerable retraso en el desacoplamiento por este ácido graso en la respiración de las mitocondrias aisladas de los animales *knock-out*. Asimismo, en relación con la acción más paulatina del oleato en la respiración en el modelo UCP1-KO o en presencia de altas concentraciones de GDP, indicó el mismo efecto en el potencial de membrana, despolarizándola más



rápidamente en presencia de UCP-1 y correlacionándose con la actividad de esta proteína desacoplante.


Por último, el uso de compuestos que disminuyen las concentraciones de ácidos grasos libres en la célula o cuyo efecto es eliminar el colesterol mitocondrial en estudios de respiración (Bertholet *et al.*, 2022) perjudican la obtención de resultados reales como hemos mostrado en el análisis de la acción de la ciclodextrina M β CD. Este compuesto no sólo afecta a la respiración máxima de estos orgánulos, sino que también deteriora la función mitocondrial. Estos datos obtenidos en esta tesis doctoral apoyan la conclusión obtenida de Ziolkowski *et al.*, 2010 de que la deleción del colesterol perjudica la bioenergética mitocondrial, y recalcan la importancia de seleccionar un buen componente para el análisis fiable de la respiración mitocondrial.

CONCLUSIONES

“Un país sin investigación es un país sin desarrollo.”

Margarita Salas

Bioquímica



En base a los estudios realizados y los resultados obtenidos en la presente tesis doctoral, se puede concluir lo siguiente:

1. El modelo BATIGF1RKO presenta una mejor adaptación termogénica que va acompañada de un ligero aumento en la expresión de la proteína desacoplante UCP-1 así como de un incremento de la masa mitocondrial. Asimismo, existe un aumento en la lipólisis del tejido adiposo marrón del modelo BATIGF1RKO tras la exposición al frío durante 12 horas, considerándose un proceso fundamental en la adaptación termogénica.
2. La fisión mitocondrial se ve incrementada en el tejido adiposo marrón del modelo BATIGF1RKO tras la exposición al frío durante 12 horas, pudiéndose relacionarse así con la mejor adaptación termogénica observada previamente. A su vez, las mitocondrias aisladas del tejido adiposo marrón del modelo BATIGF1RKO expuesto al frío exhiben una respiración basal y máxima más alta que el grupo control, y su respiración global no se ve alterada cuando UCP-1 se encuentra inhibida.
3. La mitofagia parece jugar un papel fundamental en el mantenimiento de la población sana de mitocondrias durante la exposición al frío en el tejido adiposo marrón del modelo BATIGF1RKO. Nuestros datos sugieren que cuando se impide el flujo autofágico por la acción de la cloroquina, se promueve la fusión mitocondrial como mecanismo protector.
4. El proceso de *browning* podría estar especialmente estimulado en los compartimentos inguinal y retroperitoneal de tejido adiposo blanco en relación con la expresión de UCP-1 en los ratones carentes de IGF-1R tras la exposición al frío. Ante esta situación, se favorece la fusión mitocondrial en estas regiones de grasa blanca en dichos animales.
5. El modelo BATOPA1KO muestra menor porcentaje de grasa por masa total sin afectar a la homeostasis glucídica ni al peso corporal. Asimismo, la delección de OPA-1 específicamente en el tejido adiposo marrón en ratones no altera la adaptación termogénica de dichos animales y promueve una hipertrofia del tejido adiposo marrón como mecanismo compensatorio.
6. El tratamiento farmacológico con el β 3-adrenérgico CL-316243 sugiere un incremento en la expresión de UCP-1 y puede favorecer la fusión mitocondrial en el tejido adiposo marrón del modelo BATOPA1KO, que exhibió una tendencia al estado fisionado cuando no era tratado con este fármaco. Además, este tratamiento aumenta ligeramente el número de mitocondrias.
7. La lipólisis se ve favorecida tras el tratamiento con el β 3-adrenérgico CL-316243 en el tejido adiposo marrón. No obstante, la delección de OPA-1 en el tejido adiposo marrón impide el correcto funcionamiento de la lipólisis en dicho tejido.

8. La delección de la proteína de fusión MFN-1 en el tejido adiposo marrón de ratones parece promover un empeoramiento de la sensibilidad a glucosa y una adaptación termogénica inadecuada al frío. Dicha severa inadaptación al frío sugiere que la fusión previa de las mitocondrias es condición *sine qua non* para que la fisión tenga lugar.
9. El oleato presenta una acción dependiente de UCP-1, que a su vez se ve regulada por la cantidad de UCP-1 activa. Sin embargo, la acción de los desacoplantes FCCP y DNP se produce incluso cuando UCP-1 no se expresa, aunque en el caso del DNP puede actuar a través de ella cuando se encuentra presente. Además, el DNP es un desacoplante igual de potente que el FCCP.

CONCLUSIÓN FINAL

La dinámica mitocondrial juega un papel fundamental en la termogénesis adaptativa, considerándose la fisión mitocondrial como un mecanismo generador de calor durante la exposición al frío mientras que la fusión mitocondrial desempeña una función protectora del daño ocasionado en el mantenimiento de la temperatura corporal, contribuyendo así a la propia termorregulación del organismo.

Además, algunos de los agentes desacoplantes mitocondriales más potentes como el FCCP y el DNP actúan sin necesidad de que UCP-1 se encuentre activa, lo que resalta la importancia de los mecanismos independientes de UCP-1 en la termogénesis adaptativa.

BIBLIOGRAFÍA

A

Algire C.; Medrikova D. & Herzig S. (2013) "White and brown adipose stem cells: from signaling to clinical implications." *Biochimica et Biophysica Acta*; 1831(5):896-904. doi: [10.1016/j.bbali.2012.10.001](https://doi.org/10.1016/j.bbali.2012.10.001)

Anand R. et al. (2014) "The i-AAA protease YME1L and OMA1 cleave OPA1 to balance mitochondrial fusion and fission." *Journal of Cell Biology*; 204(6):919-29. doi: [10.1083/jcb.201308006](https://doi.org/10.1083/jcb.201308006)

Andolfi C. & Fisichella P.M. (2018) "Epidemiology of Obesity and Associated Comorbidities." *Journal of Laparoendoscopic and Advanced Surgical Techniques A*; 28(8):919-924. doi: [10.1089/lap.2018.0380](https://doi.org/10.1089/lap.2018.0380)

Apovian C.M. et al. (2013) "A randomized, phase 3 trial of naltrexone SR/bupropion SR on weight and obesity-related risk factors (COR-II)." *Obesity (Silver Spring)*; 21(5):935-43. doi: [10.1002/oby.20309](https://doi.org/10.1002/oby.20309)

Ahrieh L.I.; Mihalache L. & Covasa M. (2019) "Irisin: A Hope in Understanding and Managing Obesity and Metabolic Syndrome." *Frontiers in Endocrinology (Lausanne)*; 10:524. doi: [10.3389/fendo.2019.00524](https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00524)

Ashraf R. & Kumar S. (2022) "Mfn2-mediated mitochondrial fusion promotes autophagy and suppresses ovarian cancer progression by reducing ROS through AMPK/mTOR/ERK signaling." *Cellular and Molecular Life Sciences*; 79(11):573. doi: [10.1007/s00018-022-04595-6](https://doi.org/10.1007/s00018-022-04595-6)

Ashrafi G. & Schwarz T.L. (2013) "The pathways of mitophagy for quality control and clearance of mitochondria." *Cell Death and Differentiation*; 20(1):31-42. doi: [10.1038/cdd.2012.81](https://doi.org/10.1038/cdd.2012.81)

