

Anal. Real Acad. Farm. 2000, 66:

\_\_\_\_\_ Doctrina \_\_\_\_\_

## **Apoptosis en Adipocitos Marrones: Implicación en Obesidad y Cáncer\***

PALOMA NAVARRO, MANUEL BENITO, MARGARITA LORENZO

*Departamento de Bioquímica y Biología Molecular II, Facultad de  
Farmacia.- Universidad Complutense de Madrid*

### RESUMEN

El mantenimiento de la homeostasis tisular consiste en un complejo balance entre los procesos de proliferación y muerte celular, aunque el balance resulta favorable a la apoptosis durante algunas etapas de la embriogénesis o durante la involución de tejidos adultos. La apoptosis es una muerte celular programada fisiológica que afecta a células individuales y no produce respuesta inflamatoria. Muchas enfermedades están asociadas con la inducción o inhibición de apoptosis, lo que conduce a una pérdida celular (desórdenes neurodegenerativos o daños isquémicos), o a la acumulación celular (cáncer o desórdenes autoinmunes). En nuestro laboratorio hemos desarrollado un modelo de células mesenquimales no fibroblásticas, los adipocitos marrones fetales de rata, que responden al IGF-I/insulina aumentando la proliferación y la diferenciación celular. Nuestros resultados muestran que la ausencia de suero en una línea celular de adipocitos marrones da lugar a la inducción de apoptosis. Hemos visto que la inhibición de caspasas rescata a estas células de apoptosis disminuyendo la expresión de Bcl-x<sub>s</sub> y aumentando la de Bcl-2. La insulina y el IGF-I son factores de supervivencia para estas células a través de una ruta dependiente de PI 3-quinasa/Akt y de MAP-quinasa.

**Palabras clave:** Apoptosis.- Adipocitos.- Caspasas.- Insulina

### SUMMARY

#### **Apoptosis in Brown Adipocytes: Implication in Obesity and Cancer**

---

\* Premio de la Real Academia de Farmacia en el Concurso Científico de 1999.

The maintenance of tissue homeostasis is a complex balance between the rate of cell proliferation and the rate of cell death, although the balance favours apoptosis during some stages of embryogenesis or during the physiological involution of adult tissues. Apoptosis is a physiological programmed cell death that only affect individual cells and did not produce inflammatory response. Many diseases are associated with the induction or inhibition of apoptosis, that leads to cell loss (neurodegenerative disorders or ischemic injury), or cell accumulation disorders (cancer or autoimmune disorders). In our laboratory, we have developed a model of non fibroblastic mesenchymal cell, the foetal brown adipocytes, that respond to IGF-I/insulin increasing cellular proliferation and differentiation. Our results show that serum deprivation in a brown adipocyte cell line induces apoptosis. The inhibition of caspases rescues these cells from apoptosis, decreasing the expression of Bcl-x<sub>s</sub> and increasing Bcl-2 expression. Insulin and IGF-I are survival factors in these cells through a PI 3-kinase/Akt and MAPK-dependent pathway.

**Key words:** Apoptosis.- Adipocytes.- Caspases.- Insulin

## INTRODUCCIÓN

El mantenimiento de la homeostasis tisular consiste en un complejo balance entre los procesos de proliferación y muerte celular, aunque el balance resulta favorable a la apoptosis durante algunas etapas de la embriogénesis o durante la involución de tejidos adultos. La apoptosis es una muerte celular programada fisiológica que se diferencia de la necrosis (muerte patológica) en que solamente afecta a células individuales y no produce respuesta inflamatoria. Muchas enfermedades están asociadas con la inducción o inhibición de apoptosis, lo que conduce a una pérdida celular (desórdenes neurodegenerativos o daños isquémicos), o a la acumulación celular (cáncer o desórdenes autoinmunes). La apoptosis también tiene lugar en condiciones anormales, como son la exposición a radiaciones, a quimioterápicos o algunas toxinas.

La apoptosis está caracterizada por una serie de cambios bioquímicos y morfológicos, que incluyen la aparición de protuberancias en la membrana plasmática, externalización de la fosfatidilserina, ruptura de láminas nucleares y de la poli (ADP-ribosa) polimerasa, condensación de la cromatina y ruptura del ADN y finalmente fragmentación de las

células dando lugar a los cuerpos apoptóticos (1,2). En este sentido, la técnica más representativa para el estudio de la apoptosis es el análisis bioquímico de las “escaleras” de ADN extranuclear: la apoptosis se acompaña con frecuencia de la ruptura del ADN celular en múltiplos de 180 pb, correspondientes al tamaño de los nucleosomas, y es esta escalera de 180 pb lo que se puede observar al realizar una electroforesis del ADN (3). El análisis por citometría de flujo del ADN celular tras la tinción con yoduro de propidio permite el análisis de las fases del ciclo celular así como de los picos hipodiploides, característicos del proceso apoptótico. Otros parámetros, como la detección de la muerte celular *in situ* mediante la técnica del TUNEL, o la exposición de la fosfatidilserina en la superficie celular mediante la unión de Anexina-V también se pueden medir por citometría de flujo (2)

Los mecanismos moleculares que regulan la apoptosis no se conocen completamente. Se ha visto la implicación de dos familias de proteínas: los miembros de la familia de cisteín proteasas relacionadas con la enzima convertidora de interleuquina 1- $\beta$  (también denominadas caspasas), y las proteínas de la familia de Bcl-2. Las **caspasas** son ejecutoras de apoptosis, siendo responsables de la ruptura proteolítica de muchas proteínas clave, como la poli (ADP-ribosa) polimerasa, la actina asociada a la membrana, o las láminas de la envoltura nuclear, lo que precipita los dramáticos cambios morfológicos de la apoptosis (4). Las caspasas actúan jerárquicamente de manera que algunas caspasas rompen tras residuos específicos de aspartato, activando otras caspasas (5). La activación de las caspasas supone un punto principal para el control de la apoptosis. Para estudiar el papel de las caspasas en el proceso apoptótico, se han desarrollado numerosos inhibidores irreversibles como Z-VAD.fmk (6). Este compuesto inhibe los procesos bioquímicos y morfológicos asociados con la apoptosis en varios sistemas celulares. La **familia Bcl-2** está compuesta por una serie de genes que juegan un papel crítico en el control de la integridad mitocondrial. Algunos miembros de la familia como Bax, Bak y Bad son inductores de apoptosis. En cambio, la expresión de otros miembros como Bcl-2 y Ced-9 pueden prevenir la apoptosis. Bcl-x, otro miembro de la familia Bcl-2, durante su procesamiento, da lugar a dos proteínas, Bcl-X<sub>L</sub>, antiapoptótica, y Bcl-X<sub>S</sub>, apoptótica (7). Diversos estudios han sugerido que Bcl-X<sub>L</sub> y Bcl-2 llevan

a cabo su acción antiapoptótica en paralelo o antes del procesamiento de determinadas caspasas a su forma activa, mientras que la expresión ectópica de Bak induce la apoptosis en fibroblastos a través de mecanismos que pueden ser inhibidos por Z-VAD.

