

# Papel del IGF-I/Ras en la diferenciación de los adipocitos marrones fetales: un nuevo mecanismo termogénico

Role of IGF-I/Ras in Foetal Brown Adipocytes Differentiation: a novel thermogenic mechanism

LORENZO, M.; VALVERDE, A. M.; TERUEL, T.; NAVARRO, P. y BENITO, M.  
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular II. Centro Mixto C.S.I.C. U.C.M.  
Facultad de Farmacia. Universidad Complutense. 28040 Madrid. Tel: 34-1-3941858. FAX:  
34-1-3941779 E-mail:mlorenzo@eucmax.sim.ucm.es

## RESUMEN

Los adipocitos marrones fetales de rata son un modelo de células mesenquimales no fibroblásticas que presentan un alto número de receptores de alta afinidad para el IGF-I. Estas células responden a IGF-I aumentando la proliferación celular, al mismo tiempo que se diferencian adipogénicamente (lo que conduce a un fenotipo de gotas de grasa multiloculares) y termogénicamente (asociada a la expresión de la proteína desacoplante). Además, hemos detectado la expresión endógena de IGF-I en estas células, lo que sugiere que el IGF-I puede ser una de las señales fisiológicas que están impulsando el desarrollo del tejido adiposo marrón *in vivo* durante los últimos días de vida fetal. En este sentido, el IGF-I aumenta la tasa de transcripción del gen de la UP y produce la acumulación de su mensajero, aumentando también la vida media del mismo. Esto conduce a un gran aumento en los niveles de proteína desacoplante detectables inmunológicamente. Igualmente, transfecciones transitorias de los adipocitos marrones fetales con el promotor completo del gen de la UP dirigiendo la expresión del gen bacteriano CAT demuestran que el IGF-I transactiva el promotor de la UP. Asimismo, el promotor de la UP se transactiva en ausencia de IGF-I cuando se cotransfectan las células con construcciones de Ras transformante, mientras que la cotransfección de Ras dominante negativo en presencia de IGF-I anula el efecto transactivador del IGF-I sobre el promotor de la UP. Estos resultados proponen un nuevo mecanismo termogénico mediado por IGF-I/ras en los adipocitos marrones fetales de rata.

**Palabras clave:** IGF-I. Diferenciación. Adipocitos marrones fetales.

## ABSTRACT

Foetal brown adipocyte primary cultures undergo proliferation in the presence of IGF-I and also induce the adipogenic-program related to lipid synthesis and the thermogenic-program associated with the expression of the uncoupling protein. Moreover, we have recently described an endogenous expression of IGF-I mRNA in brown adipose tissue

at day 20 of foetal development and also an increase in the IGF-I receptor mRNA content at the end of the foetal life, which runs parallel to the onset of late tissue differentiation. Thus, IGF-I, in an autocrine/paracrine fashion may be a major signal involved in brown adipose tissue development prior to birth.

**Key words:** IGF-I. Differentiation. Foetal brown adipocytes.

Recibido: 28-11-96.

Aceptado: 18-12-96.

BIBLID [0004-2927(1996) 37:4; 753-760]

## INTRODUCCIÓN

En mamíferos existen dos tipos de tejido adiposo con funciones diferentes: el tejido adiposo blanco, que es el reservorio energético de la célula, y el tejido adiposo marrón (TAM), cuya función principal es la producción de calor mediante el mecanismo de termogénesis sin tiriteo. El TAM está constituido mayoritariamente por adipocitos marrones, células que presentan un elevado número de depósitos lipídicos multiloculares, así como gran cantidad de mitocondrias, en cuya membrana interna se encuentra la proteína desacoplante (UP), una proteína específica de estas células capaz de producir el desacoplamiento de la fosforilación oxidativa, liberándose la energía procedente del gradiente electroquímico de protones en forma de calor, en lugar de sintetizarse ATP (1).