Aung, K.; Lorenzo, C.; Hinojosa, M.A. & Haffner S.M. (2014) "Risk of developing diabetes and cardiovascular disease in metabolically unhealthy normal-weight and metabolically healthy obese individuals." *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 99(2):462-468. doi: [10.1210/jc.2013-2832](https://doi.org/10.1210/jc.2013-2832)

Avgerinos K.I.; Spyrou N.; Mantzoros C.S. & Dalamaga M. (2019) "Obesity and cancer risk: emerging biological mechanisms and perspectives." *Metabolism*; 92:121-135. doi: [10.1016/j.metabol.2018.11.001](https://doi.org/10.1016/j.metabol.2018.11.001)

Avila C. et al. (2015) "An Overview of Links Between Obesity and Mental Health." *Current Obesity Reports*; 4(3):303-10. doi: [10.1007/s13679-015-0164-9](https://doi.org/10.1007/s13679-015-0164-9)

B

Bäck K. & Arnqvist H.J. (2009) "Changes in insulin and IGF-I receptor expression during differentiation of human preadipocytes." *Growth Hormones & IGF Research*; 19(2):101-11. doi: [10.1016/j.ghir.2008.06.004](https://doi.org/10.1016/j.ghir.2008.06.004)

Bartelt A. & Heeren J. (2014) "Adipose tissue browning and metabolic health." *Nature Reviews: Endocrinology*; 10(1):24-36. doi: [10.1038/nrendo.2013.204](https://doi.org/10.1038/nrendo.2013.204)

Bertholet A.M. et al. (2022) "Mitochondrial uncouplers induce proton leak by activating AAC and UCP1." *Nature*; 606(7912):180-187. doi: [10.1038/s41586-022-04747-5](https://doi.org/10.1038/s41586-022-04747-5)

Bhupathiraju S.N. & Hu F.B. (2016) "Epidemiology of Obesity and Diabetes and Their Cardiovascular Complications." *Circulation Research*; 118(11):1723-35. doi: [10.1161/CIRCRESAHA.115.306825](https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.115.306825)

Blew R.M. et al. (2002) "Assessing the validity of body mass index standards in early postmenopausal women." *Obesity Research*; 10: 799-808. doi: [10.1038/oby.2002.108](https://doi.org/10.1038/oby.2002.108)

Blondin D.P. & Haman F. (2018) "Shivering and nonshivering thermogenesis in skeletal muscles." *Handbook of Clinical Neurology*; 156:153-173. doi: [10.1016/B978-0-444-63912-7.00010-2](https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63912-7.00010-2)

Bluher M. (2010) "The distinction of metabolically 'healthy' from 'unhealthy' obese individuals." *Current Opinion in Lipidology*; 21(1):38-43. doi: [10.1097/MOL.0b013e3283346ccc](https://doi.org/10.1097/MOL.0b013e3283346ccc)

Boonchaya-anant P. & Apovian C.M. (2014) "Metabolically healthy obesity - does it exist?" *Current Atherosclerosis Reports*; 16(10):441. doi: [10.1007/s11883-014-0441-1](https://doi.org/10.1007/s11883-014-0441-1)

Bosello O.; Donataccio M.P. & Cuzzolaro M. (2016) "Obesity or obesities? Controversies on the association between body mass index and premature mortality." *Eating and Weight Disorders*; 21:165-174. doi: 10.1007/s40519-016-0278-4

Boutant M. et al. (2017) "Mfn2 is critical for brown adipose tissue thermogenic function." *EMBO Journal*; 36(11):1543-1558. doi: 10.15252/embj.201694914

Bradshaw P.T.; Monda K.L. & Stevens J. (2013) "Metabolic syndrome in healthy obese, overweight, and normal weight individuals: the Atherosclerosis Risk in Communities Study." *Obesity (Silver Spring)*; 21:203-9. doi: 10.1002/oby.20248

C

Cannon B. & Nedergaard J. (2004) "Brown adipose tissue: function and physiological significance." *Physiological Reviews*; 84(1):277-359. doi: 10.1152/physrev.00015.2003

Cao W. et al. (2004) "p38 mitogen-activated protein kinase is the central regulator of cyclic AMP-dependent transcription of the brown fat uncoupling protein 1 gene." *Molecular and Cellular Biology*; 24(7):3057-67. doi: 10.1128/MCB.24.7.3057-3067.2004

Cardanho-Ramos C. & Morais V.A. (2021) "Mitochondrial Biogenesis in Neurons: How and Where." *International Journal of Molecular Sciences*; 22(23):13059. doi: 10.3390/ijms222313059

Carneiro I.P. et al. (2016) "Is obesity associated with altered energy expenditure?" *Advances in Nutrition*; 7:476-487. doi: 10.3945/an.115.008755

Carpentier A.C.; Blondin D.P.; Haman F. & Richard D. (2023) "Brown Adipose Tissue-A Translational Perspective." *Endocrine Reviews*; 44(2):143-192. doi: 10.1210/endrev/bnac015

Cawley J. (2004) "An economic framework for understanding physical activity and eating behaviors." *American Journal of Preventive Medicine*; 27(3Suppl):117-25. doi: 10.1016/j.amepre.2004.06.012

Chan D.C. (2012) "Fusion and fission: interlinked processes critical for mitochondrial health." *Annual Reviews of Genetics*; 46:265-87. doi: 10.1146/annurev-genet-110410-132529

Chao A.M.; Quigley K.M. & Wadden T.A. (2021) "Dietary interventions for obesity: clinical and mechanistic findings." *Journal of Clinical Investigation*; 131(1):e140065. doi: 10.1172/JCI140065

Chen Y. & Dorn G.W. (2013) "PINK1-phosphorylated mitofusin 2 is a Parkin receptor for culling damaged mitochondria." *Science*; 340(6131):471-5. doi: 10.1126/science.1231031

Chondronikola M. et al. (2016) "Brown Adipose Tissue Activation Is Linked to Distinct Systemic Effects on Lipid Metabolism in Humans." *Cell Metabolism*; 23(6):1200-1206. doi: 10.1016/j.cmet.2016.04.029

Chouchani E.T. & Kajimura S. (2019) "Metabolic adaptation and maladaptation in adipose tissue." *Nature Metabolism*; 1(2):189-200. doi: 10.1038/s42255-018-0021-8

Chusyd D.E.; Wang D.; Huffman D.M. & Nagy T.R. (2016) "Relationships between rodent white adipose fat pads and human white adipose fat depots." *Frontiers in Nutrition*; 3:10. doi: 10.3389/fnut.2016.00010

Cinti S. (2018a) "Adipose Organ Development and Remodeling." *Comprehensive Physiology*; 8(4):1357-1431. doi: 10.1002/cphy.c170042

Cinti S. (2018b) "Pink Adipocytes." *Trends in Endocrinology and Metabolism*; 29(9):651-666. doi: 10.1016/j.tem.2018.05.007

Cypess A.M. et al. (2009) "Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans." *New England Journal of Medicine*; 360(15):1509-17. doi: 10.1056/NEJMoa0810780

Cypess, A.M. et al. (2013) "Anatomical localization, gene expression profiling and functional characterization of adult human neck brown fat." *Nature Medicine*; 19:635-639. doi: 10.1038/nm.3112