La mayoría de las células en los animales superiores necesitan una estimulación trófica continua para sobrevivir, en consecuencia tras la retirada de factores de crecimiento la mayoría de las células mueren por apoptosis, aunque el aporte de factores específicos (principalmente de la familia de receptores tirosina quinasa) previene este proceso. Factores como IGF-I, insulina, EGF, PDGF, NGF tienen vías de señalización que previenen la apoptosis, a través de la fosfatidilinositol (PI) 3-quinasa. Por debajo de la PI 3-quinasa la supervivencia celular parece depender de la serina treonina protein quinasa Akt/PKB, ya que esta enzima fosforila e inactiva Bad, una proteína proapoptótica (8,9). Además la activación de MAP quinasa quinasa (MEK) es necesaria para el rescate de apoptosis por el IGF-I en células PC-12 privadas de suero (10).

En nuestro laboratorio hemos desarrollado un modelo de células mesenquimales no fibroblásticas, los adipocitos marrones fetales de rata, que responden al IGF-I/insulina aumentando la proliferación y la diferenciación celular. El tejido adiposo marrón (BAT) está activo durante el periodo perinatal, tras la exposición al frío, tras los periodos de hibernación o como respuesta a determinadas dietas. Los mecanismos que dan lugar a la desaparición del BAT no se conocen claramente, aunque no se descarta la posibilidad de que se produzca por un proceso de apoptosis. Utilizando líneas celulares derivadas de adipocitos marrones fetales de rata, en el presente trabajo nos propusimos estudiar los mecanismos de inducción de apoptosis, así como los genes implicados y la posible actuación de la insulina/IGF-I como factores de supervivencia.

## RESULTADOS

*1.- EFECTO APOPTÓTICO DE LA RETIRADA DE SUERO EN LOS ADIPOCITOS MARRONES INMORTALIZADOS: IMPLICACIÓN DE LAS CASPASAS*

En nuestro laboratorio, disponíamos de distintas líneas celulares procedentes de adipocitos marrones inmortalizados (11), que se emplearon para profundizar en el estudio de los mecanismos de proliferación y diferenciación del tejido adiposo marrón (12,13,14). Uno de los hechos que pudimos observar, fue que, a pesar de que los adipocitos marrones primarios parecían ser resistentes a la muerte celular tras el cultivo prolongado en ausencia de suero (15,16), al cultivar los adipocitos marrones inmortalizados (células MB 4.9.2) en ausencia del mismo, se despegaban de la placa de cultivo y morían. La detección de determinadas características en estas células, como la presencia de células con contenido en ADN inferior a 2C, o la fragmentación nuclear y del ADN, nos permitió confirmar que se estaba produciendo un proceso de

apoptosis. Un ejemplo de ambas técnicas aparece en las Figuras 1 y 2.

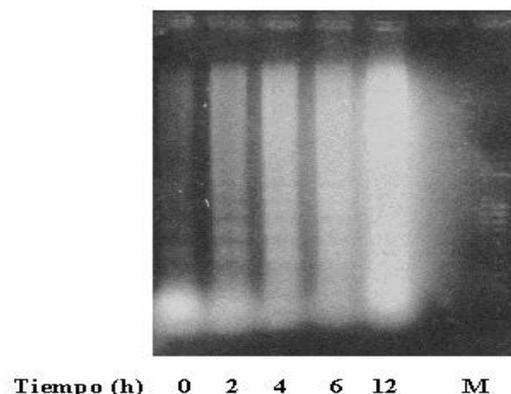


Figura 2.- Fragmentación del ADN de adipocitos marrones inmortalizados en ausencia de suero: Los adipocitos marrones inmortalizados crecieron en presencia de suero, y posteriormente se cultivaron en ausencia del mismo durante distintos tiempos. A continuación se realizó la extracción del ADN extranuclear y se procedió a su análisis electroforético en gel de agarosa. Se muestra un experimento representativo de cuatro realizados. En el último carril se muestra un marcador de peso molecular (M) (escalera de ADN de 100 pb).

Se ha podido observar que en determinados tipos celulares, la ausencia de suero o factores de crecimiento induce la activación de caspasas (17). Este es el caso de las células PC12, en las que la retirada de suero da lugar a un proceso apoptótico en el que se produce la activación de la caspasa-2 (18). Para comprobar la importancia de esta activación en los adipocitos marrones inmortalizados, empleamos un inhibidor irreversible de caspasas, el carbobenzoxi-Val-Ala-Asp-fluorometil cetona (Z-VAD). La disminución en el porcentaje de células hipodiploides o en la fragmentación del ADN tras el tratamiento con Z-VAD, nos indicó que la apoptosis que tenía lugar en las células MB 4.9.2 tras la retirada de suero, estaba mediada por las caspasas. La medida de otros parámetros como la incorporación de nucleótidos marcados al ADN (ensayo TUNEL) o la unión de Anexina-V, corroboró estos resultados.

En un intento de seguir caracterizando la apoptosis que tenía lugar en los adipocitos marrones inmortalizados, decidimos ver si el proceso era dependiente de la síntesis proteica o no. La implicación de la síntesis de

proteínas *de novo*, se ha podido estudiar empleando un inhibidor de dicho proceso, como es la cicloheximida. Nuestros datos demuestran que, en los adipocitos marrones inmortalizados, el desarrollo de apoptosis no está ligado a la síntesis proteica, ya que la cicloheximida fue incapaz de bloquear el proceso.

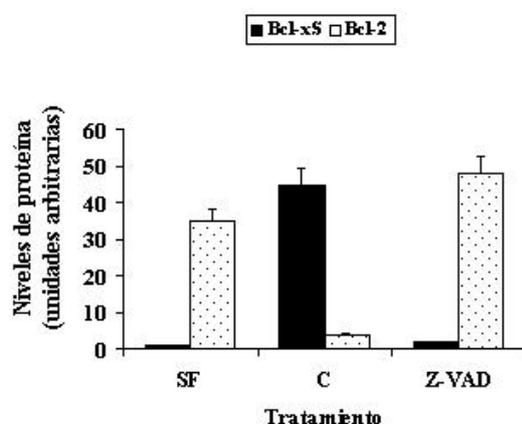


Figura 3.- Niveles de proteínas Bcl-x<sub>S</sub> y Bcl-2: Los histogramas representan los niveles de las proteínas Bcl-x<sub>S</sub> y Bcl-2 en unidades arbitrarias, y son medias  $\pm$  S.E.M. de tres experimentos independientes.

