

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 622 068**

51 Int. Cl.:

**C12N 5/0775** (2010.01)

**C12N 5/077** (2010.01)

**G01N 33/50** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.06.2009 PCT/EP2009/057852**

87 Fecha y número de publicación internacional: **30.12.2009 WO09156413**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.06.2009 E 09769262 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.01.2017 EP 2297576**

54 Título: **Linaje establecido de adipocitos marrones humanos y procedimiento de diferenciación a partir de un linaje de células hMADS**

30 Prioridad:

**23.06.2008 FR 0854140**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**05.07.2017**

73 Titular/es:

**CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE  
SCIENTIFIQUE (C.N.R.S.) (50.0%)**

**3, rue Michel-Ange**

**75016 Paris, FR y**

**UNIVERSITE DE NICE SOPHIA-ANTIPOLIS  
(50.0%)**

72 Inventor/es:

**AILHAUD, GÉRARD, PAUL;**

**AMRI, EZ-ZOUBIR;**

**DANI, CHRISTIAN, JEAN, LUCIEN y**

**ELABD, CHRISTIAN**

74 Agente/Representante:

**CURELL AGUILÁ, Mireia**

ES 2 622 068 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Linaje establecido de adipocitos marrones humanos y procedimiento de diferenciación a partir de un linaje de células hMADS.

La invención tiene por objeto un procedimiento de diferenciación de células hMADS en una población de adipocitos marrones humanos funcional, un procedimiento de conversión de una población de adipocitos blancos humanos en una población de adipocitos marrones humanos funcional, así como un método de cribado de moléculas susceptibles de modular el peso corporal en un sujeto.

El tejido blanco (WAT) desempeña en el hombre un papel clave en el control del resultado energético y de la homeostasis glucídico-lipídica (Ailhaud G. *et al.*, *Annu Rev Nutr*, 1992. 12: p. 207-233; Rosen, E.D. y B.M. Spiegelman, *Nature*, 2006. 444(7121): p. 847-53). Contrariamente al WAT, el tejido adiposo marrón (BAT) es especialista en la termogénesis adaptativa durante la cual la proteína desacoplante UCP1 tiene un papel determinante. La presencia de tejido adiposo marrón es bien conocida tanto en los roedores como en los mamíferos recién nacidos de mayor tamaño (Garruti, G. y D. Ricquier, *Int J Obes Relat Metab Disord*, 1992. 16(5): p. 383-90; Cannon, B. y J. Nedergaard, *Physiol Rev*, 2004. 84(1): p. 277-359). De forma particularmente sorprendente, unos datos recientes permiten adelantar la existencia de BAT funcional en el hombre adulto sano (Nedergaard, J. *et al.*, *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2007. 293(2): p. E444-52; Cypess, AM *et al.*, *N. Engl. J. Med.* 2009. 360: p. 1509-17; Saito, M. *et al.*, *Diabetes* 2009. Publish Ahead of Print, Online April 28; van Marken Lichtenbelt, W *et al.*, *N. Engl. J. Med.* 2009. 390: p. 1500-08; Virtanen, KA *et al.*, *N. Engl. J. Med.* 2009. 360: p. 1518-1525).

*In vivo*, se conoce la aparición en los roedores de islotes de adipocitos marrones en el centro de depósitos de WAT (Timmons, J.A., *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007. 104(11): p. 4401-6; Cousin, B., *et al.*, *J Cell Sci*, 1992. 103 (Pt 4): p. 931-42; Xue, B., *et al.*, *Mol Cell Biol*, 2005. 25(18): p. 8311-22), tras una exposición en frío o de un tratamiento por los agonistas de los receptores  $\beta$ -adrenérgicos ( $\beta$ -AR). Asimismo, después de un tratamiento por unos ligandos agonistas de PPAR $\gamma$ , la aparición de células que expresan UCP1 en unos depósitos adiposos blancos también se ha documentado en los roedores y en el hombre (Wilson-Fritch, L., *et al.*, *J Clin Invest*, 2004. 114(9): p. 1281-9; Fukui, Y., *et al.*, *Diabetes*, 2000. 49(5): p. 759-67; Bogacka, I., *et al.*, *Diabetes*, 2005. 54(5): p. 1392-9). Sin embargo, estas observaciones no pueden excluir la existencia previa de precursores marrones en tales sitios. Recíprocamente, la conversión rápida de BAT en WAT tanto en el recién nacido humano como en los recién nacidos ovinos y bovinos no puede excluir la existencia previa de precursores blancos (Casteilla, L., *et al.*, *Am J Physiol*, 1987. 252(5 Pt 1): p. E627-36; Casteilla, L., *et al.*, *Biochem J*, 1989. 257(3): p. 665-71; Casteilla, L., *et al.*, *Eur J Biochem*, 1991. 198(1): p. 195-9). Queda por demostrarse la existencia de una célula precursora común a los linajes blanco y marrón, en la medida en la que los preadipocitos obtenidos *ex vivo* a partir del WAT y del BAT dan respectivamente lugar sólo a adipocitos blancos y marrones (Moulin, K., *et al.*, *Biochem J*, 2001. 356(Pt 2): p. 659-64). Unos estudios recientes en el ratón favorecen esta posibilidad demostrando la existencia de una firma transcriptómica miogénica de los adipocitos marrones distinta de la de los adipocitos blancos (Timmons, J.A., *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007. 104(11): p. 4401-6).

Sin embargo, otros trabajos subrayan la posibilidad de generar unos adipocitos marrones a partir de adipocitos blancos por transgénesis (Tiraby, C. y D. Langin, *Trends Endocrinol Metab*, 2003. 14(10): p. 439-41; Tiraby, C., *et al.*, *J Biol Chem*, 2003. 278(35): p. 33370-6) y varios co-activadores y factores de transcripción participan en la formación de adipocitos marrones. Así, PGC-1 $\alpha$  y PGC-1 $\beta$  desempeñan un papel esencial durante la diferenciación y complementario en la mitocondriogénesis y la respiración (Puigserver, P., *et al.*, *Mol Cell*, 2001. 8(5): p. 971-82; Uldry, M., *et al.*, *Cell Metab*, 2006. 3(5): p. 333-41). Sin embargo, al contrario que estos co-activadores de PPAR $\gamma$ , la proteína transcripcional en dedo de zinc PRDM16 controla verdaderamente la determinación "marrón" de los preadipocitos blancos por inducción de PGC-1 $\alpha$ , de UCP1 y de la triiodotironina desiodinasa de tipo 2 (Dio2) (Seale, P., *et al.*, *Cell Metab*, 2007. 6(1): p. 38-54).

El artículo Zilberfarb *et al.*, 1997, *J Cell Sci* 110 (Pt 7), 801-807, describe un linaje inmortalizado de adipocitos marrones humanos, PAZ6, que se obtiene por transgénesis. Este artículo muestra que el linaje PAZ6 expresa el ARNm que codifica UCP1.

Sin embargo, no muestra que esta expresión conduce a una proteína UCP1 funcional, es decir que posee una actividad desacoplante debido a su localización en la membrana interna mitocondrial, confiriendo así a los adipocitos marrones humanos una actividad respiratoria y una actividad desacoplante significativamente superiores a las de los adipocitos blancos humanos. Además, no se refiere a ninguna estimulación de la actividad respiratoria por un agonista específico de los receptores  $\beta$ -adrenérgicos como siendo dependiente de la presencia de UCP1.