Cypess A.M. et al. (2015) "Activation of human brown adipose tissue by a β -adrenergic receptor agonist." *Cell Metabolism*;21(1):33-8.
doi: [10.1016/j.cmet.2014.12.009](https://doi.org/10.1016/j.cmet.2014.12.009)

D

de Brito O.M. & Scorrano L. (2008) "Mitofusin 2 tethers endoplasmic reticulum to mitochondria." *Nature*; 456(7222):605-10.
doi: [10.1038/nature07534](https://doi.org/10.1038/nature07534)

de Meis L. et al. (2010) "Fusion of the endoplasmic reticulum and mitochondrial outer membrane in rats brown adipose tissue: activation of thermogenesis by Ca^{2+} ." *PLoS One*;5(3):e9439.
doi: [10.1371/journal.pone.0009439](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009439)

Divakaruni A.S.; Humphrey D.M. & Brand M.D. (2012) "Fatty acids change the conformation of uncoupling protein 1 (UCP1)." *Journal of Biological Chemistry*; 287(44):36845-53.
doi: [10.1074/jbc.M112.381780](https://doi.org/10.1074/jbc.M112.381780)

Dixon A.E. & Peters U. (2018) "The effect of obesity on lung function." *Expert Review of Respiratory Medicine*; 12(9):755-767.
doi: [10.1080/17476348.2018.1506331](https://doi.org/10.1080/17476348.2018.1506331)

Duvezin-Caubet S. et al. (2006) "Proteolytic processing of OPA1 links mitochondrial dysfunction to alterations in mitochondrial morphology." *Journal of Biological Chemistry*; 281(49):37972-9.
doi: [10.1074/jbc.M606059200](https://doi.org/10.1074/jbc.M606059200)

E

Egan D.F. et al. (2011) "Phosphorylation of ULK1 (hATG1) by AMP-activated protein kinase connects energy sensing to mitophagy." *Science*;331(6016):456-61.
doi: [10.1126/science.1196371](https://doi.org/10.1126/science.1196371)

Eiyama A. & Okamoto K. (2015) "PINK1/Parkin-mediated mitophagy in mammalian cells." *Current Opinion in Cell Biology*; 33:95-101.
doi: [10.1016/j.ceb.2015.01.002](https://doi.org/10.1016/j.ceb.2015.01.002)

Enerbäck S. et al. (1997) "Mice lacking mitochondrial uncoupling protein are cold-

sensitive but not obese." *Nature*; 387(6628):90-4. doi: [10.1038/387090a0](https://doi.org/10.1038/387090a0)

Enerbäck S. (2009) "The origins of brown adipose tissue." *The New England Journal of Medicine*;360(19):2021-3.
doi: [10.1056/NEJMcibr0809610](https://doi.org/10.1056/NEJMcibr0809610)

Esteve Ràfols M. (2014) "Adipose tissue: cell heterogeneity and functional diversity." *Endocrinología y Nutrición*; 61(2):100-12.
doi: [10.1016/j.endonu.2013.03.011](https://doi.org/10.1016/j.endonu.2013.03.011)

F

Fisher F.M. et al. (2012) "FGF21 regulates PGC-1 α and browning of white adipose tissues in adaptive thermogenesis." *Genes & Development*;26(3):271-81.
doi: [10.1101/gad.177857.111](https://doi.org/10.1101/gad.177857.111)

Freedman D.S.; Dietz WH.; Srinivasan SR. & Berenson GS. (2009) "Risk factors and adult body mass index among overweight children: the Bogalusa Heart Study." *Pediatrics*; 123:750-7. doi: [10.1542/peds.2008-1284](https://doi.org/10.1542/peds.2008-1284)

Friedman S.L.; Neuschwander-Tetri BA.; Rinella M. & Sanyal AJ. (2018) "Mechanisms of NAFLD development and therapeutic strategies." *Nature Medicine*; 24(7):908-922.
doi: [10.1038/S41591-018-0104-9](https://doi.org/10.1038/S41591-018-0104-9)

Friedman J.R. et al. (2011) "ER tubules mark sites of mitochondrial division." *Science*; 334(6054):358-62.
doi: [10.1126/science.1207385](https://doi.org/10.1126/science.1207385)

Funcke J.B. & Scherer P.E. (2019) "Beyond adiponectin and leptin: adipose tissue-derived mediators of inter-organ communication." *Journal of Lipid Research*; 60(10):1648-1684. doi: [10.1194/jlr.R094060](https://doi.org/10.1194/jlr.R094060)

G

Gao S. & Hu J. (2021) "Mitochondrial Fusion: The Machineries In and Out." *Trends in Cell Biology*;31(1):62-74.
doi: [10.1016/j.tcb.2020.09.008](https://doi.org/10.1016/j.tcb.2020.09.008)

Gesta S.; Tseng Y.H. & Kahn C.R. (2007) "Developmental origin of fat: tracking obesity to its source." *Cell*; 131(2):242-56.
doi: [10.1016/j.cell.2007.10.004](https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.10.004)

Ghaben A.L. & Scherer P.E. (2019) “Adipogenesis and metabolic health.” *Nature Reviews in Molecular Cell Biology*; 20(4):242-258. doi: [10.1038/s41580-018-0093-z](https://doi.org/10.1038/s41580-018-0093-z)

Giralt M. & Villarroya F. (2013) “White, brown, beige/brite: different adipose cells for different functions?” *Endocrinology*; 154(9):2992-3000. doi: [10.1210/en.2013-1403](https://doi.org/10.1210/en.2013-1403)

Golozoubova V. et al. (2001) “Only UCP1 can mediate adaptive nonshivering thermogenesis in the cold.” *FASEB Journal*; 15(11):2048-50. doi: [10.1096/fj.00-0536fje](https://doi.org/10.1096/fj.00-0536fje)

Granneman J.G.; Burnazi M.; Zhu Z. & Schwamb L.A. (2003) “White adipose tissue contributes to UCP1-independent thermogenesis.” *American Journal of Physiology, Endocrinology & Metabolism*; 285(6):E1230-6. doi: [10.1152/ajpendo.00197.2003](https://doi.org/10.1152/ajpendo.00197.2003)

Guerra C. et al. (2001) “Brown adipose tissue-specific insulin receptor knock-out shows diabetic phenotype without insulin resistance.” *Journal Clinical Investigation*; 108(8):1205-13. doi: [10.1172/JCI13103](https://doi.org/10.1172/JCI13103)

H

Haase J. et al. (2014) “Local proliferation of macrophages in adipose tissue during obesity-induced inflammation.” *Diabetologia*; 57:562-571. doi: [10.1007/s00125-013-3139-y](https://doi.org/10.1007/s00125-013-3139-y)

Haeusler R. A.; McGraw T. E. & Accili D. (2018) “Biochemical and cellular properties of insulin receptor signalling.” *Nature Reviews: Molecular Cell Biology*; 19:31-44. doi: [10.1038/nrm.2017.89](https://doi.org/10.1038/nrm.2017.89)

Hafidi M.E.; Buelna-Chontal M.; Sánchez-Muñoz F. & Carbó R. (2019) “Adipogenesis: A Necessary but Harmful Strategy.” *Internal Journal of Molecular Sciences*; 20(15):3657. doi: [10.3390/ijms20153657](https://doi.org/10.3390/ijms20153657)

Hall K.D. (2012) “Modeling metabolic adaptations and energy regulation in humans.” *Annual Review of Nutrition*; 32:15.1-15.20. doi: [10.1146/annurev-nutr-071811-150705](https://doi.org/10.1146/annurev-nutr-071811-150705)