Los numerosos estudios realizados sobre las caspasas, han demostrado que estas son capaces de actuar en diferentes puntos del proceso de muerte celular. Varios autores han propuesto que estas proteasas podrían actuar sobre reguladores negativos de la apoptosis, como por ejemplo determinados miembros de la familia Bcl-2 (19,20). El estudio de la expresión de las proteínas Bcl-2 y Bcl-x en nuestro sistema, mostró la inducción de la proteína Bcl-x<sub>S</sub> (forma pro-apoptótica de Bcl-x) en ausencia de suero y la disminución paralela del contenido de la proteína Bcl-2. Sin embargo, el tratamiento con el inhibidor Z-VAD, provocó el proceso inverso, es decir, se produjo una disminución de Bcl-x<sub>S</sub> y un aumento de Bcl-2. Un ejemplo de la expresión de estas proteínas se puede observar en la Figura 3. La familia Bcl-2 incluye varios genes que juegan un papel fundamental en el control de la integridad mitocondrial. En muchos procesos apoptóticos es característica la

alteración del potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ). En este sentido, nosotros decidimos examinar el  $\Delta\Psi_m$  en nuestras células, en condiciones de crecimiento (presencia de suero) y de apoptosis (ausencia de suero), así como bajo el tratamiento con Z-VAD. El potencial de membrana se midió por la fluorescencia de la Rodamina 123 (rh123). La ausencia de suero dio lugar a una disminución del potencial de un 20% a las 12h y de un 40% a las 24h, indicando que el proceso apoptótico estaba acompañado de una despolarización mitocondrial. Sin embargo el tratamiento con Z-VAD previno totalmente esta pérdida de  $\Delta\Psi_m$ .

## *2.- LA SOBREENPRESIÓN DE H-RAS INDUCE APOPTOSIS EN LOS ADIPOCITOS MARRONES EN AUSENCIA DE SUERO: ASOCIACIÓN DE BCL-2 CON RAS Y RAF-1*

Otra línea celular adipocítica con la que trabajamos en nuestro laboratorio es la denominada MB 1.3.19. Se trata de adipocitos marrones inmortalizados y transformados por transfección con una construcción permanentemente activa de H-Ras (11). Al realizar nuestros primeros experimentos con estas células, pudimos observar, que al igual que en las células MB 4.9.2, la ausencia de suero daba lugar al despegue de las células de la placa de cultivo. Comparando ambas líneas celulares, vimos que los efectos de la ausencia de suero eran más rápidos en las células transformadas que en las inmortalizadas.

Para comprobar si el mayor índice de apoptosis encontrado en las células transformadas (MB 1.3.19) era debido a la sobreexpresión del gen *H-ras* transformado, procedimos a transfectar transitoriamente por el método del  $\text{PO}_4\text{Ca}$ , las células inmortalizadas (MB 4.9.2) con un plásmido que contenía un mutante activo del gen *H-ras* (pMEXneo *H-ras*<sup>lys12</sup>) o con el vector vacío (pMEXneo). Los experimentos de transfecciones transitorias en las células MB 4.9.2, con una construcción activa de H-ras, y el posterior análisis del ciclo celular y de la fragmentación del ADN, demostraron que la sobreexpresión de Ras transformado daba lugar a una apoptosis masiva en los adipocitos marrones en ausencia de suero.

Ya que habíamos visto que la sobreexpresión del gen *ras* transformado inducía apoptosis en adipocitos marrones transfectados tanto permanente como transitoriamente, decidimos bloquear la vía Ras/Raf-1/MEK1/MAP-quinasa para intentar rescatar estas células de la muerte apoptótica. Para ello las células MB 1.3.19 se transfectaron transitoriamente con construcciones dominantes negativas de Ras ( $\Delta$ Ras) y Raf-1 ( $\Delta$ Raf), (pMEXneo-H-ras<sup>asn17</sup> y pMNC-raf<sup>trp375</sup>) o con el vector vacío (pMEXneo). Los resultados obtenidos tras la transfección de un mutante dominante negativo de *ras* ( $\Delta$ Ras) y de *raf* ( $\Delta$ Raf) en las células MB 1.3.19 dio lugar a una disminución de las células hipodiploides, de la fragmentación del ADN.

El siguiente paso fue el bloqueo de la ruta Ras/Raf/MEK/MAP-quinasa utilizando un inhibidor específico de la activación de MEK-1 por Raf-1, el PD098059 (21). Las células MB 1.3.19 fueron incubadas durante 6h en medio libre de suero tanto en ausencia como en presencia de PD098059 30  $\mu$ M, y posteriormente fueron recogidas para determinar las células con contenido en ADN inferior a 2C, así como la existencia de ADN fragmentado por electroforesis. La presencia de PD098059 aumentó significativamente el porcentaje de células hipodiploides con respecto a los adipocitos marrones cultivados simplemente en ausencia de suero. De la misma manera, el tratamiento con el inhibidor dio lugar a un aumento en la fragmentación del ADN, observada al realizar una electroforesis del ADN extranuclear.

Los mecanismos moleculares que regulan la apoptosis no están todavía demasiado claros, aunque se conocen varias proteínas, como los miembros de la familia Bcl-2, que parecen estar implicadas en el control de este proceso. Dentro de esta familia, hay proteínas con actividad anti-apoptótica, y otras que actúan promoviendo la muerte celular. Basándonos en trabajos anteriores en los que se había relacionado a las proteínas Bcl-2 y Bcl-x<sub>L</sub> con Ras y Raf (22,23,24), decidimos estudiar la posible interacción de estas proteínas en nuestro sistema. Nuestros resultados demostraron que, en condiciones no apoptóticas (presencia de suero o de  $\Delta$ Ras o  $\Delta$ Raf), en las células MB 1.3.19, la expresión de la proteína anti-apoptótica Bcl-2 predominaba frente a la expresión de la proteína pro-apoptótica Bcl-x<sub>S</sub>. Sin embargo, en condiciones apoptóticas

(ausencia de suero), los niveles de la proteína Bcl-x<sub>S</sub> aumentaban considerablemente, a la vez que disminuía el contenido en Bcl-2. Además, mediante experimentos de co-inmunoprecipitación demostramos que el Bcl-2 presente en la célula tras la retirada de suero, estaba asociado a Ras y Raf, y que esta asociación se producía a través de una forma de Bcl-2 fosforilada en serina/treonina. Por otra parte, mediante experimentos de inmunoprecipitación, demostramos la triple asociación entre Ras, Raf y Bcl-2, y que además, en ausencia de suero, el Bcl-2 asociado a Ras estaba fosforilado en serina/treonina y posiblemente inactivo.

### *3.- LA INSULINA Y EL IGF-I RESCATAN DE APOPTOSIS A LOS ADIPOCITOS MARRONES INMORTALIZADOS: SEÑALIZACIÓN IMPLICADA*

Para estudiar el posible papel de la insulina/IGF-I como factores de supervivencia en los adipocitos marrones inmortalizados (células MB 4.9.2), procedimos a cultivar las células durante 6h en medio libre de suero en presencia de distintas concentraciones de insulina e IGF-I, para analizar posteriormente la existencia de ADN extranuclear fragmentado. El tratamiento de los adipocitos marrones inmortalizados con insulina e IGF-I, fue capaz de revertir la apoptosis inducida por la ausencia de suero, lo que se comprobó tanto por la disminución del número de células hipodiploides, como por la desaparición de la fragmentación del ADN. Además los dos factores permitieron a las células entrar en el ciclo celular, que había quedado parado en G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> tras la retirada de suero.