Además, el artículo Zilberfarb *et al.*, 1997 describe que el receptor  $\beta$ 3-adrenérgico está acoplado a la adenilato ciclasa y a la lipólisis en las células PAZ6. Este acoplamiento entre el receptor  $\beta$ 3-adrenérgico y la adenilato ciclasa es conocido por ser el preliminar de una cascada de eventos que conducen a la actividad desacoplante de la proteína UCP1.

Ahora bien, el artículo Zilberfarb *et al.*, 1997 describe también que se han obtenido unos resultados similares de acoplamiento entre la adenilato ciclasa y el receptor  $\beta$ 3-adrenérgico por otros autores (Murphy *et al.*, 1993) utilizando unos adipocitos de rata recientemente aislados. Se trata en realidad de adipocitos blancos (véase el título de Murphy *et al.*, 1993: "Corrélation of  $\beta$ 3-adrenoreceptor-induced activation of cyclic AMP dependent protein kinase with activation of lipolysis in rat white adipocytes").

Así, los resultados obtenidos y descritos en Zilberfarb *et al.*, 1997 con los adipocitos marrones PAZ6 son similares a los obtenidos con unos adipocitos blancos, lo que conduce inevitablemente a una actividad respiratoria y a una actividad desacoplante de estos adipocitos marrones similares a las de los adipocitos blancos. Los adipocitos marrones PAZ6 descritos en Zilberfarb *et al.*, 1997 no son por lo tanto funcionales en el sentido de la presente invención.

Recientemente, se han aislado a partir de tejidos adiposos humanos unas células madre mesenquimatosas (células hMADS). Estas células presentan en estado clonal un cariotipo normal, una fuerte capacidad de auto-renovación, y una ausencia de tumorigenicidad. Las células hMADS revelan ser capaces de diferenciarse en varios linajes, en particular osteoblástica como adipocitaria, y conducen *in vivo* a una regeneración ósea y muscular (Rodríguez, A.M., *et al.*, Biochem Biophys Res Commun, 2004. 315(2): p. 255-63; Rodríguez, A.M., *et al.*, J Exp Med, 2005. 201(9): p. 1397-405; Zaragosi, L.E., *et al.*, Stem Cells, 2006. 24(11): p. 2412-9; Elabd, C., *et al.*, Biochem Biophys Res Commun, 2007. 361(2): p. 342-8). Una vez diferenciadas en adipocitos, las células hMADS adquieren las propiedades funcionales de los adipocitos blancos humanos (secreción de leptina y de adiponectina, respuestas a la insulina y a los agonistas  $\beta$ -adrenérgicos y, específico de los primates, al factor atrial natriurético, (Rodríguez, A.M., *et al.*, Biochem Biophys Res Commun, 2004. 315(2): p. 255-63). Las células hMADS representan por lo tanto un modelo celular apropiado para estudiar su capacidad eventual a diferenciarse también en adipocitos marrones.

Nuestros resultados muestran que una activación crónica prolongada de PPAR $\gamma$  es suficiente para promover su conversión *in vitro* y aumentar sus capacidades respiratoria y desacoplante, y que los agonistas de los receptores  $\beta$ -adrenérgicos, incluyendo los agonistas  $\beta$ 3, modulan positivamente la expresión de UCP1 así como la estimulación de la actividad respiratoria por un agonista específico de los receptores  $\beta$ -adrenérgicos tal como el isoproterenol. La diferenciación de las células hMADS lleva a una población de adipocitos marrones humanos funcional que puede ser utilizada como modelo celular, en particular para identificar unas moléculas susceptibles de modular el peso corporal y en particular para tratar el sobrepeso y/o la obesidad.

Así, la presente invención describe una población de adipocitos marrones humanos funcional que expresa simultáneamente los genes siguientes:

- los genes que codifican las proteínas UCP1, CIDEA, CPT1B, Bcl2, siendo la expresión de estos genes superior a la de una población de adipocitos blancos humanos,
- el gen que codifica la proteína Bax, siendo la expresión de este gen inferior a la de una población de adipocitos blancos humanos, y
- los genes que codifican las proteínas PPAR alfa, PGC1 alfa, PGC1 beta y PRDM16, siendo la expresión de estos genes similar a la de una población de adipocitos blancos humanos.

La población (o linaje) de adipocitos marrones humanos funcional descrita aquí procede de una población (o linaje) de células madre humanas multipotentes derivadas del tejido adiposo (células hMADS). Las células hMADS se describen en particular en la solicitud internacional publicada el 12 de febrero de 2004 bajo el número WO 2004/013275 y en Rodríguez, A.M., *et al.*, Biochem Biophys Res Commun, 2004. 315(2): p. 255-63. Estas células hMADS son capaces de diferenciarse en diversos tipos celulares tales como unos adipocitos, unos osteoblastos, unos miocitos y unas células endoteliales en función del medio de cultivo utilizado. Las poblaciones establecidas de células hMADS presentan una capacidad de auto-renovación y de diferenciación adipocitaria conservadas durante un cierto número de duplicaciones de población, es decir que son viables a largo plazo y que pueden dividirse sin alterar las características celulares iniciales. Se habla entonces también de linajes de células hMADS. Ventajosamente, las poblaciones celulares hMADS según la presente invención presentan una capacidad de auto-renovación y una capacidad de diferenciación adipocitaria conservadas durante al menos 130, aún más ventajosamente al menos 200 duplicaciones de población. En la presente invención, se han determinado las condiciones que permiten la diferenciación de la población celular hMADS en una población de adipocitos marrones humanos funcional y se describen a continuación. Se ha podido establecer así una población de adipocitos marrones humanos funcional. Ésta posee la misma capacidad de auto-renovación y de diferenciación adipocitaria conservadas durante un cierto número de duplicaciones de población que la población celular hMADS de la cual procede. Es por lo tanto viable a largo plazo y puede dividirse sin alterar las características celulares iniciales. Se puede hablar por lo tanto también de linaje de adipocitos marrones funcional.

Por población de adipocitos marrones humanos "funcional" según la presente invención, se entiende designar una población que posee una actividad respiratoria y una actividad desacoplante significativamente superiores con

respecto a la actividad respiratoria y la actividad desacoplante de cualquier otro tipo celular, en particular con respecto a las de los adipocitos blancos. Además, la actividad respiratoria significativamente superior de la población de adipocitos marrones humanos funcionales se estimula cuando esta población está expuesta a un agonista específico de los receptores  $\beta$ -adrenérgicos tal como el isoproterenol. La actividad respiratoria y la actividad desacoplante significativamente superiores en la población de adipocitos marrones humanos funcional, así como la estimulación de la actividad respiratoria por un agonista específico de los receptores  $\beta$ -adrenérgicos, se deben a la expresión del gen que codifica UCP1 con respecto a la ausencia de expresión del mismo gen en unos adipocitos blancos humanos. La actividad desacoplante de la proteína UCP1 resulta de su presencia en la membrana interna mitocondrial de los adipocitos marrones humanos. Una actividad respiratoria y una actividad desacoplante significativamente superiores de estos adipocitos marrones humanos no sería observada si la proteína UCP1 no estaba al mismo tiempo localizada y era funcional en la membrana interna mitocondrial. La funcionalidad de los adipocitos marrones humanos puede ser verificada de diferentes maneras, descritas a continuación.