Hall K.D. et al. (2012) “Energy balance and its components: implications for body weight regulation.” *The American Journal of Clinical Nutrition*; 95:989-994. doi: [10.3945/ajcn.112.036350](https://doi.org/10.3945/ajcn.112.036350)

Hall K.D. & Kahan S. (2018) “Maintenance of Lost Weight and Long-Term Management of Obesity.” *The Medical Clinics of North America*; 102(1):183-197. doi: [10.1016/j.mcna.2017.08.012](https://doi.org/10.1016/j.mcna.2017.08.012)

Harms M. & Seale P. (2013) “Brown and beige fat: development, function and therapeutic potential.” *Nature Medicine*; 19(10):1252-63. doi: [10.1038/nm.3361](https://doi.org/10.1038/nm.3361)

Hassan M.; Latif N. & Yacoub M. (2012) “Adipose tissue: friend or foe?” *Nature Reviews in Cardiology*; 9(12):689-702. doi: [10.1038/nrcardio.2012.148](https://doi.org/10.1038/nrcardio.2012.148)

Heck A.M.; Yanovski J.A. & Calis K.A. (2000) “Orlistat, a new lipase inhibitor for the management of obesity.” *Pharmacotherapy*; 20(3):270-9. doi: [10.1592/phco.20.4.270.34882](https://doi.org/10.1592/phco.20.4.270.34882)

Heymsfield S.B. & Wadden T.A. (2017) “Mechanisms, Pathophysiology, and Management of Obesity.” *The New England Journal of Medicine*; 376(3):254-266. doi: [10.1056/NEJMra1514009](https://doi.org/10.1056/NEJMra1514009)

Hill J.O. (2006) “Understanding and addressing the epidemic of obesity: an energy balance perspective.” *Endocrine Reviews*; 27(7):750-761. doi: [10.1210/er.2006-0032](https://doi.org/10.1210/er.2006-0032)

Hill J.O.; Catenacci V. & Wyatt H.R. (2005) “Obesity: overview of an epidemic.” *The Psychiatric Clinics of North America*; 28 (2005) 1-23. doi: [10.1016/j.psc.2004.09.010](https://doi.org/10.1016/j.psc.2004.09.010)

Hotamisligil G.S. (2006) “Inflammation and metabolic disorders.” *Nature*; 444: 860-867. doi: [10.1038/nature05485](https://doi.org/10.1038/nature05485)

Hotamisligil G.S. (2017a) Foundations of immunometabolism and implications for metabolic health and disease. *Immunity*; 47: 406-420. doi: [10.1016/j.immuni.2017.08.009](https://doi.org/10.1016/j.immuni.2017.08.009)

Hotamisligil G.S. (2017b) “Inflammation, metaflammation and immunometabolic disorders.” *Nature*; 542: 177-185. doi: [10.1038/nature21363](https://doi.org/10.1038/nature21363)

Huang P.L. (2009) "A comprehensive definition for metabolic syndrome." *Disease Models and Mechanisms*;2(5-6):231-7. doi: [10.1242/dmm.001180](https://doi.org/10.1242/dmm.001180)

I

Ikeda K. et al. (2017) "UCP1-independent signaling involving SERCA2b-mediated calcium cycling regulates beige fat thermogenesis and systemic glucose homeostasis." *Nature Medicine*; 23:1454-1465. doi: [10.1038/nm.4429](https://doi.org/10.1038/nm.4429)

Ishihara N.; Fujita Y.; Oka T. & Mihara K. (2006) "Regulation of mitochondrial morphology through proteolytic cleavage of OPA1." *EMBO Journal*;25(13):2966-77. doi: [10.1038/sj.emboj.7601184](https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601184)

J

Jespersen N.Z. et al. (2013) "A classical brown adipose tissue mRNA signature partly overlaps with brite in the supra-clavicular region of adult humans." *Cell Metabolism*; 17:798–805. doi: [10.1016/j.cmet.2013.04.011](https://doi.org/10.1016/j.cmet.2013.04.011)

K

Kajimura S. (2015) "Promoting brown and beige adipocyte biogenesis through the PRDM16 pathway." *Internal Journal of Obesity Supplements*;5:S11–S14. doi: [10.1038/ijosup.2015.4](https://doi.org/10.1038/ijosup.2015.4)

Kajno E.; McGraw T.E. & Gonzalez E. (2015) "Development of a new model system to dissect isoform specific Akt signalling in adipocytes." *The Biochemical Journal*;468(3):425-34. doi: [10.1042/BJ20150191](https://doi.org/10.1042/BJ20150191)

Kastin A.J.; Akerstrom V. & Pan W. (2002) "Interactions of glucagon-like peptide-1 (GLP-1) with the blood-brain barrier." *Journal of Molecular Neuroscience*; 18(1-2):7-14. doi: [10.1385/JMN:18:1-2:07](https://doi.org/10.1385/JMN:18:1-2:07)

Kawai T.; Autieri M.V. & Scalia R. (2021) "Adipose tissue inflammation and metabolic dysfunction in obesity." *American Journal of Physiology, Cell Physiology*; 320(3):375-391. doi: [10.1152/ajpcell.00379.2020](https://doi.org/10.1152/ajpcell.00379.2020)

Kazak L. et al. (2015) "A creatine-driven substrate cycle enhances energy expenditure and thermogenesis in beige fat." *Cell*; 163:643-55. doi: [10.1016/j.cell.2015.09.035](https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.09.035)

Knudsen J.G. et al. (2014) "Role of IL-6 in exercise training- and cold-induced UCP1 expression in subcutaneous white adipose tissue." *PLoS One*; 9(1):e84910. doi: [10.1371/journal.pone.0084910](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0084910)

Koshiba T. et al. (2004) "Structural basis of mitochondrial tethering by mitofusin complexes." *Science*; 305(5685):858-62. doi: [10.1126/science.1099793](https://doi.org/10.1126/science.1099793)

Kozak L.P. (2010) "Brown fat and the myth of diet-induced thermogenesis." *Cell Metabolism*; 11(4):263-267. doi: [10.1016/j.cmet.2010.03.009](https://doi.org/10.1016/j.cmet.2010.03.009)

Kramer C.K.; Zinman B. & Retnakaran R. (2013) "Are metabolically healthy overweight and obesity benign conditions?: A systematic review and meta-analysis." *Annals of Internal Medicine*;159(11):758-769. doi: [10.7326/0003-4819-159-11-201312030-00008](https://doi.org/10.7326/0003-4819-159-11-201312030-00008)

L

Labbé S.M. et al. (2016) "Metabolic activity of brown, "beige," and white adipose tissues in response to chronic adrenergic stimulation in male mice." *American Journal of Physiology, Endocrinology and Metabolism*;311(1):E260-8. doi: [10.1152/ajpendo.00545.2015](https://doi.org/10.1152/ajpendo.00545.2015)

Langer T.; Käser M.; Klanner C. & Leonhard K. (2001) "AAA proteases of mitochondria: quality control of membrane proteins and regulatory functions during mitochondrial biogenesis." *Biochemical Society Transactions*;29:431-6. doi: [10.1042/bst0290431](https://doi.org/10.1042/bst0290431)

Las G. et al. (2011) "Fatty acids suppress autophagic turnover in β -cells." *Journal of Biological Chemistry*; 286(49):42534-42544. doi: [10.1074/jbc.M111.242412](https://doi.org/10.1074/jbc.M111.242412)