En cuanto a la señalización implicada en los efectos anti-apoptóticos de los factores de supervivencia, hay muchos trabajos que indican que el inhibidor de la PI 3-quinasa, wortmanina, bloquea la protección de NGF, PDGF o IGF-I/insulina en células PC-12 privadas de suero. En nuestro laboratorio hemos demostrado recientemente la estimulación de la actividad enzimática de la PI 3-quinasa en adipocitos primarios e inmortalizados tratados con IGF-I e insulina (13,25). Para determinar si el efecto de la insulina y del IGF-I en la inhibición de apoptosis implicaba a la vía de la PI 3-quinasa, utilizamos el inhibidor

específico wortmanina, que se une a la subunidad catalítica p110 de la PI 3-quinasa, inhibiéndola, así como un inhibidor estructuralmente no relacionado, como es el LY294002 (26,27). Ambos inhibidores bloquearon la estimulación de la actividad PI 3-quinasa por la insulina en los adipocitos marrones inmortalizados, a las mismas dosis que se habían observado anteriormente en los adipocitos marrones primarios (32).

El siguiente paso fue comprobar si la wortmanina inhibía la acción de la insulina y del IGF-I en la prevención de la fragmentación del ADN. Se pudo observar que la wortmanina bloqueaba el efecto anti-apoptótico de la insulina de una forma dependiente del tiempo, alcanzando su efecto máximo a la misma concentración que producía la total inhibición de la actividad PI 3-quinasa. A esa misma dosis, la wortmanina también inhibió la acción anti-apoptótica del IGF-I. Además, el otro inhibidor, LY294002 10  $\mu$ M, fue capaz de anular también el rescate de apoptosis de la insulina.

Por otra parte, basándonos en el hecho de que la insulina/IGF-I necesitan la activación de la ruta Ras/Raf/MEK/MAP-quinasa para inducir la proliferación de los adipocitos marrones, y que los factores mencionados rescatan de apoptosis aumentando el número de células en ciclo, estudiamos el papel de la activación de MAP-quinasa en este efecto anti-apoptótico. El bloqueo de la fosforilación de p42/p44 MAP-quinasa, mediante la inhibición de MEK con el inhibidor PD098059, bloqueó el efecto protector de la insulina, aumentando la fragmentación del ADN y el porcentaje de células hipodiploides, y disminuyendo las células en ciclo.

Ya habíamos visto que, en concreto en nuestro sistema, la proteína Bcl<sub>x<sub>S</sub></sub>, estaba estrechamente relacionada a la inducción de apoptosis en ausencia de suero. Considerando este hecho, estudiamos la expresión de Bcl-x<sub>L</sub> y Bcl-x<sub>S</sub> por Western blot en lisados de adipocitos marrones inmortalizados tratados en las mismas condiciones anteriores. Nuestros resultados mostraron que la inhibición de la muerte celular por insulina en los adipocitos marrones inmortalizados, estaba asociada a una disminución en la expresión de Bcl-x<sub>S</sub>, disminución que resultaba anulada por el bloqueo de la PI 3-quinasa y de la MAP-quinasa.

Continuando con la cascada de señalización que conducía a la supervivencia de los adipocitos marrones cultivados en ausencia de suero,

tras la estimulación con insulina, estudiamos el efecto de dos de las dianas de la PI 3-quinasa: la p70S6-quinasa (p70<sup>S6k</sup>), y la proteína quinasa B (PKB/Akt). Nuestros resultados mostraron que, aunque la p70<sup>S6k</sup> resultaba fosforilada, y por tanto activada tras la estimulación con insulina, su inhibición mediante el uso del inhibidor específico rapamicina, no impedía el efecto protector de la insulina. Esto quedó comprobado tanto por el estudio de la fragmentación del ADN, como por el porcentaje de células hipodiploides.

Para estudiar el efecto de la Akt/PKB en nuestro sistema celular, recurrimos a las transfecciones transitorias con construcciones dominantes negativas o activas de Akt. Tras la realización de las transfecciones, llevamos a cabo distintos ensayos que nos permitieron confirmar la implicación de la Akt/PKB en la vía de señalización que conduce a la supervivencia celular. Por una parte, la transfección con la construcción permanentemente activa de Akt (PKB<sup>gag</sup>), produjo efectos similares a los observados en presencia de insulina: disminución del porcentaje de células con contenido en ADN inferior a 2C, y disminución del número de núcleos apoptóticos. Sin embargo, la transfección con la construcción dominante negativa de Akt (PKB-CAAX), bloqueó el rescate inducido por la insulina, de una forma similar a como lo hacía el inhibidor de PI 3-quinasa, LY294002, o la transfección con un dominante negativo de la subunidad reguladora de la PI 3-quinasa,  $\Delta p85$ .

## DISCUSIÓN

El BAT está especializado en la producción de calor por un mecanismo denominado “termogénesis sin tiriteo”. Este tejido está activo durante el periodo perinatal, tras la exposición al frío, tras los periodos de hibernación o como respuesta a determinadas dietas. El desarrollo embrionario del BAT requiere la existencia de un balance entre los procesos de proliferación y apoptosis. No se conoce mucho sobre los reguladores negativos del BAT, y de las señales implicadas en la inactivación o desaparición del tejido. Recientemente se ha visto que el TNF- $\alpha$ , capaz de inhibir la diferenciación del tejido adiposo blanco, tiene un papel importante como regulador negativo del BAT por diferentes

mecanismos. Así, se ha demostrado que el TNF- $\alpha$  induce apoptosis e inhibe el crecimiento celular en adipocitos marrones de rata (16,28).

En el suero hay numerosos factores y citoquinas que permiten la proliferación y la supervivencia de las células, de manera que la supresión del aporte de estas sustancias, puede dar lugar a la muerte celular. La inducción de un proceso apoptótico en células privadas de suero o de factores de crecimiento específicos, se ha comprobado en numerosos sistemas celulares (29,30,31,32). Nuestros datos demostraban que los adipocitos marrones inmortalizados eran sensibles a la retirada de suero, a diferencia de los adipocitos marrones primarios, donde la ausencia de suero era incapaz de inducir el proceso apoptótico. Además, en nuestro caso, la muerte celular programada parecía estar estrechamente relacionada con una parada del ciclo celular. Aunque, en principio, la progresión a través del ciclo celular no es necesaria para la muerte celular programada, la tendencia de las células a morir por apoptosis depende frecuentemente de su estado de diferenciación.