En la presente invención, se entiende por "actividad respiratoria" la capacidad de una célula o de una población celular para consumir oxígeno. Esta capacidad para consumir oxígeno puede ser medida como se indica a continuación.

En la presente invención, se entiende por "actividad desacoplante" la capacidad de la proteína UCP1, y por lo tanto la capacidad de la célula que la contiene, para desacoplar su actividad respiratoria de su producción de ATP. En efecto, cuando la célula respira, ésta produce un gradiente de protones entre el interior y el exterior de la membrana interna mitocondrial. Este gradiente permite la generación de ATP. Ahora bien, la proteína UCP1 disipa este gradiente de protones. Se produce entonces una fuerte disminución de la producción de ATP y un aumento de la producción de calores. Así, para una misma producción de ATP, un adipocito marrón consumirá mucho más oxígeno que un adipocito blanco. La medición de la actividad desacoplante se indica a continuación.

En la presente invención, la expresión de un gen por una población celular significa que el producto procedente de esta expresión es o bien el producto de traducción de dicho gen, a saber la proteína codificada por el gen, o bien el producto de transcripción de dicho gen, a saber el ARNm que codifica la proteína. La expresión de un gen se determina por la cuantificación o bien del producto de traducción (proteína codificada por el gen), por ejemplo utilizando la técnica de inmunohuella, o bien del producto de transcripción (ARNm que codifica la proteína), por ejemplo por RT-PCR cuantitativa y/o por la técnica de transferencia Northern. Las técnicas de cuantificación de los productos de expresión de los genes son bien conocidas por el experto en la materia.

La expresión de los genes que codifican las proteínas UCP1, CIDEA, CPT1B, Bcl2, Bax, PPAR alfa, PGC1 alfa, PGC1 beta y PRDM16 por la población de adipocitos marrones humanos funcional se cuantifica y después compara con la expresión de estos mismos genes por una población de adipocitos blancos humanos. Esta población de adipocitos blancos humanos procede ventajosamente de una población de células hMADS tal como se han descrito anteriormente. Las condiciones de cultivo que permiten la diferenciación de las células hMADS en adipocitos blancos humanos son descritos en particular en la solicitud internacional publicada el 12 de febrero de 2004 bajo el número WO 2004/013275, página 17, línea 36 a página 18, línea 8, o bien en la parte Ejemplos de la presente solicitud de patente. Ventajosamente, la población de adipocitos blancos humanos se obtiene después de la estimulación de una población celular hMADS durante 1 a 9 días, ventajosamente durante 6 días, por un agonista específico del receptor PPAR gamma tal como un compuesto de la familia de las tiazolinodionas, compuesto que se selecciona ventajosamente entre la rosiglitazona, la ciglitazona, la pioglitazona, la darglitazona y la troglitazona.

En la presente invención, se considera que la expresión de un gen por la población de adipocitos marrones humanos funcional es superior o inferior a la del mismo gen por una población de adipocitos blancos humanos, cuando se observa una diferencia significativa de esta expresión. A la inversa, una diferencia no es significativa cuando la expresión de un gen por la población de adipocitos marrones humanos funcional es  $\pm 0,20$  veces idéntica a la del mismo gen por una población de adipocitos blancos humanos.

Ventajosamente, la expresión del gen que codifica la proteína UCP1 es 10 a 1000 veces superior, preferentemente de 20 a 500 veces superior a la expresión de este mismo gen por la población de adipocitos blancos humanos,

y/o la expresión del gen que codifica la proteína CIDEA es de 10 a 100 veces superior, preferentemente de 20 a 100 veces superior a la expresión de este mismo gen por la población de adipocitos blancos humanos,

y/o la expresión del gen que codifica la proteína CPT1B es de 2 a 10 veces superior, preferentemente de 4 a 8 veces superior a la expresión de este mismo gen por la población de adipocitos blancos humanos,

y/o la expresión del gen que codifica la proteína Bcl es de 1,5 a 4 veces superior, preferentemente de 2 a 3 veces superior a la expresión de este mismo gen por la población de adipocitos blancos humanos,

y/o la expresión del gen que codifica la proteína Bax es de 0,25 a 2,5 veces superior, preferentemente de 0,5 a 2 veces superior a la expresión de este mismo gen por la población de adipocitos blancos humanos,

y/o la expresión de los genes que codifican las proteínas PPAR alfa, PGC1 alfa, PGC1 bet y PRDM16 es  $\pm$  0,20 veces idéntica a la expresión de estos mismos genes por la población de adipocitos blancos humanos.

5 La expresión del gen que codifica UCP1 aumenta preferiblemente después de la estimulación por un agonista de un receptor beta-adrenérgico, ventajosamente después de la estimulación por agonista del receptor beta3-adrenérgico, ventajosamente durante una duración comprendida entre 1 y 24 horas, ventajosamente 6 horas. Ventajosamente, la expresión del gen que codifica UCP1 es de 1,5 a 4 veces superior con respecto a la obtenida en ausencia de estimulación por un agonista de un receptor beta-adrenérgico.

10 Se puede utilizar cualquier agonista específico de un receptor beta-adrenérgico. Unos ejemplos de tales agonistas se citan en particular en la tabla 1 de Carpené, C. Methods Mol Biol 2001. 155, 129-140. Se pueden citar en particular, sin por ello limitarse a ellos, los compuestos noradrenalina y adrenalina, los compuestos T0509 (beta1), los compuestos salbutamol y procaterol (beta2), el compuesto BRL37314 (beta3), la dobutamina, la terbutalina, el isoproterenol, que es un agonista específico de los tres receptores beta1-, beta2- y beta3-adrenérgicos, el compuesto CGP12177A, que es un agonista parcial del receptor beta3-adrenérgico, y el compuesto CL316243, que es un agonista específico del receptor beta3-adrenérgico. Ventajosamente, el agonista específico de un receptor beta-adrenérgico se selecciona entre la dobutamina, la terbutalina, el isoproterenol, la noradrenalina, la adrenalina, el compuesto CGP12177A, que es un agonista parcial del receptor beta3-adrenérgico, y el compuesto CL316243, que es un agonista específico del receptor beta3-adrenérgico. Aún más ventajosamente, el agonista específico de un receptor beta-adrenérgico se selecciona entre los compuestos noradrenalina, adrenalina, isoproterenol y CL316243. Los compuestos dobutamina, terbutalina, isoproterenol y CL316243 pueden ser obtenidos en particular de Sigma Chemical Company (St Louis, USA). El compuesto CGP12177A se puede obtener de Research Biochemical (Natick, MA, USA).

25 También ventajosamente, la concentración en agonista específico de un receptor beta-adrenérgico está comprendida entre 1 nM y 1000 nM, ventajosamente entre 1 nM y 500 nM, aún más ventajosamente entre 1 y 100 nM.