Lawler H.M. et al. (2016) "Adipose Tissue Hypoxia, Inflammation, and Fibrosis in Obese Insulin-Sensitive and Obese Insulin-Resistant Subjects." *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*; 101:1422-1428. doi: [10.1210/jc.2015-4125](https://doi.org/10.1210/jc.2015-4125)

Le Roux C.W. et al. (2006) "Gut hormone profiles following bariatric surgery favor an anorectic state, facilitate weight loss, and improve metabolic parameters." *Annals of Surgery*;243(1):108-14.

doi: [10.1097/01.sla.0000183349](https://doi.org/10.1097/01.sla.0000183349)

Lee M.J.; Wu Y. & Fried S.K. (2013) "Adipose tissue heterogeneity: implication of depot differences in adipose tissue for obesity complications." *Molecular Aspects of Medicine*;34:1-11.

doi: [10.1016/j.mam.2012.10.001](https://doi.org/10.1016/j.mam.2012.10.001)

Lidell M.E. et al. (2013) "Evidence for two types of brown adipose tissue in humans." *Nature Medicine*;19(5):631-4.

doi: [10.1038/nm.3017](https://doi.org/10.1038/nm.3017)

Liesa M. & Shirihaï O.S. (2013) "Mitochondrial dynamics in the regulation of nutrient utilization and energy expenditure." *Cell Metabolism*;17(4):491-506.

doi: [10.1016/j.cmet.2013.03.002](https://doi.org/10.1016/j.cmet.2013.03.002)

Liesa M.; Palacín M. & Zorzano A. (2009) "Mitochondrial dynamics in mammalian health and disease." *Physiological Reviews*; 89(3):799-845.

doi: [10.1152/physrev.00030.2008](https://doi.org/10.1152/physrev.00030.2008)

Liou A.P. et al. (2013) "Conserved shifts in the gut microbiota due to gastric bypass reduce host weight and adiposity." *Science Translational Medicine*; 27;5(178):178ra41.

doi: [10.1126/scitranslmed.3005687](https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3005687)

Liu X. et al. (2015) "Brown Adipose Tissue Transplantation Reverses Obesity in Ob/Ob Mice." *Endocrinology*; 156(7):2461-9.

doi: [10.1210/en.2014-1598](https://doi.org/10.1210/en.2014-1598)

Liu X.Z.; Pedersen L. & Halberg N. (2021) "Cellular mechanisms linking cancers to obesity." *Cell Stress*; 5:55-72.

doi: [10.15698/cst2021.05.248](https://doi.org/10.15698/cst2021.05.248)

Liu L. et al. (2022) "Adipokines, adiposity, and atherosclerosis." *Cellular and Molecular Life Sciences*;79(5):272.

doi: [10.1007/s00018-022-04286-2](https://doi.org/10.1007/s00018-022-04286-2)

Loncar D.; Afzelius B.A. & Cannon B. (1988) "Epididymal white adipose tissue after cold stress in rats. II. Mitochondrial changes." *Journal of Ultrastructure and Molecular*

Structure Research; 101(2-3):199-209.
doi: [10.1016/0889-1605\(88\)90010-9](https://doi.org/10.1016/0889-1605(88)90010-9)

Longo M. et al. (2019) "Adipose Tissue Dysfunction as Determinant of Obesity-Associated Metabolic Complications" *International Journal of Molecular Sciences*; 20(9):2358. doi:[10.3390/ijms20092358](https://doi.org/10.3390/ijms20092358)

Loomba R.; Friedman S.L. & Shulman G.I. (2021) "Mechanisms and disease consequences of nonalcoholic fatty liver disease." *Cell*; 13;184(10):2537-2564.
doi: [10.1016/j.cell.2021.04.015](https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.04.015)

Lu Y. et al. (2018) "Mitophagy is required for brown adipose tissue mitochondrial homeostasis during cold challenge." *Scientific Reports*; 8(1):8251.
doi: [10.1038/s41598-018-26394-5](https://doi.org/10.1038/s41598-018-26394-5)

Lumeng C.N. & Saltiel A.R. (2011) "Inflammatory links between obesity and metabolic disease." *Journal of Clinical Investigation*;121:2111-2117.

doi: [10.1172/JCI57132](https://doi.org/10.1172/JCI57132)

Luong Q.; Huang J. & Lee K.Y. (2019) "Deciphering White Adipose Tissue Heterogeneity." *Biology*; 8(2):23.
doi: [10.3390/biology8020023](https://doi.org/10.3390/biology8020023)

M

Malone J.I. & Hansen B.C. (2019) "Does obesity cause type 2 diabetes mellitus (T2DM)? Or is it the opposite?" *Pediatric Diabetes*; 20(1):5-9. doi: [10.1111/pedi.12787](https://doi.org/10.1111/pedi.12787)

Markham A. (2021) "Setmelanotide: First Approval." *Drugs*; 81(3):397-403.
doi: [10.1007/s40265-021-01470-9](https://doi.org/10.1007/s40265-021-01470-9)

Marlatt K.L. & Ravussin E. (2017) "Brown Adipose Tissue: an Update on Recent Findings." *Current Obesity Reports*; 6(4):389-396. doi: [10.1007/s13679-017-0283-6](https://doi.org/10.1007/s13679-017-0283-6)

Masaki T.; Yoshimatsu H.; Chiba S. & Sakata T. (2000) "Impaired response of UCP family to cold exposure in diabetic (db/db) mice." *American Journal of Physiology: Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*; 279(4):R1305-9.
doi: [10.1152/ajpregu.2000.279.4.R1305](https://doi.org/10.1152/ajpregu.2000.279.4.R1305)

Mauer J. et al. (2014) "Signaling by IL-6 promotes alternative activation of macrophages to limit endotoxemia and obesity-associated resistance to insulin." *Nature Immunology*; 15(5):423-30. doi: 10.1038/ni.2865

Mehlem A. et al. (2013) "Imaging of neutral lipids by oil red O for analyzing the metabolic status in health and disease." *Nature Protocols*;8(6):1149-54. doi: 10.1038/nprot.2013.055

Mihalopoulos N.L. et al. (2010) "Expected changes in clinical measures of adiposity during puberty." *The Journal of Adolescent Health*;47:360-6. doi: 10.1016/j.jadohealth.2010.03.019

Moon H.U. et al. (2018) "The Association of Adiponectin and Visceral Fat with Insulin Resistance and β -Cell Dysfunction." *Journal of Korean Medical Sciences*; 34(1): e7. doi: 10.3346/jkms.2019.34.e7

Moschos S.J. & Mantzoros C.S. (2002) "The role of the IGF system in cancer: from basic to clinical studies and clinical applications." *Oncology*;63:317-32. doi: 10.1159/000066230

Moyzis A.G.; Sadoshima J. & Gustafsson Å.B. (2015) "Mending a broken heart: the role of mitophagy in cardioprotection." *American Journal of Physiology: Heart and Circulatory Physiology*;308(3):H183-92. doi: 10.1152/ajpheart.00708.2014

Muñoz-Yáñez C.; García-Vargas GG. & Pérez-Morales R. (2017) "Monogenic, Polygenic and Multifactorial Obesity in Children: Genetic and Environmental Factors". *Austin Journal of Nutrition and Metabolism*; 4(3):1052.