Para estudiar la posible participación de las caspasas en nuestro sistema, decidimos intentar prevenir la apoptosis inducida en ausencia de suero empleando un inhibidor irreversible de caspasas, como es Z-VAD(6). Nuestros datos nos hacen pensar que la inhibición de caspasas es capaz de bloquear determinadas características bioquímicas y morfológicas asociadas con la apoptosis, como son la fragmentación del ADN o la pérdida de la asimetría de la fosfatidilserina, lo que está de acuerdo con los trabajos aparecidos recientemente de McCarthy y col. (1997) (33). Además, los resultados parecen indicar que la activación de caspasas a través de un mecanismo inhibible por Z-VAD, es un suceso temprano en el desarrollo de apoptosis en los adipocitos marrones inmortalizados. Por otra parte, en los adipocitos marrones inmortalizados, la cicloheximida no previene la muerte celular programada, ni la supresión de la actividad proteásica en estas células, lo que parece indicar que todo el proceso es independiente de la síntesis *de novo* de proteínas, y que por tanto la maquinaria apoptótica existe previamente en la célula, posiblemente en un estado de inactivación, a la espera de un estímulo adecuado que fuera capaz de activarla, en este caso, la retirada de suero.

En nuestro sistema celular, se vio claramente, que las caspasas actuaban por encima de proteínas como Bcl-2 y Bcl-x<sub>S</sub>, regulando su expresión, lo que parecía estar de acuerdo con lo expuesto recientemente por Xue y Horvitz (1997) (18). En este trabajo se proponía que las caspasas serían capaces de romper la proteína Bcl-2, dando lugar a fragmentos que a su vez inducirían apoptosis. Recientemente se ha publicado un trabajo en el que se sugiere la existencia de una cisteína proteinasa capaz de romper Bcl-2, lo que podría regular la función de Bcl-2, contribuyendo a la inducción de apoptosis (34). Tanto las proteínas de la familia Bcl-2 como las caspasas, tienen una estrecha relación con la mitocondria (39). Pudimos comprobar, que en los adipocitos marrones inmortalizados, el cultivo en ausencia de suero, daba lugar a una disminución del potencial mitocondrial, disminución que podía evitarse mediante la inhibición de caspasas con Z-VAD.

Por tanto, todo parecía indicar que, en el contexto de los adipocitos marrones inmortalizados, la apoptosis inducida por la ausencia de suero, era dependiente de la activación de caspasas. Estas, por otra parte, daban lugar a alteraciones en la membrana mitocondrial, lo que a su vez, por la liberación de otros factores, podría provocar la activación de nuevas caspasas, creando así un mecanismo de retroalimentación. En nuestro sistema celular, la presencia de Bcl-x<sub>S</sub> en ausencia de Bcl-2/Bcl-x<sub>L</sub>, podría contribuir también a la despolarización mitocondrial.

La señalización intracelular implicada en la inducción de apoptosis tras la retirada de suero/factores de crecimiento, no se conoce claramente, debido principalmente a la gran variabilidad existente entre unos sistemas celulares y otros. Los experimentos que llevamos a cabo en la línea celular de adipocitos marrones transformados por *H-ras* (células MB 1.3.19), nos mostraron la implicación de las proteínas Ras/Raf-1 en la señalización que conduce a la apoptosis en estas células. Al comparar las células inmortalizadas (MB 4.9.2) con las transformadas (MB 1.3.19), el aumento en el porcentaje de células hipodiploides, en la fragmentación del ADN y en la presencia de núcleos apoptóticos, nos indicó que en las células transformadas había una mayor incidencia de apoptosis.

El papel que juega Ras en el proceso apoptótico es muy controvertido, pudiendo realizar funciones opuestas dependiendo del

sistema celular o del estímulo inductor de la muerte celular. Los mecanismos por los que Ras protege de apoptosis se han relacionado con la activación de la ruta PI 3-quinasa/Akt, de la ruta Raf/MAP-quinasa y con la expresión de Bcl-2. Por otra parte, los trabajos que implican a Ras en la inducción de apoptosis son cada vez más abundantes. La implicación de Raf en apoptosis resulta tan controvertida como la de Ras. Parrizas y col. (1997) (24), demostraron que la apoptosis inducida en células que sobreexpresaban la proteína Crk-II, estaba mediada por Ras, pero era independiente de Raf. Sin embargo, los experimentos de Kauffmann-Zeh y col. (1997) (37) y Liu y col. (1998) (38), proponían un mecanismo de muerte celular en el que estaban implicados Ras y Raf.

Al realizar la transfección transitoria en las células MB 1.3.19 con  $\Delta$ Raf, comprobamos que nuestro sistema celular, se comportaba según el segundo modelo propuesto. Así, pudimos observar que la presencia de  $\Delta$ Raf, daba lugar a los mismos efectos que  $\Delta$ Ras, es decir, se produjo una disminución en el porcentaje de células con contenido en ADN inferior a 2C, así como un descenso de la fragmentación del ADN, todo lo cual indicaba que se había producido una reversión del proceso apoptótico. Sin embargo, el bloqueo de la vía MEK/MAP-quinasa con el inhibidor PD098059, no dio lugar a la desaparición de la muerte celular programada lo que parecía sugerir la existencia de dos rutas de señalización distintas a partir de Raf, una anti-apoptótica (MEK/MAP-quinasa) y otra apoptótica, hasta el momento desconocida. El balance de las dos vías, estaría regulado por el suero y/o factores de crecimiento, de manera que en presencia de los mismos, el efecto anti-apoptótico de MEK/MAP-quinasa, predominaría frente a la señalización apoptótica en la que estarían implicadas Ras/Raf. Pero la ausencia de suero y/o factores de crecimiento, potenciaría esta última vía, dando lugar a la muerte celular.

Si nos fijamos en la bibliografía aparecida en los últimos años, podremos encontrar numerosas evidencias de la interacción entre Ras, Raf y Bcl-2 (22, 23, 39). De acuerdo con nuestros resultados, diversos autores han presentado datos que demuestran la asociación de Bcl-2 con Raf-1, p21<sup>ras</sup> o p23<sup>R-Ras</sup> (22, 23), relacionando la asociación de p21<sup>ras</sup> y Raf con

Bcl-2, con la fosforilación de este, y con el bloqueo de la protección frente a la apoptosis inducida por esta proteína (23) (Figura 4).