30 La invención describe también la utilización de un agonista específico del receptor beta3-adrenérgico para aumentar la expresión del gen que codifica la proteína UCP1 en una población de adipocitos marrones humanos tal como la definida aquí, ventajosamente con el fin de aumentar la actividad desacoplante de la proteína UCP1 en dicha población. Preferentemente, el agonista es el compuesto CL316243, y se utiliza de manera preferida a una concentración comprendida entre 1 nM y 1000 nM, ventajosamente entre 1 nM y 500 nM, aún más ventajosamente entre 1 y 100 nM.

35 La presente invención tiene por objeto un procedimiento de diferenciación de una población de células madre humanas multipotentes derivadas del tejido adiposo (células hMADS) en una población de adipocitos marrones humanos funcional tal como se ha definido anteriormente, que comprende la estimulación de dichas células hMADS por un agonista específico del receptor PPAR gamma, siendo dicho agonista una tiazolinodiona, efectuándose esta estimulación:

- p bien durante un periodo de tiempo comprendido entre 10 y 30 días, ventajosamente entre 13 y 20 días, aún más ventajosamente entre 15 y 16 días,
- 45 - o bien (i) durante un primer periodo de diferenciación de las células hMADS en adipocitos blancos de una duración comprendida entre 2 y 9 días, ventajosamente entre 3 y 7 días, aún más ventajosamente de 6 días, (ii) estando dicho primer periodo seguido de un segundo periodo de una duración comprendida entre 2 y 10 días, ventajosamente entre 4 y 7 días, aún más ventajosamente de 5 días, durante el cual la estimulación se detiene, (iii) estando dicho segundo periodo seguido de un tercer periodo de estimulación de una duración comprendida entre 1 y 10 días, ventajosamente entre 1 y 6 días, aún más ventajosamente de 2 días.

50 Entre las tiazolinodionas que pueden ser utilizadas en el ámbito de la presente invención, se pueden citar, sin por ello limitarse a ellas, la rosiglitazona, la ciglitazona, la pioglitazona, la darglitazona, la troglitazona o el compuesto NC-2100. Son también descritos aquí los agonistas específicos del receptor PPAR gamma tales como el compuesto S26948, los compuestos derivados de la N-(2-benzoilfenil)-L-tirosina, los derivados FMOC, los compuestos 1,3-dicarbonilo que comprenden unos heterociclos 2(3H)benzazolónico, los compuestos de la familia de las sulfonilureas, los compuestos de la familia de los ácidos 2-benzoilaminobenzoicos sustituidos en la posición 5, el compuesto halofenato, los derivados de la familia de los indeno-N-óxidos, los antagonistas del receptor de la angiotensina de tipo 1 tales como el telmisartan, el irbesartan y el losartan. Ventajosamente, el agonista específico del receptor PPAR gamma es una tiazolinodiona, seleccionada de entre el grupo constituido por la rosiglitazona, la ciglitazona, la pioglitazona, la darglitazona y la troglitazona. Los compuestos ciglitazona y troglitazona pueden ser obtenidos en particular de Cayman Chemical (Ann Arbor, MI, USA). Los compuestos pioglitazona y rosiglitazona se pueden obtener de Sigma Chemical Co. (St Louis, MO, USA). La darglitazona se puede obtener de Medicinal Chemistry, AstraZeneca R&D (Molndal, Sweden).

65 Ventajosamente, cuando el agonista específico del receptor PPAR gamma es la orsiglitazona, la concentración en

rosiglitazona está comprendida entre 5 nM y 1000 nM, ventajosamente entre 10 nM y 500 nM, aún más ventajosamente entre 20 y 100 nM. También ventajosamente, cuando el agonista específico del receptor PPAR gamma es la pioglitazona, la concentración en pioglitazona está comprendida entre 0,2  $\mu$ M y 10  $\mu$ M, ventajosamente entre 0,4  $\mu$ M y 5  $\mu$ M, aún más ventajosamente entre 0,8  $\mu$ M y 2  $\mu$ M. También ventajosamente, cuando el agonista específico del receptor PPAR gamma es la ciglitazona, la concentración en ciglitazona está comprendida entre 0,5  $\mu$ M y 20  $\mu$ M, ventajosamente entre 1  $\mu$ M y 10  $\mu$ M, aún más ventajosamente entre 2  $\mu$ M y 4  $\mu$ M. Más ventajosamente, cuando el agonista específico del receptor PPAR gamma es la darglitazona, la concentración en darglitazona está comprendida entre 0,2  $\mu$ M y 20  $\mu$ M, ventajosamente entre 0,5  $\mu$ M y 10  $\mu$ M, aún más ventajosamente entre 1  $\mu$ M y 5  $\mu$ M. Aún más ventajosamente, cuando el agonista específico del receptor PPAR gamma es la troglitazona, la concentración en troglitazona está comprendida entre 0,2  $\mu$ M y 10  $\mu$ M, ventajosamente entre 0,5  $\mu$ M u 5  $\mu$ M, aún más ventajosamente entre 1  $\mu$ M y 4  $\mu$ M.

Las condiciones generales de cultivo utilizadas para la multiplicación y la diferenciación de la población celular hMADS son conocidas por el experto en la materia y se describen en particular en la solicitud WO 2004/013275, o bien en la parte Ejemplos de la presente solicitud de patente. El medio de cultivo utilizado para la diferenciación de la población celular hMADS se cambia regularmente, preferentemente cada dos días, antes de la utilización de células. Este medio no contiene ventajosamente suero, tal como suero de ternera fetal y se define químicamente.

La funcionalidad de la población de adipocitos marrones humanos según la invención se puede además verificar estimulando su actividad respiratoria con la ayuda de un agonista específico de un receptor beta-adrenérgico tal como el isoproterenol. Así, según un modo de realización preferido, el procedimiento de diferenciación de la población celular hMADS en una población de adipocitos marrones humanos según la presente invención, comprende además la verificación de la funcionalidad de la población de adipocitos marrones humanos obtenida, comprendiendo dicha verificación las etapas sucesivas siguientes:

- la estimulación de la actividad respiratoria de dicha población de adipocitos marrones humanos por un agonista específico de un receptor beta-adrenérgico seleccionado de entre el grupo constituido por el isoproterenol, la noradrenalina, la adrenalina, la dobutamina, la terbutalina, y el compuesto CL316243,
- la cuantificación de la expresión del gen que codifica UCP1 y/o del consumo de oxígeno, y
- la verificación de que dicha población es funcional cuando la expresión del gen que codifica UCP1 y/o el consumo de oxígeno aumenta con respecto a los obtenidos en ausencia de estimulación por dicho agonista específico de un receptor beta-adrenérgico.

Cuando la población es funcional, se observa una estimulación importante de la actividad respiratoria, tal como un aumento de al menos un 20%, preferentemente al menos un 40% con respecto a la ausencia de estimulación con el agonista específico de un receptor beta-adrenérgico. En comparación, no se observa ninguna estimulación cuando los adipocitos blancos son expuestos a un agonista específico de un receptor beta-adrenérgico.

Preferentemente, la expresión del gen que codifica UCP1 es de 1,5 a 4 veces superior con respecto a la obtenida en ausencia de estimulación por un agonista de un receptor beta-adrenérgico.