Myers M.G. Jr. & Olson D.P. (2012) "Central nervous system control of metabolism." *Nature*;491:357-363. doi: 10.1038/nature11705

N

Nagashima S. et al. (2020) "Golgi-derived PI(4)P-containing vesicles drive late steps of mitochondrial division." *Science*; 367(6484):1366-1371. doi: 10.1126/science.aax6089

Nakae J. et al. (2003) "The forkhead transcription factor Foxo1 regulates adipocyte differentiation." *Developmental Cell*;4(1):119-29. doi: 10.1016/s1534-5807(02)00401-x

Naon D. et al. (2016) "Critical reappraisal confirms that Mitofusin 2 is an endoplasmic reticulum-mitochondria tether." *Proceedings of the National Academy of Sciences United States of America*; 113(40):11249-11254. doi: 10.1073/pnas.1606786113

Nedergaard J., Bengtsson T. & Cannon B. (2007) "Unexpected evidence for active brown adipose tissue in adult humans." *American Journal of Physiology: Endocrinology and Metabolism*;293:E444-E452. doi: 10.1152/ajpendo.00691.2006

Nedergaard J. & Cannon B. (2018) "Brown adipose tissue as a heat-producing thermoeffector." *Handbook of Clinical Neurology*;156:137-152. doi: 10.1016/B978-0-444-63912-7.00009-6

Nicholson W.M. (1946) "Emotional factors in obesity." *American Journal of Medical Sciences*; 211:443-7.

Nolfi-Donagan D.; Braganza A. & Shiva S. (2020) "Mitochondrial electron transport chain: Oxidative phosphorylation, oxidant production, and methods of measurement." *Redox Biology*; 37:101674. doi: 10.1016/j.redox.2020.101674

O

Obregon M.J. (2014) "Adipose tissues and thyroid hormones." *Frontiers Physiology*; 5:479. doi: 10.3389/fphys.2014.00479

Oelkrug R. et al. (2013) "Brown fat in a protoendothermic mammal fuels eutherian evolution." *Nature Communications*; 4:2140. doi: 10.1038/ncomms3140

Ouellet V. et al. (2011) "Outdoor temperature, age, sex, body mass index, and diabetic status determine the prevalence, mass, and glucose-uptake activity of ^{18}F -FDG-detected BAT in humans." *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*; 96(1):192-9. doi: 10.1210/jc.2010-0989

Ouellet V. et al. (2012) "Brown adipose tissue oxidative metabolism contributes to energy expenditure during acute cold exposure in humans." *Journal of Clinical Investigation*;122(2):545-52.
doi: [10.1172/JCI60433](https://doi.org/10.1172/JCI60433)

Ottaviani E.; Malagoli D. & Franceschi C. (2011) "The evolution of the adipose tissue: a neglected enigma." *General and Comparative Endocrinology*;174(1):1-4.
doi: [10.1016/j.ygcen.2011.06.018](https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2011.06.018)

P

Patkar P.P. et al. (2019) "Unlike calorie restriction, Roux-en-Y gastric bypass surgery does not increase hypothalamic AgRP and NPY in mice on a high-fat diet." *International Journal of Obesity (London)*; 43(11):2143-2150.
doi: [10.1038/s41366-019-0328-x](https://doi.org/10.1038/s41366-019-0328-x)

Pereira R.O. et al. (2021) "OPA1 deletion in brown adipose tissue improves thermoregulation and systemic metabolism via FGF21." *Elife*;10:e66519.
doi: [10.7554/eLife.66519](https://doi.org/10.7554/eLife.66519)

Pérez-Campos Mayoral L. et al. (2020) "Obesity subtypes, related biomarkers & heterogeneity." *The Indian Journal of Medical Research*;151(1):11-21.
doi: [10.4103/ijmr.IJMR_1768_17](https://doi.org/10.4103/ijmr.IJMR_1768_17)

Phelan S.M. et al. (2015) "Impact of weight bias and stigma on quality of care and outcomes for patients with obesity." *Obesity Reviews*;16(4):319-26.
doi: [10.1111/obr.12266](https://doi.org/10.1111/obr.12266)

Phillips C.M. & Perry I.J. (2013) "Does inflammation determine metabolic health status in obese and nonobese adults?" *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*;98:E1610-9.
doi: [10.1210/jc.2013-2038](https://doi.org/10.1210/jc.2013-2038)

Piche M.E.; Poirier P.; Lemieux I. & Despres J.P. (2018) "Overview of epidemiology and contribution of obesity and body fat distribution to cardiovascular disease: an update." *Progress in Cardiovascular Disease*; 61:103-113. doi: [10.1016/j.pcad.2018.06.004](https://doi.org/10.1016/j.pcad.2018.06.004)

Pilkington A.C.; Paz H.A. & Wankhade U.D. (2021) "Beige Adipose Tissue Identification

and Marker Specificity-Overview." *Frontiers in Endocrinology (Lausanne)*; 12:599134.
doi: [10.3389/fendo.2021.599134](https://doi.org/10.3389/fendo.2021.599134)

Pisani D.F. et al. (2018) "Mitochondrial fission is associated with UCP1 activity in human brite/beige adipocytes." *Molecular Metabolism*;7:35-44.
doi: [10.1016/j.molmet.2017.11.007](https://doi.org/10.1016/j.molmet.2017.11.007)

Pitha J.; Irie T.; Sklar P.B. & Nye J.S. (1988) "Drug solubilizers to aid pharmacologists: amorphous cyclodextrin derivatives." *Life Sciences*;43(6):493-502. doi: [10.1016/0024-3205\(88\)90150-6](https://doi.org/10.1016/0024-3205(88)90150-6)

Pittenger M.F. et al. (1999) "Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells." *Science*; 284:143-147.
doi: [10.1126/science.284.5411.143](https://doi.org/10.1126/science.284.5411.143)

Popkin B.M. (2012) "The public health implications of fast-food menu labelling." *American Journal of Preventive Medicine*; 43(5):569-70.
doi: [10.1016/j.amepre.2012.08.006](https://doi.org/10.1016/j.amepre.2012.08.006)

Poole A.C. et al. (2010) "The mitochondrial fusion-promoting factor mitofusin is a substrate of the PINK1/parkin pathway." *PLoS One*;5(4):e10054.
doi: [10.1371/journal.pone.0010054](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010054)

Popov L.D. (2020) "Mitochondrial biogenesis: An update." *Journal of Cellular and Molecular Medicine*;24(9):4892-4899.
doi: [10.1111/jcmm.15194](https://doi.org/10.1111/jcmm.15194)

Prentice A.M. (2001) "Fires of life: the struggles of an ancient metabolism in a modern world." *British Nutrition Foundation, Nutrition Bulletin*;26:13-27.
doi: [10.1046/j.1467-3010.2001.00100](https://doi.org/10.1046/j.1467-3010.2001.00100)

R

Racker E. (1976) "A New Look at Mechanisms in Bioenergetics." Academic Press, New York.
<https://shop.elsevier.com/books/a-new-look-at-mechanisms-in-bioenergetics/racker/978-0-12-574670-0>

Rajan S. et al. (2014) "Adipocyte transdifferentiation and its molecular targets." *Differentiation*;87(5):183-92.
doi: [10.1016/j.diff.2014.07.002](https://doi.org/10.1016/j.diff.2014.07.002)

Remington G. (2006) "Schizophrenia, antipsychotics, and the metabolic syndrome: is there a silver lining?" *American Journal of Psychiatry*;163(7):1132-1134.