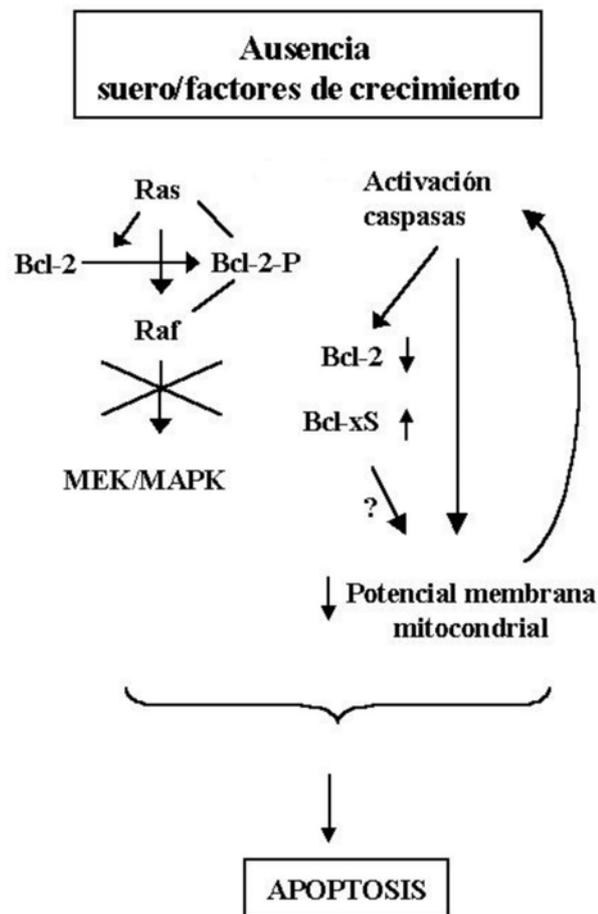


Figura 4.- Representación del modelo de apoptosis inducido por la ausencia de suero en las líneas celulares de adipocitos marrones

El balance entre la vida y la muerte requiere la presencia de señales extracelulares (hormonas, citoquinas, factores de crecimiento). La mayoría de las células en cultivo mueren por apoptosis en ausencia de suero y/o factores de supervivencia, pero es posible prevenir esta muerte celular mediante el aporte de factores específicos, como la insulina, IGF-I, IGF-II, NGF, EGF (32,40,41,42). Considerando el alto número de receptores de insulina e IGF-I presentes en las células MB 4.9.2 (25), estudiamos el posible efecto de supervivencia que podrían ejercer estos factores frente a la apoptosis inducida por retirada de suero.

La unión de la insulina/IGF-I a su receptor, da lugar a la activación de distintas cascadas de señalización, a través de las cuales es capaz de mediar en los procesos de proliferación, diferenciación y apoptosis. La estimulación de la actividad PI 3-quinasa por insulina en los adipocitos marrones primarios e inmortalizados, ya había sido demostrada previamente (13,25). Nuestros resultados demostraron además que wortmanina y LY294002 eran capaces de bloquear esta estimulación en las células MB 4.9.2, a las mismas dosis que lo hacían en las células primarias (25), y que este bloqueo impedía a la insulina ejercer su efecto de protección frente a la apoptosis inducida por la retirada de suero. Tanto la wortmanina como el LY294002 en presencia de insulina, disminuyeron el porcentaje de células en ciclo, indicando que esta ruta era necesaria para la progresión del ciclo celular y para la supervivencia de los adipocitos marrones inmortalizados.

El papel de la ruta de Ras/Raf/MEK1/MAP-quinasa en apoptosis, como sucede en otros casos es contradictorio. En líneas generales, se implica a las MAP-quinasas en las rutas de supervivencia. Nuestros resultados mostraron que el PD098058, inhibiendo la fosforilación de MAP-quinasa, bloqueaba el rescate inducido por la insulina de una forma similar a la wortmanina/LY294004, inhibidores de PI 3-quinasa. Dado que la wortmanina no inhibe la estimulación de MAP-quinasas por insulina, y que el PD098059 no afecta la actividad PI 3-K estimulada por insulina, nuestros resultados demuestran claramente que la insulina lleva a cabo su función como factor de supervivencia en los adipocitos

marrones inmortalizados, por medio de dos rutas alternativas, como son la PI 3-quinasa y MAP-quinasas.

La importancia de la expresión de Bcl-x en el control de apoptosis por IGF-I/insulina, es un tema controvertido. La inhibición de apoptosis por IGF-I en células PC12, parece estar asociado a un aumento en la expresión de la proteína Bcl-x<sub>L</sub> (24), aunque por otra parte, la supresión de la apoptosis mediada por ICE, inducida por IGF-I en células COS, es independiente de la expresión de Bcl-x. Por lo tanto, vemos que, si bien la proteína Bcl-x<sub>L</sub> no está claramente expresada en este sistema celular, y por tanto no juega ningún papel relevante en él, se puede observar una regulación de la forma pro-apoptótica, Bcl-x<sub>S</sub> en todos los procesos relacionados con la muerte celular inducida por la ausencia de suero o con el rescate de dicha muerte por factores específicos.

Dos de los principales efectores de la PI 3-quinasa son la PKB/Akt y la p70<sup>S6k</sup>. En trabajos muy recientes se ha sugerido que la PKB/Akt está implicada en la regulación de la supervivencia celular en diferentes tipos celulares (38,44,45). Sin embargo, la participación de la p70<sup>S6k</sup> en los procesos de supervivencia no parece estar tan clara (38). La supervivencia inducida por la insulina, demostró ser independiente de p70<sup>S6k</sup> en los adipocitos marrones inmortalizados ya que su inhibición por rapamicina no impedía el efecto protector de la insulina.

Los efectos de PKB/Akt en apoptosis parecen estar mucho más claros. En los últimos años ha aparecido un gran número de trabajos implicando a esta quinasa en la regulación de la supervivencia celular en diferentes sistemas celulares (38,44,45). Nuestros resultados mostraron que la PKB, en los adipocitos marrones inmortalizados, estaba claramente activada por la insulina. Además, esta activación se producía a través de la PI 3-quinasa, pero no a través de p70<sup>S6k</sup>. Estos resultados están de acuerdo con otros aparecidos en la bibliografía, en los que se considera a la PKB como un mediador de la cascada de señalización de la PI 3-quinasa (46,47,48). Recientemente, Somwar y col. (1998) (49), han propuesto un mecanismo bifásico para la activación de la p70<sup>S6k</sup> por insulina, según el cual la estimulación inicial de la insulina daría lugar a la activación de la p70<sup>S6k</sup> por una vía PI 3-quinasa-dependiente, mientras

que en una segunda fase de la estimulación, la activación de la quinasa continuaría, pero esta vez por una vía independiente de PI 3-quinasa.

En resumen, los datos aquí expuestos, muestran que la insulina/IGF-I, además de ser fundamentales en los procesos de proliferación y diferenciación en los adipocitos marrones, constituyen importantes señales de supervivencia. Estos factores ejercen su efecto protector frente a la apoptosis inducida por la ausencia de suero a través

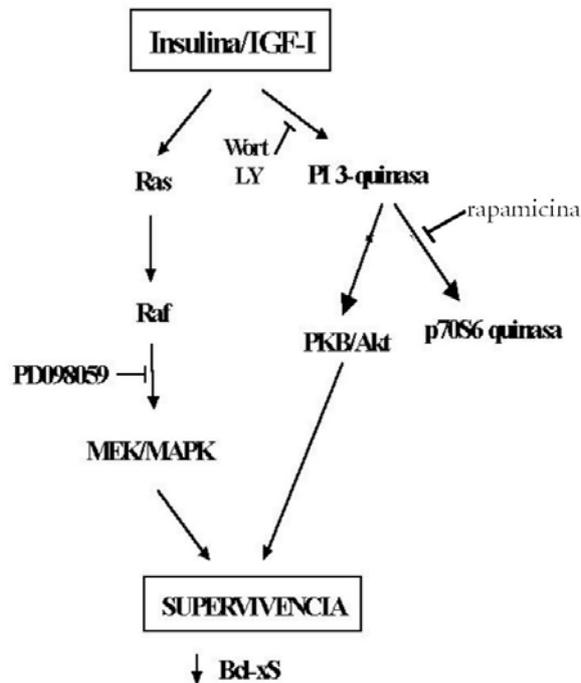


Figura 5.- Modelo de supervivencia inducido por insulina/IGF-I en las líneas celulares de adipocitos marrones

de dos rutas principales: la MEK/MAP-quinasa y la PI 3-quinasa/Akt, siendo capaces de regular a través de estas rutas los niveles de la proteína Bcl-x<sub>S</sub> (Figura 5).