El TAM no está permanentemente activado, y de hecho se activa vía sistema nervioso simpático en determinadas situaciones fisiológicas, tales como durante el período perinatal, por exposición y adaptación al frío, en el despertar de los animales hibernantes y por adaptación a dietas hipercalóricas. Debido a su capacidad para desacoplar la respiración mitocondrial, el TAM juega un papel importante en el balance energético, disipando en forma de calor el exceso de energía en caso de sobrealimentación. Esto ha conducido a especulaciones sobre un posible papel de este tejido previniendo la obesidad. De hecho, recientemente se han obtenido ratones transgénicos con pérdida del TAM que han desarrollado obesidad.

La diferenciación del TAM en la mayoría de las especies se produce durante la etapa fetal de modo que el tejido es identificable en el momento del nacimiento, permitiendo al recién nacido compensar las pérdidas de calor que sufre al abandonar el seno materno (1). Aunque no se conoce con exactitud la naturaleza de las hormonas circulantes y/o los factores paracrinós/autocrinós que están implicadas en el desarrollo fetal del TAM, en nuestro laboratorio hemos propuesto al factor de crecimiento similar a la insulina (IGF-I) y a la insulina (2,3), al factor de crecimiento transformante tipo b (TGF-b1) (4) y a las hormonas tiroideas (5), como señales de diferenciación

para estas células, además del ya conocido papel de la noradrenalina en este sistema (6,7). Algunas de estas señales de diferenciación, concretamente el IGF-I y el TGF- $\beta$ 1, han resultado ser también importantes señales de proliferación para los adipocitos marrones durante la etapa fetal (8-11). En este artículo nos vamos a centrar en los efectos del IGF-I sobre la diferenciación de los adipocitos marrones fetales de rata, describiendo tanto resultados *in vivo* sobre el TAM como efectos sobre células en cultivo primario. Finalmente, se han generado líneas celulares adipocíticas inmortalizadas y transformadas (por transfección con SV40-TAg solo o cotransfectado con la proteína ras transformante) a partir de adipocitos marrones fetales, que mantienen un fenotipo diferenciado (12). En dichas líneas estudiaremos también el papel del IGF-I, y de la proteína ras implicada en la ruta de señalización intracelular del IGF-I (13,14), en relación con su diferenciación adipogénica y termogénica.

*La diferenciación del tejido adiposo marrón se produce en los últimos días del desarrollo fetal: Papel del IGF-I*

Los adipocitos marrones aislados a partir de fetos de 20-22 días (que coincide aproximadamente con el último trimestre de gestación en humanos) se diferencian al final del período fetal en base a dos programas: adipogénesis y termogénesis. Las células de 22 días, caracterizadas mediante la técnica de citometría de flujo, muestran un mayor tamaño, más contenido en mitocondrias y mayor cantidad de lípidos en su citosol, en comparación con las células de 20 días de desarrollo fetal. Paralelamente a estos cambios que indican un aumento en la complejidad celular y un proceso de diferenciación, observamos que la capacidad proliferativa de estas células disminuye entre los días 20 y 22 del desarrollo fetal, siendo pues necesaria la quiescencia celular para que se produzca la diferenciación (3).

La expresión de genes adipogénicos (estudiada a nivel de acumulación de mRNAs por Northern-blot) ocurre en varias etapas: la ácido graso sintasa (FAS) y la glicerol-3P-deshidrogenasa (G3PD), enzimas clave para la lipogénesis y la esterificación, son las de inducción más temprana, aunque su expresión aumenta a lo largo del desarrollo fetal. Las enzimas generadoras de poder reductor (NADPH), la enzima málica (ME) y la glucosa-6P-deshidrogenasa (G6PD), aumentan fuertemente su expresión en el último día de desarrollo fetal, al igual que el transportador de glucosa GLUT4. La inducción de estos genes adipogénicos a nivel de su mRNA se correlaciona perfectamente con el aumento en sus actividades enzimáticas y en el flujo lipogénico determinado *in vivo*, lo que da lugar a una acumulación de lípidos en depósitos multiloculares que producen un fenotipo característico del adipocito marrón, visible al microscopio (3).