Ventajosamente, el agonista específico de un receptor beta-adrenérgico es el isoproterenol.

También ventajosamente, la concentración en agonista específico de un receptor beta-adrenérgico está comprendida entre 1 nM y 1000 nM, ventajosamente entre 1 nM y 500 nM, aún más ventajosamente entre 1 y 100 nM.

La funcionalidad de la población de adipocitos marrones humanos puede, por ejemplo, ser verificada cuantificando el consumo de oxígeno con la ayuda de un respirómetro. Tal técnica es bien conocida por el experto en la materia.

La funcionalidad de la población de adipocitos marrones humanos puede también ser verificada cuantificando la actividad desacoplante de dicha población. Esta cuantificación de la actividad desacoplante se puede realizar con la ayuda de un agente desacoplante tal como la carbonil cianido 3-clorofenilhidrazona (CCCP). Tal técnica es bien conocida por el experto en la materia.

Según otro aspecto, la presente invención tiene por objeto un procedimiento de conversión de una población de adipocitos blancos humanos en una población de adipocitos marrones humanos funcional tal como se define en la presente invención, que comprende la estimulación de dicha población de adipocitos blancos humanos por un agonista específico de PPAR gamma, siendo dicho agonista una tiazolinodiona, durante una duración comprendida entre 1 y 10 días, ventajosamente entre 1 y 6 días, aún más ventajosamente de 2 días.

La población de adipocitos blancos humanos es tal como se ha descrito anteriormente. El medio de cultivo utilizado para la conversión de la población de adipocitos blancos humanos es el mismo que el utilizado para la diferenciación

de las células hMADS. Asimismo, este medio se cambia regularmente, preferentemente cada dos días, antes de la utilización de las células.

El agonista específico del receptor PPAR gamma es tal como se ha definido anteriormente.

Ventajosamente, dicha tiazolinodiona se selecciona de entre el grupo constituido por la rosiglitazona, la ciglitazona, la pioglitazona, la darglitazona y la troglitazona.

Ventajosamente, cuando el agonista específico del receptor PPAR gamma es la rosiglitazona, la concentración en rosiglitazona está comprendida entre 5 nM y 1000 nM, ventajosamente entre 10 nM y 500 nM, aún más ventajosamente entre 20 y 100 nM. También ventajosamente, cuando el agonista específico del receptor PPAR gamma es la pioglitazona, la concentración en pioglitazona está comprendida entre 0,2 µM y 10 µM, ventajosamente entre 0,4 µM y 5 µM, aún más ventajosamente entre 0,8 µM y 2 µM. También ventajosamente, cuando el agonista específico del receptor PPAR gamma es la ciglitazona, la concentración en ciglitazona está comprendida entre 0,5 µM y 20 µM, ventajosamente entre 1 µM y 10 µM, aún más ventajosamente entre 2 µM y 4 µM. Más ventajosamente, cuando el agonista específico del receptor PPAR gamma es la darglitazona, la concentración en darglitazona está comprendida entre 0,2 µM y 20 µM, ventajosamente entre 0,5 µM y 10 µM, aún más ventajosamente entre 1 µM y 5 µM. Aún más ventajosamente, cuando el agonista específico del receptor PPAR gamma es la troglitazona, la concentración en troglitazona está comprendida entre 0,2 µM y 10 µM, ventajosamente entre 0,5 µM u 5 µM, aún más ventajosamente entre 1 µM y 4 µM.

En un modo de realización preferido, el procedimiento de conversión según la presente invención comprende además la verificación de la funcionalidad de la población de adipocitos marrones humanos obtenida después de la conversión de la población de adipocitos blancos humanos, comprendiendo dicha verificación las etapas sucesivas siguientes:

- estimular la actividad respiratoria de dicha población de adipocitos marrones humanos por un agonista específico de un receptor beta-adrenérgico seleccionado de entre el grupo constituido por el isoproterenol, la noradrenalina, la adrenalina, la dobutamina, la terbutalina y el compuesto CL31643,
- cuantificar la expresión del gen que codifica UCP1 y/o el consumo de oxígeno, y
- verificar que dicha población es funcional cuando la expresión del gen que codifica UCP1 y/o el consumo de oxígeno aumenta con respecto a los obtenidos en ausencia de estimulación por dicho agonista específico de un receptor beta-adrenérgico.

Preferentemente, la expresión del gen que codifica UCP1 es 1,5 a 4 veces superior con respecto a la obtenida en ausencia de estimulación por un agonista de un receptor beta-adrenérgico.

Ventajosamente, el agonista específico de un receptor beta-adrenérgico es el isoproterenol.

También ventajosamente, la concentración en agonista específico de un receptor beta-adrenérgico está comprendida entre 1 nM y 1000 nM, ventajosamente entre 1 nM y 500 nM, aún más ventajosamente entre 1 y 100 nM.

La presente invención describe también la población de adipocitos marrones humanos obtenida por el procedimiento de diferenciación o el procedimiento de conversión tal como se define en la presente invención.

Se describe también aquí la utilización de una población de adipocitos marrones humanos funcional, tal como se define según la presente invención, como modelo para identificar una molécula o una combinación de moléculas susceptibles de modular el peso corporal en un sujeto, ventajosamente para identificar una molécula o una combinación de moléculas susceptible de tratar el sobrepeso y/o la obesidad en un sujeto. Ventajosamente, el sujeto es un ser humano.

Ventajosamente, la presente invención describe un método de identificación de una molécula o combinación de moléculas susceptibles de actuar sobre la actividad respiratoria y/o la actividad desacoplante de una población de adipocitos marrones y/o modular el peso corporal de un sujeto, que comprende las etapas sucesivas siguientes:

- poner en contacto la población de adipocitos marrones humanos funcional según la presente invención con dicha molécula o combinación de moléculas,
- cuantificar la expresión del gen que codifica UCP1 y/o el consumo de oxígeno y/o de la actividad desacoplante de dicha población de adipocitos marrones humanos, y
- identificar dicha molécula o combinación de moléculas como siendo susceptible de actuar sobre la actividad

respiratoria y/o la actividad desacoplante de una población de adipocitos marrones y/o modular el peso corporal de un sujeto cuando la expresión del gen que codifica UCP1 y/o el consumo de oxígeno y/o la actividad desacoplante es significativamente diferente de la obtenida en ausencia de dicha molécula.

5 De manera ventajosa, cuando la expresión del gen que codifica UCP1 y/o el consumo de oxígeno y/o la actividad desacoplante es superior a la obtenida en ausencia de la molécula o combinación de moléculas, dicha molécula o combinación de moléculas es susceptible de aumentar la actividad respiratoria y/o la actividad desacoplante de una población de adipocitos marrones y/o tratar el sobrepeso y/o la obesidad en un sujeto.