doi: [10.1176/ajp.2006.163.7.1132](https://doi.org/10.1176/ajp.2006.163.7.1132)

Rikka S. et al. (2011) "Bnip3 impairs mitochondrial bioenergetics and stimulates mitochondrial turnover." *Cell Death and Differentiation*;18(4):721-31.

doi: [10.1038/cdd.2010](https://doi.org/10.1038/cdd.2010)

Romero-Corral A. et al. (2007) "Diagnostic performance of body mass index to detect obesity in patients with coronary artery disease." *European Heart Journal*; 28:2087-2093. doi: [10.1093/eurheartj/ehm243](https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehm243)

Romero-Corral A. et al. (2008) "Accuracy of body mass index in diagnosing obesity in the adult general population" *International Journal of Obesity*; 32(6):959-966.

doi: [10.1038/ijo.2008.11](https://doi.org/10.1038/ijo.2008.11)

Rosen E. & Spiegelman B. (2014) "What we talk about when we talk about fat." *Cell*; 156(1-2):20-44.

doi: [10.1016/j.cell.2013.12.012](https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.12.012)

Ruderman N.B.; Schneider S.H. & Berchtold P. (1981) "The "metabolically-obese" normal-weight individual." *The American Journal of Clinical Nutrition*; 34(8):1617-1621.

doi: [10.1093/ajcn/34.8.1617](https://doi.org/10.1093/ajcn/34.8.1617)

S

Sakers A.; De Siqueira M.K.; Seale P. & Villanueva C.J. (2022) "Adipose-tissue plasticity in health and disease." *Cell*;185(3):419-446.

doi: [10.1016/j.cell.2021.12.016](https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.12.016)

Saklayen M.G. (2018) "The global epidemic of the metabolic syndrome." *Current Hypertension Reports*; 20(2):12.

doi: [10.1007/s11906-018-0812-z](https://doi.org/10.1007/s11906-018-0812-z)

Schwandt P.; Bertsch T. & Haas G.M. (2010) "Anthropometric screening for silent cardiovascular risk factors in adolescents: The PEP Family Heart Study." *Atherosclerosis*;211:667-671.

doi: [10.1016/j.atherosclerosis.2010.03.032](https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2010.03.032)

Seale P. et al. (2008) "PRDM16 controls a brown fat/skeletal muscle switch." *Nature*; 454, 961-967. doi: [10.1038/nature07182](https://doi.org/10.1038/nature07182)

Shabalina I.G. et al. (2004) "Native UCP1 displays simple competitive kinetics between the regulators purine nucleotides and fatty acids." *Journal of Biological Chemistry*; 279(37):38236-38248.

doi: [10.1074/jbc.M402375200](https://doi.org/10.1074/jbc.M402375200)

Shabalina I.G.; Kramarova T.V.; Nedergaard J. & Cannon B. (2006) "Carboxyatractyloside effects on brown-fat mitochondria imply that the adenine nucleotide translocator isoforms ANT1 and ANT2 may be responsible for basal and fatty-acid-induced uncoupling respectively." *The Biochemical Journal*; 399(3):405-14. doi: [10.1042/BJ20060706](https://doi.org/10.1042/BJ20060706)

Shabalina I.G. et al. (2013) "UCP1 in brite/beige adipose tissue mitochondria is functionally thermogenic." *Cell Reports*;5(5):1196-203.

doi: [10.1016/j.celrep.2013.10.044](https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.10.044)

Shao M. et al. (2019) "Cellular Origins of Beige Fat Cells Revisited." *Diabetes*;68(10):1874-1885. doi: [10.2337/db19-0308](https://doi.org/10.2337/db19-0308)

Shoelson S.E.; Lee J. & Goldfine A.B. (2006) "Inflammation and insulin resistance." *Journal of Clinical Investigation*; 116:1793-1801. doi: [10.1172/JCI29069](https://doi.org/10.1172/JCI29069)

Singh R.; Barrios A.; Dirakvand G. & Pervin S. (2021) "Human Brown Adipose Tissue and Metabolic Health: Potential for Therapeutic Avenues." *Cells*; 10(11):3030.

doi: [10.3390/cells10113030](https://doi.org/10.3390/cells10113030)

Smalley K.J. et al. (1990) "Reassessment of body mass indices." *The American Journal of Clinical Nutrition*; 52:405-408.

doi: [10.1093/ajcn/52.3.405](https://doi.org/10.1093/ajcn/52.3.405)

Smith S.M.; Meyer M. & Trinkley KE. (2013) "Phentermine/topiramate for the treatment of obesity." *Annals of Pharmacotherapies*; 47(3):340-9. doi: [10.1345/aph.1R501](https://doi.org/10.1345/aph.1R501)

Soubannier V. et al. (2012) "A vesicular transport pathway shuttles cargo from mitochondria to lysosomes." *Current Biology*; 22(2):135-41. doi: [10.1016/j.cub.2011.11.057](https://doi.org/10.1016/j.cub.2011.11.057)

Spalding K.L. et al. (2008) "Dynamics of fat cell turnover in humans." *Nature*; 453:783-787. doi: [10.1038/nature06902](https://doi.org/10.1038/nature06902)

Spielgeman B.M. & Flier J.S. (2001) "Obesity and the regulation of energy balance." *Cell*; 23;104(4):531-43. doi: [10.1016/s0092-8674\(01\)00240-9](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(01)00240-9)

Steiner B.M. & Berry D.C. (2022) "The Regulation of Adipose Tissue Health by Estrogens." *Frontiers in Endocrinology (Lausanne)*;13:889923. doi: [10.3389/fendo.2022.889923](https://doi.org/10.3389/fendo.2022.889923)

Steppan C.M. et al. (2001) "The hormone resistin links obesity to diabetes." *Nature*; 409(6818):307-12. doi: [10.1038/35053000](https://doi.org/10.1038/35053000)

Sun K.; Tordjman J.; Clément K. & Scherer P.E. (2013) "Fibrosis and adipose tissue dysfunction." *Cell Metabolism*; 18:470-477. doi: [10.1016/j.cmet.2013.06.016](https://doi.org/10.1016/j.cmet.2013.06.016)

T

Tainter M.L.; Cutting W.C. & Stockton A.B. (1934) "Use of Dinitrophenol in Nutritional Disorders: A Critical Survey of Clinical Results." *American Journal of Public Health and the Nations' Health*; 24(10):1045-53. doi: [10.2105/ajph.24.10.1045](https://doi.org/10.2105/ajph.24.10.1045)

Takada I.; Kouzmenko A.P. & Kato S. (2009) "Wnt and PPARgamma signaling in osteoblastogenesis and adipogenesis." *Nature Reviews in Rheumatology*; 5(8):442-7. doi: [10.1038/nrrheum.2009.137](https://doi.org/10.1038/nrrheum.2009.137)

Timmons J.A. et al. (2007) "Myogenic gene expression signature establishes that brown and white adipocytes originate from distinct cell lineages." *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*;104(11):4401-6. doi: [10.1073/pnas.0610615104](https://doi.org/10.1073/pnas.0610615104)

Twig G. et al. (2008) "Fission and selective fusion govern mitochondrial segregation and elimination by autophagy." *EMBO Journals*; 27(2):433-46. doi: [10.1038/sj.emboj.7601963](https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601963)

Turer A.T. & Scherer P.E. (2012) "Adiponectin: mechanistic insights and clinical implications." *Diabetologia*; 55(9):2319-26. doi: [10.1007/s00125-012-2598-x](https://doi.org/10.1007/s00125-012-2598-x)