Paralelamente a la diferenciación adipogénica, los adipocitos marrones inducen la UP, un gen específico del TAM, responsable de la diferenciación termogénica. El mRNA de la UP se acumula gradualmente durante los últimos días del desarrollo fetal, siendo posible el final de este período la localización de la proteína desacoplante por inmunofluorescencia. Sin embargo, estos procesos de diferenciación no son terminales, pues genes marcadores de diferenciación terminal como la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (PEPCK), una enzima glicерогénica en tejido adiposo, no se expresa todavía en el TAM a término.

La expresión inicial de estos genes de diferenciación tiene que depender forzosamente de factores de transcripción que se asocien en este momento del desarrollo para poner en marcha la transcripción de los mismos. Entre las familias de factores de transcripción descritas, los C/EBPs se han relacionado tanto con adipogénesis como con termogénesis. El estudio de la expresión de C/EBPs al nivel de mRNA demuestra que las tres isoformas a-b-d están presentes en el día 20 del desarrollo fetal en el TAM, disminuyendo la expresión del a y aumentando la del b-d entre los días 20-22, cuando se produce la diferenciación del TAM (3).

La identificación en el TAM de la expresión constitutiva de IGF-I al final del desarrollo fetal, y el aumento en la expresión de receptores específicos para IGF-I entre los días 20 y 22 del desarrollo fetal, nos ha llevado a proponer al IGF-I como un señal autocrina o paracrina que puede estar implicada en la diferenciación del TAM antes del nacimiento, cuando señales bien caracterizadas como la noradrenalina todavía no son operativas. Este papel del IGF-I sobre la diferenciación de los adipocitos marrones ha quedado claramente confirmado con los experimentos en cultivo que se describen a continuación.

*El IGF-I y también la insulina inducen la diferenciación adipogénica y termogénica de los adipocitos marrones fetales en cultivo.*

Los adipocitos de 20 días de gestación pueden ser aislados y cultivados en ausencia de suero durante varios días, conforme a los protocolos descritos en nuestro laboratorio (10), lo que nos permite estudiar el efecto de señales exógenas añadidas al cultivo sobre distintos parámetros. Cuando nos planteamos estudiar *in vitro* el efecto de IGF-I sobre la diferenciación de los adipocitos marrones, decidimos llevar un control positivo de diferenciación adipocítica como es la insulina (2), y asimismo un control positivo de diferenciación termogénica, la noradrenalina. Aunque hemos descrito anteriormente que el TAM es un tejido diana para el IGF-I ya que expresa sus receptores a nivel de mRNA, los estudios cinéticos de unión específica a sus receptores de 125I-



IGF-I y de 125I-insulina nos desvelaron que el IGF-I tiene más receptores/célula (190.000) y con mejor afinidad (Kd 4 nM) que la insulina (40.000 sitios/célula y Kd 18 nM)(15).

Los estudios de expresión génica han demostrado que los adipocitos marrones en cultivo en ausencia de factores exógenos durante 48 h tienden a perder la expresión constitutiva de genes adipogénicos (FAS, G3PD, GLUT4) y termogénicos (UP), aunque el propio cultivo induce la expresión de otros genes como b-actina (un marcador de citoesqueleto) o la PEPCK. Sin embargo, la presencia tanto de IGF-I como de insulina induce la expresión en función del tiempo de los marcadores adipogénicos FAS, G3PD y GLUT4, produciéndose la acumulación de sus mRNAs como consecuencia del aumento en su tasa de transcripción (valorada por ensayos de transcripción *in vitro*). En consecuencia, el IGF-I y también la insulina aumentan el transporte de glucosa así como el contenido de lípidos citoplasmáticos, lo cual pone de manifiesto el papel regulador del IGF-I sobre la diferenciación adipocítica de los adipocitos marrones (15). Sin embargo, genes como la PEPCK, cuya expresión se había inducido espontáneamente en cultivo, se reprimen fuertemente por IGF-I e insulina, tal y como se ha descrito en otros tejidos (16).