10 También ventajosamente, la presente invención describe un método de identificación de una molécula o combinación de moléculas susceptible de favorecer la formación de adipocitos marrones humanos y/o tratar el sobrepeso y/o la obesidad en un sujeto, que comprende las etapas sucesivas siguientes:

- 15 a) llevar a cabo el procedimiento de diferenciación o de conversión, tal como se ha descrito anteriormente, con el fin de obtener una población de referencia de adipocitos marrones humanos funcional,
- b) poner en contacto una población de células hMADS con dicha molécula o combinación de moléculas,
- 20 c) identificar dicha molécula o combinación de moléculas como susceptible de favorecer la formación de adipocitos marrones humanos y/o tratar el sobrepeso y/o la obesidad en un sujeto cuando la población de células hMADS de la etapa b) expresa el fenotipo de la población de referencia de adipocitos marrones humanos funcional de la etapa a).

25 Se entiende por fenotipo de una población de adipocitos marrones humanos funcional según la presente invención el hecho de que dicha población exprese simultáneamente los genes que codifican las proteínas UCP1, CIDEA, CPT1B, Bcl2, Bax, PPAR alfa, PGC1 alfa, PGC1 beta y PRDM16 como las descritas anteriormente. También, dicha población posee una actividad respiratoria elevada, que puede ser estimulada por un agonista específico de un receptor beta-adrenérgico tal como el isoproterenol. Este fenotipo se puede determinar como se ha descrito anteriormente (inmunohuella, transferencia Nortehr, RT-PCR cuantitativa, respirómetro, etc.).

30 También ventajosamente, la presente invención describe un método de identificación de una molécula o combinación de moléculas susceptibles de favorecer la formación de adipocitos marrones humanos y/o tratar el sobrepeso y/o la obesidad en un sujeto, que comprende las etapas sucesivas siguientes:

- 35 - poner en contacto una población de adipocitos blancos humanos con dicha molécula o combinación de moléculas,
- identificar dicha molécula o combinación de moléculas como susceptible de favorecer la formación de adipocitos marrones humanos y/o tratar el sobrepeso y/o la obesidad en un sujeto cuando la población de adipocitos blancos humanos expresa el fenotipo de una población de adipocitos marrones humanos, tal como se define según la presente invención.
- 40

La población de adipocitos blancos humanos es tal como se ha definido anteriormente.

45 Los ejemplos y figuras siguientes permiten ilustrar la presente invención, sin limitar su alcance.

## Figuras

### Figura 1: Efecto de la rosiglitazona sobre la diferenciación adipocitaria de las células hMADS-2

50 La diferenciación adipocitaria de las células hMADS-2 se ha llevado a cabo según el protocolo descrito en la parte "Materiales y métodos". Se ha añadido la rosiglitazona a las concentraciones y días indicados. En el día 16, se ha realizado A) la fijación de las células y su coloración por aceite rojo (Oil red O), B) la medición de la actividad GPDH, y C) la determinación por RT-PCR cuantitativa de los niveles de ARNm PPAR $\gamma$ . Los resultados representan la media  $\pm$  SD de tres experimentos independientes realizados con diferentes series de células; el 100% corresponde (C) al valor obtenido en el día 16 en presencia de 500 nM de rosiglitazona.

### Figura 2: Efecto de la exposición a largo plazo de las células hMADS-2 a la rosiglitazona sobre la expresión de marcadores de adipocitos marrones

60 La diferenciación de las células hMADS-2 se ha realizado como se describe en la figura 1. En el día 16, los niveles de ARNm UCP1 (A), UCP2 (C), CIDEA (D) y CPT1B (E) se determinaron por RT-PCR cuantitativa. Los resultados representan la media  $\pm$ SD de tres experimentos independientes realizados con diferentes series de células; se expresan tomando para el 100% el valor obtenido en presencia de 500 nM rosiglitazona. Los niveles de la proteína UCP1 (B) se determinaron por inmunohuella sobre dos series diferentes de células utilizando TBP como estándar interno endógeno.

65

Figura 3: Expresión de los receptores  $\beta$ 3-adrenérgicos y estimulación de la expresión de UCP1 en respuesta a los agonistas  $\beta$ -adrenérgicos

5 la diferenciación adipocitaria de las células hMADS-2 se realizó en presencia de 100nM rosiglitazona en los días indicados y los niveles de ARNm se determinaron en el día 17 por RT-PCR cuantitativa. (B,C) la diferenciación se obtuvo en presencia de 100nM rosiglitazona entre los días 3 y 16, en ausencia o en presencia durante las 6 últimas horas de agonistas  $\beta$ -adrenérgicos en las concentraciones indicadas. Los resultados representan la media  $\pm$  SD de tres (A) y dos (B) experimentos independientes realizados con diferentes series de células; se expresan tomando para el 100% los valores obtenidos o bien durante el tratamiento entre los días 3 y 9 (A) o bien en ausencia de agonistas  $\beta$ -adrenérgicos (B,C).

Figura 4: Inducción de un fenotipo marrón a partir de adipocitos blancos dependiente de la activación de PPAR $\gamma$

15 En un primer tiempo, las células hMADS-2 se diferenciaron en adipocitos blancos con 100nM rosiglitazona presente entre los días 3 y 9. Una vez eliminado, el ligando se vuelve a añadir o no en el día 14 durante los días siguientes en las concentraciones indicadas. En el día 16, se determinaron los niveles de ARNm de UCP1, de CIDEA y de CPT1B por RT-PCR cuantitativa (A) y se determinó la cantidad de proteína UCP1 por inmunohuella después de la exposición entre los días 14 y 16 a los ligandos específicos de PPARs (B).

20 Los resultados se expresan en factor de estimulación, tomando como 1 los valores obtenidos en el día 16 después de la exposición a 100nM rosiglitazona entre los días 3 y 9; los valores representan las medias  $\pm$  SD de dos experimentos independientes realizados con diferentes series de células.

25 Figura 5: Efecto del tratamiento a largo plazo por la rosiglitazona sobre las actividades respiratoria y desacoplante de los adipocitos blancos y marrones

30 Las células hMADS-2 se indujeron a diferenciarse en presencia de 100nM rosiglitazona o bien durante los días 3 y 9 para obtener unos adipocitos blancos, o bien durante los días 3 y 20 para obtener unos adipocitos marrones, o bien finalmente durante los días 3-9 seguido de los días 16-20. En el día 20, el consumo de oxígeno (A), el desacoplamiento de la fosforilación oxidativa (B) y la estimulación del consumo de oxígeno por el isoproterenol (C) se midieron según el protocolo descrito en "Materiales y métodos". Los resultados representan las medias  $\pm$  SD de cuatro experimentos independientes realizados con diferentes series de células. \*P<0,05 por comparación con las células tratadas entre los días 3 y 9 en presencia de 100 nM rosiglitazona.

35 Figura 6: Expresión génica de factores y co-factores transcripcionales en función de la adquisición de un fenotipo blanco o marrón

40 La diferenciación adipocitaria de las células hMADS-2 se realizó en presencia o bien de rosiglitazona a 100nM (A), o bien en las concentraciones indicadas (B). Los niveles de ARNm PRDM16, PGC1 $\alpha$ , PGC1 $\beta$  y PPAR $\alpha$  se determinaron por RT-PCR cuantitativa en el día 16 (A) y en el día 17 (B). Los resultados representan las medias  $\pm$  SD de tres experimentos independientes realizados con diferentes series de células; se expresan tomando para el 100% los valores obtenidos en presencia de 100nM (A) o de 500nM rosiglitazona (B).