## BIBLIOGRAFÍA

- (1) KERR JFR, WINTERFORD CM AND HARMON BV (1994) Apoptosis: its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer* 73(8) 2013-2026.
- (2) FADOK VA, VOELKER DR, CAMPBELL PA, COHEN JJ, BRATTON DL AND HENSON PM (1992) Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J Immunol* 148, 2207-2216.
- (3) WYLLIE H (1980) Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature* 284, 555-556.
- (4) COHEN GM (1997) Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J* 326, 1-16.
- (5) VILLA P, KAUFMANN SH AND EARNSHAW WC (1997) Caspases and caspase inhibitors. *Trends Biochem Sci* 22, 388-393.
- (6) DOLLE RE, SINGH J, RINKER J, HOYER D, PRASAD CV, GRAYBILL TL, SALVINO JM, HELASZEK CT, MILLER RE AND ATOR MA (1994) Aspartyl alpha-((1-phenyl-3-(trifluoromethyl)-pyrazol-5-yl)oxy)me-thyl ketones as interleukin-1 beta converting enzyme inhibitors. Significance of the P1 and P3 amino nitogens for enzyme-peptide inhibitor binding. *J Med Chem* 37, 3863-3866.
- (7) BOISE LH, GONZALEZ-GARCÍA M, POSTEMA CE, DING L, LINDSTEN T, TURKA LA, MAO X, NUÑEZ G AND THOMPSON GB (1993) *bcl-x*, a *bcl-2*-related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death. *Cell* 74, 597-608.
- (8) DATTA SR, DUDEK H, TAO X, MASTERS S, FU H, GOTOH Y AND GREENBERG ME (1997) Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell* 91, 231-241.
- (9) DEL PESO L, GONZÁLEZ-GARCÍA M, PAGE C, HERRERA R AND NUÑEZ G (1997) Interleukin-3-induced phosphorylation of BAD through the protein kinase Akt. *Science* 278, 687-689.
- (10) PARRIZAS M, BLAKESLEY VA, BEITNER-JOHNSON D AND LE ROITH D (1997) The proto-oncogene Crk-II enhances apoptosis by a Ras-dependent, Raf-1/MAP kinase-independent pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 234, 616-620.
- (11) BENITO M, PORRAS A AND SANTOS E (1993) Establishment of permanent brown adipocyte cell lines achieved by transfection with SV40 large T Antigen and ras genes. *Exp Cell Res* 209, 248-254.
- (12) LORENZO M, VALVERDE AM, TERUEL T, ALVAREZ A AND BENITO M (1996) p21-ras induced differentiation-related gene expression in fetal brown adipocyte primary cells and cell lines. *Cell Growth Differ* 7, 1251-1259.
- (13) VALVERDE AM, LORENZO M, NAVARRO P AND BENITO M (1997) Phosphatidylinositol 3-kinase is a requirement for insulin-like growth factor I-induced differentiation, but not for mitogenesis, in fetal brown adipocytes. *Mol Endocrinol* 11:595-607,
- (14) VALVERDE AM, LORENZO M, PONS S, WHITE M AND BENITO M (1998) IRS-1 and IRS-2 differential signaling in the insulin/IGF-I pathways in fetal brown adipocytes. *Mol Endocrinol* 12, 688-697.

- (15) TERUEL T, VALVERDE AM, BENITO M AND LORENZO M (1996) Insulin-like growth factor I and insulin induce adipogenic-related gene expression in foetal brown adipocyte primary cultures. *Biochem J* 319, 627-32.
- (16) PORRAS A, ALVAREZ AM, VALLADARES A AND BENITO M (1997) TNF- $\alpha$  induces apoptosis in rat fetal brown adipocytes in primary culture. *FEBS Lett* 416, 324-328.
- (17) HAVIV R, LINDENBOIM L, YUAN J AND STEIN R (1997) Need for caspases in apoptosis of trophic factor-deprived PC12 cells. *J Neurosci Res* 50, 69-80.
- (18) HAVIV R, LINDENBOIM L, YUAN J AND STEIN R (1998) Need for caspase-2 in apoptosis of growth-factor-deprived PC12 cells. *J Neurosci Res* 52, 491-497.
- (19) XUE D AND HORVITZ HR (1997) *Caenorhabditis elegans* CED-9 protein is a bifunctional cell-death inhibitor. *Nature* 390, 305-308.
- (20) CHENG EH-Y, KIRSCH DG, CLEM RJ, RAVI R, KASTAN MB, BEDI A, UENO K AND HARDWICK JM (1997) Conversion of Bcl-2 to a Bax-like death effector by caspases. *Science* 278, 1966-1968.
- (21) ALESSI DR, CUENDA A, COHEN P, DUDLEY DT AND SALTIEL AR (1995) PD 098059 is a specific inhibitor of the activation of mitogen-activated protein kinase in vitro and in vivo. *J Biol Chem* 270, 27489-27494.
- (22) WANG HG, MILLAN JA, COX AD, DER CJ, RAPP VR, BECK T, ZHA H AND REED JC (1995) R-Ras promotes apoptosis caused by growth factor deprivation via a Bcl-2 suppressible mechanism. *J Cell Biol* 129, 1103-1114.
- (23) CHEN CY AND FALLER DV (1996) Phosphorylation of Bcl-2 protein and association with p21<sup>ras</sup> in Ras-induced apoptosis. *J Biol Chem* 271, 2376-2379.
- (24) PARRIZAS M AND LEROITH D (1997) Insulin-like Growth Factor-I inhibition of apoptosis is associated with increased expression of the bcl-x<sub>L</sub> gene product. *Endocrinology* 138, 1355-1358.
- (25) VALVERDE AM, LORENZO M, TERUEL T AND BENITO M (1997) Alterations in the insulin signaling pathways induced by immortalization and H-ras transformation of brown adipocytes. *Endocrinology* 138, 3195-3206.
- (26) OKADA T, SAKUMA L, FUKUI Y, HAZEKI O AND UI M (1994) Blockage of chemotactic peptide-induced stimulation of neutrophils by wortmannin as a result of selective inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase. *J Biol Chem* 269, 3563-3567.
- (27) VLAHOS CJ, MATTER WF, HUI KY AND BROWN RF (1994) An specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY294002). *J Biol Chem* 269, 5241-5248.
- (28) NISOLI E, BRISCINI L, TONELLO C, DE GIULI-MORGHEN C AND CARRUBA MO (1997) Tumor necrosis factor- $\alpha$  induces apoptosis in rat brown adipocytes. *Cell Death Differ* 4, 771-778.
- (29) EVAN GI, WYLLIE AH, GILBERT CS, LITTLEWOOD TD, LAUD H, BROOKS M, WATERS CM, PENN LZ AND HANCOCK DC (1992) Induction of apoptosis in fibroblast by c-Myc protein. *Cell* 69, 119-128.
- (30) RAFF MC (1992) Social controls on cell survival and cell death. *Nature* 356, 397-400.