En cuanto a la diferenciación termogénica, el IGF-I y la insulina se muestran tan potentes como la noradrenalina en el aumento de la tasa de transcripción del gen de la UP en 1 h, y producen una acumulación del mRNA de la UP en función del tiempo. Además, IGF-I/insulina estabilizan el mensajero de la UP, con una vida media tres veces superior a la que presenta el mensajero endógeno, lo que parece sugerir que debe existir un elemento de respuesta del tipo IRE en el promotor de la UP. En este sentido, hemos realizando experimentos de transactivación del promotor de la UP por IGF-I/insulina transfectando transitoriamente los adipocitos marrones con construcciones del promotor completo de la UP de rata dirigiendo la expresión del gen bacteriano cloranfenicol acetiltransferasa (CAT). En estos experimentos IGF-I/insulina producen la transactivación de la construcción UP-CAT al mismo nivel que la noradrenalina, siendo estos efectos específicos del tejido adiposo marrón, ya que no son reproducibles en otros sistemas celulares como los fibroblastos Rat-1. Aunque se han descrito elementos de respuesta a cAMP, triiodotironina y ácido retinoico en el promotor de la UP (5,6,7,17), este trabajo propone por vez primera la existencia de elementos de respuesta a IGF-I/insulina en el promotor de este gen. Además, el tratamiento con IGF-I/insulina no solo produce acumulación del mRNA de la UP sino que conduce a un aumento en el contenido de la proteína desacoplante sintetizada de novo, determinado por análisis Western blot con anticuerpos específicos. En consecuencia, el IGF-I induce la diferenciación adipogénica y termogénica de adipocitos marrones *in vitro*.

*Papel del IGF-I en la diferenciación de líneas celulares inmortalizadas y transformadas de adipocitos marrones.*

La transfección permanente de los adipocitos fetales de rata con construcciones que contienen la proteína grande del antígeno T del virus SV40 (SV40-TAg) sola o en combinación con el gen para la proteína p21-ras activa (pMexneo-Hraslys12) da lugar a líneas celulares que tienen fenotipo inmortalizado o transformado, y que mantienen un fenotipo diferenciado puesto que conservan la expresión de la UP (12). En dichas líneas hemos estudiado también el papel del IGF-I en relación con su diferenciación adipogénica y termogénica (18).

Las líneas celulares inmortalizadas responden al IGF-I al igual que lo hacen las células fetales primarias de las que proceden, induciendo la expresión del mRNA de la FAS y de la UP, así como el contenido de lípidos citosólicos. Estos efectos producidos por el IGF-I tanto en líneas inmortalizadas como en células primarias están mediados por un aumento en el contenido de la proteína p21-ras (detectada por análisis Western blot) así como en su porcentaje en forma activa, ras.GTP. Sin embargo, las líneas adipocíticas transformadas (sobrexpresando ras en su forma activa) están constitutivamente muy diferenciadas, demostrando una expresión de FAS y UP muy superior a las líneas inmortalizadas y a las células primarias, y un alto contenido lipídico (18). Estas células transformadas son independientes de IGF-I en relación a todos los parámetros estudiados. Todos estos resultados apuntaban hacia una relación entre el contenido de proteína p21-ras activa y el grado de diferenciación de las células. En este sentido, utilizamos una aproximación experimental para buscar la evidencia directa entre p21-ras y la expresión de FAS y UP, que fue la transfección de adipocitos fetales primarios con ras transformante (H-raslys12), o con ras dominante/negativo (H-rasasn17) en presencia de IGF-I. La expresión de ras activo produjo un aumento de tres veces en la acumulación de UP y FAS mRNAs, niveles un poco inferiores a los inducidos directamente por IGF-I (5 veces), debido posiblemente a que la transfección solo afecta al 10% de las células. La expresión de ras dominante negativo produjo un 15% de inhibición sobre la inducción de FAS y UP mRNAs producida por el IGF-I. También se han realizado contranfecciones de ras activo o dominante negativo con la construcción completa del promotor UP (UP-CAT). En este tipo de ensayo, ras activo aumentó 6 veces la actividad UP-CAT, por encima de los efectos producidos por el IGF-I (4 veces), mientras que el efecto del IGF-I se vio inhibido en un 50% por la cotransfección con la construcción de ras en su forma dominante negativa (18). Estos resultados claramente indican que IGF-I, a través de ras, transactiva el promotor de la proteína desacoplante, y sugieren un nuevo mecanismo termogénico en adipocitos marrones antes del nacimiento inducido por IGF-I/insulina y mediado por ras, distinto del noradrenérgico.