45 Figura 7: Expresión de genes asociados a la apoptosis en función de la adquisición de un fenotipo blanco o marrón

50 La diferenciación adipocitaria de las células hMADS-2 se realizó en presencia de 100nM rosiglitazona. En el día 16, los niveles de ARNm Bcl2 y Bax se determinaron por RT-PCR cuantitativa. Los resultados representan las medias  $\pm$  SD de tres experimentos independientes realizados con diferentes series de células; se expresan tomando para el 100% los valores obtenidos durante el tratamiento por la rosiglitazona entre los días 3 y 9. \* P $\leq$ 0,05.

Figura 8: Efecto de la rosiglitazona sobre la diferenciación adipocitaria de las células hMADS-1

55 Las células hMADS-1 se diferenciaron según el protocolo descrito en la figura 1. La exposición a la rosiglitazona se realizó en las concentraciones y en los días indicados. En el día 16, las células se fijaron y colorearon con aceite rojo (Oil Red O) (A), se determinó la actividad GPDH (B) así como los niveles de ARNm UCP1 y CIDEA por RT-PCR cuantitativa (C). Los resultados representan las medias  $\pm$  SD de dos experimentos independientes realizados con diferentes series de células y se expresan (C) tomado para el 100% el valor obtenido en presencia de 100nM rosiglitazona en el día 16.

60 **Ejemplos**

65 Abreviaturas: células hMADS ("human multipotent adipose-derived stem cells"), células madre humanas multipotentes derivadas del tejido adiposo; WAT ("white adipose tissue"), tejido adiposo blanco; BAT ("brown adipose tissue"), tejido adiposo marrón; PPAR ("peroxisome proliferator-activated receptor"), receptor activado por los inductores de la proliferación de los peroxisomas; PPRE ("peroxisome proliferator-responsive element"), elemento de

5 respuesta de los inductores de la proliferación de los peroxisomas; UCP1 (“uncoupling protein 1”), proteína desacoplante 1; UCP2 (“uncoupling protein 2”), proteína desacoplante 2; PGC-1 $\alpha$  ( $\beta$ ) (“PPAR $\gamma$  co-activator  $\alpha$ ( $\beta$ )”), co-activador  $\alpha$  ( $\beta$ ) del receptor nuclear PPAR gamma; CtBP-1 (“C-terminal-binding protein-1”), proteína 1 de unión C-terminal; AR (“adrenergic receptor”), receptor adrenérgico; CIDEA (“cell death-inducing DFF45-like effector A”), efector A de tipo DFF-45 que induce la muerte celular; NAIP (“neuronal apoptosis inhibitory protein”), proteína de inhibición de la apoptosis neuronal; CTP-1B (“carnitine palmitoyltransferase-1B”), carnitina palmitoiltransferasa-1B; PKA (“protein kinase A”), proteína quinasa A; T3, 3,5,3'-tri-yodotironina; TBP (“TATA-box binding protein”), proteína de unión a la caja TATA; PRDM16 (“PR-domain zinc finger protein 16”), proteína 16 que contiene un dominio PR en dedo de zinc; Bax (“Bcl-2-associated X protein”), proteína X asociada a Bcl-2; Bcl-2 (“B-cell CLL/lymphoma-2”), linfoma-2/CLL a células B.

## I. Materiales y métodos

15 *Cultivo celular.* Se han descrito el establecimiento como la caracterización de la multipotencia y de la auto-renovación de las células hMADS (Rodríguez, A.M., *et al.*, Biochem Biophys Res Commun, 2004. 315(2): p. 255-63; Rodríguez, A.M., *et al.*, J Exp Med, 2005. 201(9): p. 1397-405; Zaragosi, L.E. *et al.*, Stem Cells, 2006. 24(11): p. 2412-9; Elabd, C., *et al.*, Biochem Biophys Res Commun, 2007. 361(2): p. 342-8). Las células del linaje hMADS-2 se han establecido a partir de tejido adiposo que proviene de la región púbica de un donante de 5 años de edad; se utilizaron entre los pasos 16 a 35 (35 a 100 duplicaciones de la población celular). Las células se inocularon a una densidad de 4,500 células/cm<sup>2</sup> en un medio DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) enriquecido mediante un 10% de suero fetal de ternera, 2,5ng /ml hFGF<sub>2</sub>, 60 $\mu$ g/ml penicilina y 50 $\mu$ g/ml estreptomycin. Después de un cambio de medio cada dos días, cuando las células llegan a la confluencia, se elimina hFGF<sub>2</sub> y se inducen las células a diferenciarse dos días después, definiendo el día 0 de diferenciación. El medio de diferenciación adipocitaria está constituido de DMEM/H12 (1/1:v/v) enriquecido en 10 $\mu$ g/ml transferina, 0,85 $\mu$ M insulina, 0,2nM T<sub>3</sub>, 1 $\mu$ M dexametasona (DEX) y 500 $\mu$ M isobutilmetilxantina (IBMX). Tres días después, se cambia el medio (DEX y IBMX omis) y se añade la rosiglitazona a las concentraciones y en los días indicados. El medio se cambia después cada dos días antes de la utilización de las células. La determinación de la actividad glicerol-3 fosfato deshidrogenasa (GPDH) y de la coloración de los lípidos por aceite rojo (Oil Red O) se han descrito anteriormente (Negrel, R. *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA, 1978. 75(12): p. 6054-8; Bezy, O., *et al.*, J Biol Chem, 2005. 280(12): p. 11432-8).

35 *Purificación y análisis de los ARNs:* Se han descrito la extracción de los ARNs, la utilización de la transcriptasa inversa y la determinación de los niveles de ARNm por RT-PCR cuantitativa en tiempo real (Zaragosi, L.E. *et al.*, Stem Cells, 2006. 24(11): p. 2412-9; Elabd, C., *et al.*, Biochem Biophys Res Commun, 2007. 361(2): p. 342-8; Bezy, O., *et al.*, J Biol Chem, 2005. 280(12): p. 11432-8). La expresión de los genes de interés se ha normalizado con respecto a la del gen TBP y cuantificada con la ayuda del método comparativo  $\Delta$ Ct. Las secuencias de los cebadores oligonucleotídicos, obtenidas con la ayuda del Primer Express Software (Perkin Elmer Life Sciences), se describen en la Tabla 1 siguiente.