U

Udenfriend S. et al. (1972) "Fluorescamine: a reagent for assay of amino acids, peptides, proteins, and primary amines in the picomole range." *Science*; 178(4063):871-2. doi: [10.1126/science](https://doi.org/10.1126/science)

Ukropec J. et al. (2006) "UCP1-independent thermogenesis in white adipose tissue of cold-acclimated Ucp1^{-/-} mice." *Journal of Biological Chemistry*; 281(42):31894-908. doi: [10.1074/jbc.M606114200](https://doi.org/10.1074/jbc.M606114200)

V

Viana-Huete V. et al. (2016) "Essential Role of IGFIR in the Onset of Male Brown Fat Thermogenic Function: Regulation of Glucose Homeostasis by Differential Organ-Specific Insulin Sensitivity." *Endocrinology*; 157(4):1495-511. doi: [10.1210/en.2015-1623](https://doi.org/10.1210/en.2015-1623)

Viana-Huete V. et al. (2018) "Male Brown Fat-Specific Double Knock Out of IGFIR/IR: Atrophy, Mitochondrial Fission Failure, Impaired Thermogenesis, and Obesity." *Endocrinology*;159(1):323-340. doi: [10.1210/en.2017-00738](https://doi.org/10.1210/en.2017-00738)

Villarroya F.; Cereijo R.; Villarroya J. & Giralt M. (2017) "Brown adipose tissue as a secretory organ." *Nature Reviews: Endocrinology*;13(1):26-35. doi: [10.1038/nrendo.2016.136](https://doi.org/10.1038/nrendo.2016.136)

W

Wang B.; Wood I.S. & Trayhurn P. (2007) "Dysregulation of the expression and secretion of inflammation-related adipokines by hypoxia in human adipocytes." *Pflügers Archiv*; 455(3):479-92. doi: [10.1007/s00424-007-0301-8](https://doi.org/10.1007/s00424-007-0301-8)

Wang Q.A.; Tao C.; Gupta R.K. & Scherer P.E. (2013) "Tracking adipogenesis during white adipose tissue development, expansion and regeneration." *Nature Medicine*; 19(10):1338-44. doi: [10.1038/nm.3324](https://doi.org/10.1038/nm.3324)

Weisberg S.P. et al. (2003) "Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue." *Journal of Clinical Investigation*;112:1796-1808. doi: [10.1172/JCI19246](https://doi.org/10.1172/JCI19246)

Wildman R.P. et al. (2008) “The obese without cardiometabolic risk factor clustering and the normal weight with cardiometabolic risk factor clustering: prevalence and correlates of 2 phenotypes among the US population (NHANES 1999-2004).” *Archives of Internal Medicine*; 168:1617–1624. doi: [10.1001/archinte.168.15.1617](https://doi.org/10.1001/archinte.168.15.1617)

Wilms B. et al. (2018) “Resting energy expenditure after Roux-en Y gastric bypass surgery.” *Surgery for Obesity and Related Diseases*;14(2):191-199. doi: [10.1016/j.soard.2017.10.014](https://doi.org/10.1016/j.soard.2017.10.014)

Wikstrom J.D. et al. (2007) “ β -cell mitochondria exhibit membrane potential heterogeneity that can be altered by stimulatory or toxic fuel levels.” *Diabetes*;56(10):2569-78. doi: [10.2337/db06-0757](https://doi.org/10.2337/db06-0757)

Wikstrom J.D. et al. (2014) “Hormone-induced mitochondrial fission is utilized by brown adipocytes as an amplification pathway for energy expenditure.” *EMBO Journal*; 33(5):418-36. doi: [10.1002/embj.201385014](https://doi.org/10.1002/embj.201385014)

Wong Y.C.; Ysselstein D. & Krainc D. (2018) “Mitochondria-lysosome contacts regulate mitochondrial fission via RAB7 GTP hydrolysis.” *Nature*; 554(7692):382-386. doi: [10.1038/nature25486](https://doi.org/10.1038/nature25486)

Wu J. et al. (2012) “Beige adipocytes are a distinct type of thermogenic fat cell in mouse and human.” *Cell*; 150(2):366-76. doi: [10.1016/j.cell.2012.05.016](https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.05.016)

Y

Yancy W.S. Jr. et al. (2015) “Effect of Allowing Choice of Diet on Weight Loss: A Randomized Trial.” *Annals of Internal Medicine*; 162(12):805-14. doi: [10.7326/M14-2358](https://doi.org/10.7326/M14-2358)

Yang Q. et al. (2005) “Serum retinol binding protein 4 contributes to insulin resistance in obesity and type 2 diabetes.” *Nature*; 436(7049):356-62. doi: [10.1038/nature03711](https://doi.org/10.1038/nature03711)

Yapa N.M.B; Lisnyak V.; Reljic B. & Ryan MT. (2021) “Mitochondrial dynamics in health and disease.” *FEBS Letters*; 595(8):1184-1204. doi: [10.1002/1873-3468.14077](https://doi.org/10.1002/1873-3468.14077)

Yen M. & Ewald M.B. (2012) “Toxicity of weight loss agents.” *Journal of Medical Toxicology*;8(2):145-52. doi: [10.1007/s13181-012-0213-7](https://doi.org/10.1007/s13181-012-0213-7)

Z

Zhang F. et al. (2018) “An Adipose Tissue Atlas: An Image-Guided Identification of Human-like BAT and Beige Depots in Rodents.” *Cell Metabolism*;27(1):252-262.e3. doi: [10.1016/j.cmet.2017.12.004](https://doi.org/10.1016/j.cmet.2017.12.004)

Zhang H. et al. (2008) “Mitochondrial autophagy is an HIF-1-dependent adaptive metabolic response to hypoxia.” *Journal of Biological Chemistry*; 283(16):10892-903. doi: [10.1074/jbc.M800102200](https://doi.org/10.1074/jbc.M800102200)

Zhang H. et al. (2021) “Exercise training-induced visceral fat loss in obese women: The role of training intensity and modality.” *Scandinavian Journal of Medicine and Science in Sports*; 31(1):30-43. doi: [10.1111/sms.13803](https://doi.org/10.1111/sms.13803)

Zhang X.; Ha S.; Lau HC. & Yu J. (2023) “Excess body weight: Novel insights into its roles in obesity comorbidities.” *Seminars in Cancer Biology*;92:16-27. doi: [10.1016/j.semcancer.2023.03.008](https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2023.03.008)

Zhou Y.; Chi J.; Lv W. & Wang Y. (2021) “Obesity and diabetes as high-risk factors for severe coronavirus disease 2019 (Covid-19).” *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*; 37(2):e3377. doi: [10.1002/dmrr.3377](https://doi.org/10.1002/dmrr.3377)

Ziolkowski W. et al. (2010) “Methyl-beta-cyclodextrin induces mitochondrial cholesterol depletion and alters the mitochondrial structure and bioenergetics.” *FEBS Letters*; 584(22):4606-10. doi: [10.1016/j.febslet.2010.10.023](https://doi.org/10.1016/j.febslet.2010.10.023)

Zwick R.K.; Guerrero-Juarez C.F.; Horsley V. & Plikus M.V. (2018) “Anatomical, Physiological, and Functional Diversity of Adipose Tissue.” *Cell Metabolism*; 27(1):68-83. doi: [10.1016/j.cmet.2017](https://doi.org/10.1016/j.cmet.2017)