En conclusión, hemos desarrollado en nuestro laboratorio un modelo de células mesenquimales no fibroblásticas, los adipocitos marrones fetales de rata, que responden al IGF-I aumentando la proliferación celular, al mismo tiempo que se diferencian adipogénica y termogénicamente en respuesta a dicha señal. Además, el IGF-I puede ser una importante señal fisiológica (de tipo autocrino) que de cuenta del desarrollo fetal del TAM *in vivo*. En consecuencia, proponemos un nuevo mecanismo termogénico inducido por IGF-I y mediado por ras que podría ser operativo al final del desarrollo fetal en el TAM.

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se ha realizado con la financiación de los proyectos SAF93/0206 y SAF96/0115 de la CICYT (España). Teresa Teruel ha disfrutado de una beca de la Comunidad Autónoma de Madrid y Paloma Navarro es becaria del Ministerio de Educación y Ciencia.

## BIBLIOGRAFÍA

- (1) AILHAUD, G., GRIMALDI, P., NEGREL, R.: *Annu Rev Nutr* (1992), **12**: 207-233.
- (2) VALVERDE, A. M., BENITO, M., LORENZO, M.: *Eur J Biochem* (1992), **203**: 313-319.
- (3) TERUEL, T., VALVERDE, A. M., ÁLVAREZ, A., BENITO, M., LORENZO, M.: *Biochem J* (1995), **310**: 771-776.
- (4) TERUEL, T., VALVERDE, A. M., BENITO, M., LORENZO, M.: *FEBS Lett* (1995), **364**: 193-197.
- (5) GUERRA, C., RONCERO, C., PORRAS, A., FERNÁNDEZ, M., BENITO, M.: *J Biol Chem* (1996), **271**: 2076-2081.
- (6) CASSARD-DOULCIER, A-M, GELLY, C., FOX, N., SCHREMENTI, J., RAIMBAULT, S., KLAUS, S., FOREST, C., BOUILLAUD, F., RICQUIER, D.: *Mol Endocrinol* (1993), **7**: 497-506.
- (7) KOZAK, U. C., KOPECKY, J., TEISINGER, J., ENERBACK, S., BOYER, B., KOZAK, L. P.: *Mol Cell Biol* (1994), **14**: 59-67.
- (8) VALVERDE, A. M., BENITO, M., LORENZO, M.: *Exp Cell Res* (1991), **194**: 232-237.
- (9) VALVERDE, A. M., LORENZO, M., TERUEL, T., BENITO, M.: *Exp Cell Res* (1995), **218**: 305-309.
- (10) LORENZO, M., VALVERDE, A. M., TERUEL, T., BENITO, M.: *J Cell Biol* (1993), **123**: 1567-1575.
- (11) TERUEL, T., VALVERDE, A. M., BENITO, M., LORENZO, M. J.: *Cell Physiol* (1996), **166**: 577-584.
- (12) BENITO, M., PORRAS, A., SANTOS, E.: *Exp Cell Res* (1993), **209**: 248-254.
- (13) VALVERDE, A. M., TERUEL, T., LORENZO, M., BENITO, M.: *Endocrinology* (1996), **137**: 3832-3841.
- (14) BENITO, M., VALVERDE, A. M., LORENZO, M.: *Int J Biochem & Cell Biol* (1996), **28**: 499-510.

- (15) TERUEL, T., VALVERDE, A. M., BENITO, M., LORENZO, M.: *Biochem J* (1996), **319**: 627-632.
- (16) MOLERO, C., VALVERDE, A. M., BENITO, M., LORENZO, M.: *Exp Cell Res* (1992), **200**: 295-300.
- (17) ALVAREZ, R., DE ANDRES, J., YUBERO, P., VIÑAS, O., MAMPEL, T., IGLESIAS, R., GIRALT, M., VILLARROYA, F.: *J Biol Chem* (1995), **270**: 5666-5673.
- (18) LORENZO, M., VALVERDE, A. M., TERUEL, T., ALVAREZ, A., BENITO, M.: *Cell Growth & Differentiation* (1996), **7**: 1251-1259.