- (31) FERRARI G AND GREENE L (1994) Proliferative inhibition by dominant-negative Ras rescues naive and neuronally differentiated PC12 cells from apoptotic death. *EMBO J* 13, 5922-5928.
- (32) YAO R AND COOPER GM (1995) Requirement for phosphatidylinositol-3 kinase in the prevention of apoptosis by nerve growth factor. *Science* 267, 2003-2006.
- (33) MCCARTHY NJ, WHYTE MKB, GILBERT CS AND EVAN GI (1997) Inhibition of Ced-3/ICE-related proteases does not prevent cell death induced by oncogenes, DNA damage, or the Bcl-2 homologue Bak. *J Cell Biol* 136, 215-227.
- (34) YAMAMOTO AM, ELOY L, BACH JF AND GARCHON HJ (1998) N-terminus cleavage of bcl-2 by a novel cellular non-ICE cysteine proteinase. *Leukemia* 12, 1467-1472.
- (35) GREEN DR AND REED JC (1998) Mitochondria and apoptosis. *Science* 281, 1309-1312.
- (36) GREEN D AND KROEMER G (1998) The central executioners of apoptosis: caspases or mitochondria? *Trends Cell Biol* 8, 267-271.
- (37) KAUFFMANN-ZEH A, RODRIGUEZ-VICIANA P, ULRICH E, GILBERT C, COFFER P, DOWNWARD J AND EVAN G (1997) Suppression of c-Myc-induced apoptosis by Ras signalling through PI(3)K and PKB. *Nature* 385, 544-548.
- (38) LIU HS, CHEN CY, LEE CH AND CHOU YI (1998) Selective activation of oncogenic Ha-ras-induced apoptosis in NIH/3T3 cells. *Br J Cancer* 11, 1777-1786.
- (39) FERNANDEZ-SARABIA MJ AND BISCHOFF JR (1993) Bcl-2 associates with the ras-related protein R-Ras p23. *Nature* 366, 274-275.
- (40) PARRIZAS M, SALTIEL AR AND LEROITH (1997) Insulin-like growth factor 1 inhibits apoptosis using the phosphatidylinositol 3'-kinase and Mitogen-activated protein kinase pathways. *J Biol Chem* 272, 154-161.
- (41) HARRINGTON EA, BENNETT MR, FANIDI A AND EVAN GI (1994) c-Myc-induced apoptosis in fibroblasts is inhibited by specific cytokines. *EMBO J* 13, 3286-3295.
- (42) FABREGAT I, SÁNCHEZ A, ALVAREZ AM, NAKAMURA T AND BENITO M (1996) Epidermal growth factor, but not hepatocyte growth factor, suppresses the apoptosis induced by transforming growth factor-beta in fetal hepatocytes in primary culture. *FEBS Letters* 384, 14-18.
- (43) VALVERDE AM, TERUEL T, LORENZO M AND BENITO M (1996) Involvement of Raf-1 kinase and protein kinase C  $\zeta$  in Insulin-like growth factor I-induced brown adipocyte mitogenic signaling cascades: inhibition by cyclic adenosine 3',5'-monophosphate. *Endocrinology* 137, 3832-3841.
- (44) DUDEK H, DATTA SR, FRANKE TF, BIRNBAUM MJ, YAO R, COOPER GM, SEGAL RA, KAPLAN DR AND GREENBERG ME (1997) Regulation of neuronal survival by the serine-threonine protein kinase Akt. *Science* 275, 661-664.
- (45) KULIK G, KLIPPEL A AND WEBER MJ (1997) Antiapoptotic signalling by the Insulin-like Growth Factor I Receptor, phosphatidylinositol 3-kinase, and Akt. *Mol Cell Biol* 17, 1595-1606.

- (46) FRANKE TF, KAPLAN DR AND CANTLEY LC (1997) PI3K: Downstream AKTion blocks apoptosis. *Cell* 88, 435-437.
- (47) BURGERING BMTH AND COFFER PJ (1995) Protein kinase B (c-Akt) in phosphatidylinositol-3-OH kinase signal transduction. *Nature* 376, 599-602.
- (48) ANDJELKOVIC M, ALESSI DR, MEIER R, FERNANDEZ A, LAMB NJC, FRECH M, CRON P, LUCOCQ JM AND HEMMINGS BA (1997) Role of translocation in the activation and function of protein kinase B. *J Biol Chem* 272, 31515-31524.
- (49) SOMWAR R, SUMITANI S, TAHA C, SWEENEY G AND KLIP A (1998) Temporal activation of p70 S6 kinase and akt1 by insulin: PI 3-kinase-dependent and -independent mechanism. *Am J Physiol* 275, 618-625.

**PIES DE FIGURAS**

**Figura 1.- Análisis por citometría de flujo de adipocitos marrones teñidos con yoduro de propidio:** Tras crecer las células en medio suplementado con 10% SF, se les retiró el suero durante 6 ó 12h. Pasado este tiempo, se recogieron las células, y se procesaron para el análisis del ciclo celular por citometría de flujo.  $M_1$  representa el porcentaje de células con un contenido en ADN inferior a 2C. Los resultados son medias  $\pm$  S.E.M. de cuatro experimentos distintos.

**Figura 2.- Fragmentación del ADN de adipocitos marrones inmortalizados en ausencia de suero:** Los adipocitos marrones inmortalizados crecieron en presencia de suero, y posteriormente se cultivaron en ausencia del mismo durante distintos tiempos. A continuación se realizó la extracción del ADN extranuclear y se procedió a su análisis electroforético en gel de agarosa. Se muestra un experimento representativo de cuatro realizados. En el último carril se muestra un marcador de peso molecular (M) (escalera de ADN de 100 pb).

**Figura 3.- Niveles de proteínas Bcl-x<sub>S</sub> y Bcl-2:** Los histogramas representan los niveles de las proteínas Bcl-x<sub>S</sub> y Bcl-2 en unidades arbitrarias, y son medias  $\pm$  S.E.M. de tres experimentos independientes.

**Figura 4.- Representación del modelo de apoptosis inducido por la ausencia de suero en las líneas celulares de adipocitos marrones**

**Figura 5.- Modelo de supervivencia inducido por insulina/IGF-I en las líneas celulares de adipocitos marrones**