Tabla 1: Secuencia de los cebadores oligonucleotídicos para el análisis de la expresión génica

|                | Cebador sentido                          | Cebador anti-sentido                   | Nº de acceso |
|----------------|--|--|--------------|
| FABP4          | TGTGCAGAAAATGGGATGGAAA SEC ID nº 1       | CAACGTCCCTTGGCTTATGCT SEC ID nº 2      | NM_001442    |
| UCP-1          | GTGTGCCCAACTGTGCAATG SEC ID nº 3         | CCAGGATCCAAGTCGCAAGA SEC ID nº 4       | NM_021833    |
| UCP-2          | GGCCTCACCGTGAGACCCTTAC SEC ID nº 5       | TGGCCTTGAACCCCAACCAT SEC ID nº 6       | NM_003355    |
| PPARY          | AGCCTCATGAAGAGCCCTTCCA SEC ID nº 7       | TCCGGAAGAAAACCCCTTGA SEC ID nº 8       | NM_005037    |
| PPAR $\alpha$  | GGCGAACGATTCGACTCAAG SEC ID nº 9         | TCCAAAACGAATCGCGTTGT SEC ID nº 10      | NM_032644    |
| PGC-1 $\alpha$ | CTGTGTACACACCCAAATCCTTAT SEC ID nº 11    | TGTGTCGAGAAAAGGACCTTGA SEC ID nº 12    | NM_013261    |
| PGC-1b         | GGGAGAAGTACGGCTTCATCAC SEC ID nº 13      | CAGCGCCCTTTGTCAAAGAG SEC ID nº 14      | NM_133263    |
| PRDM16         | GAAACTTTATTGCCAATAGTGAGATGA SEC ID nº 15 | CCGTCCACGATCTGCATGT SEC ID nº 16       | NM_022114    |
| $\beta$ 3-AR   | GCCCTTCGCCCTCCAACATG SEC ID nº 17        | AGCATCACGAGAAGAGGAAGGT SEC ID nº 18    | NM_000025    |
| CIDEA          | GGCAGGTTACGTGTGGATA SEC ID nº 19         | GAAACACAGTGTGGCTCAAGA SEC ID nº 20     | NM_001279    |
| CPT1B          | AAACAGTGCCAGGGGTC SEC ID nº 21           | CGTCTGCCAACGCCCTTG SEC ID nº 22        | NM_152246    |
| Bax            | TGCCTCAGGATGCGTCCACCAA SEC ID nº 23      | CGGCAATCATCCTCTGCAGCTCCAT SEC ID nº 24 | NM_004324    |
| Bcl-2          | GCCCCCGTTGCTTTTCC SEC ID nº 25           | CCGGTTATCGTACCCCTGTTCTC SEC ID nº 26   | NM_000657    |
| TBP            | CACGAAACCAGGCACACTGATT SEC ID nº 27      | TTTTCTTGCTGCCAGTCTGGAC SEC ID nº 28    | NM_003194    |

*Análisis por inmunohuella:* Los lisados celulares totales se analizan por inmunohuella, tal como se ha descrito anteriormente (Bezy, O., *et al.*, J Biol Chem, 2005. 280(12): p. 11432-8). Los anticuerpos primarios obtenidos en el conejo anti-UCP1 humano y anti-TBP son unos productos de Santa-Cruz (Sant-Cruz, USA) y los anticuerpos secundarios (conjugados con la peroxidasa de rábano picante) de los productos de Promega (Charbonnières, Francia). El sistema "Enhanced ChemiLuminescence" (Millipore, Saint-Quentin-Yvelines, Francia) se ha utilizado para la detección.

*Determinación del consumo de oxígeno:* El consumo de oxígeno se ha medido con la ayuda de un respirómetro de 2 cámaras de inyección equipado de un termostato Peltier, de electrodos de tipo Clark y de agitadores magnéticos integrados (Oxygraphe Oroboros, Innsbrück, Austria). Las mediciones se han realizado a 37°C con una agitación permanente en un volumen de 2 ml de medio DMEM/F12 (1/1: v/v) que contiene un 10% de suero fetal de ternera. Antes de cada medición, el medio presente en las cámaras se ha equilibrado con aire durante 30 min, después las células recientemente tripsinadas se han transferido en este medio. Después de alcanzar un estado respiratorio estacionario, el ATP sintasa se ha inhibido con la ayuda de oligomicina (0,25-0,5mg/l) y la actividad respiratoria de las células se titula en presencia del agente desacoplante carbonilo cinida 3-clorofenilhidrazona (CCCP) a las concentraciones óptimas de 1-2 µM. La cadena respiratoria se ha bloqueado por 1 µg/ml de Antimicina A. Se ha calculado el consumo de oxígeno con la ayuda del programa DataGraph (Oroboros Software). La actividad respiratoria basal corresponde al consumo de oxígeno sensible a la Antimicina A. La estimulación de la actividad respiratoria se ha efectuado en presencia de 1 µM isoproterenol añadido extemporáneamente en la cámara de inyección, siendo las mediciones realizadas como se ha descrito anteriormente.

*Análisis estadístico:* Los datos son expresados en valores medios  $\pm$  SD y son analizados por el ensayo t de Student. Las diferencias son consideradas como significativas para  $P \leq 0,05$ .

## II. Resultados

### El UCP1 y los marcadores adipocitarios marrones se expresan durante la diferenciación de las células hMADS

Como se ha descrito anteriormente (Rodríguez, A.M., *et al.*, Biochem Biophys Res Commun, 2004. 315(2): p. 255-63), la activación de PPAR $\gamma$  es necesaria para la diferenciación adipocitaria de las células hMADS-2 (figura 1A). El tratamiento de las células durante 6 días por unas concentraciones crecientes de rosiglitazona, entre los días 3 y 9, conduce a una acumulación lipídica y a la expresión de los genes GPDH y PPAR $\gamma$ . Un tratamiento de una semana suplementaria no aporta ningún cambio en la expresión de los genes GPDH y PPAR $\gamma$ . En el día 16, 20nM rosiglitazona son suficientes para inducir una respuesta máxima, de acuerdo con la afinidad de PPAR $\gamma$  para este ligando (figura 1A-C). El conjunto de los resultados subraya que una exposición de 6 días de las células hMADS-2 a la rosiglitazona permite la expresión máxima de los marcadores claves de los adipocitos blancos. Por el contrario, tal exposición entre los días 3 y 9 conduce sólo a una expresión muy baja del ARNm y de la proteína UCP1. Sin embargo, una exposición a 20nM entre los días 3 y 16 conlleva su fuerte expresión (figura 2A,B). A la inversa que UCP1, una fuerte expresión del ARNm UCP2 ya se observa en el día 9; aumenta debido a una exposición más larga (figura 2C) y se detecta entonces la proteína UCP2 (B. Miroux y C. Ricquier, comunicación personal). Estos resultados sugieren que la duración del tratamiento por la rosiglitazona permite modular la expresión del gen UCP1. Asimismo, la expresión del gen CIDEA, detallada como estrechamente asociada a la del UCP1, aumenta (figura 2D) (Zhou, Z., *et al.*, Nat Genet, 2003. 35(1): p. 49-56). Comparados con los adipocitos blancos, los adipocitos marrones presentan una mitocondriogénesis muy importante (Wilson-Fritch, L., *et al.*, J Clin Invest, 2004. 114(9): p. 1281-9). Efectivamente, el contenido en ARNm que codifica la carnitina palmitoiltransferasa mitocondrial (CPT1B) incrementa altamente cuando las células hMADS-2 cambian del fenotipo blanco al fenotipo marrón (figura 2E). Inesperadamente, los niveles de PPAR $\alpha$ , PGC-1 $\alpha$ , PGC-1 $\beta$  y PRDM16 son similares en los adipocitos que expresan los fenotipos blanco o marrón (figura 6). Se sabe que los adipocitos marrones de roedores son más susceptibles a la apoptosis que los adipocitos blancos *in vitro* como *in vivo*. Estos adipocitos expresan al mismo tiempo la proteína anti-apoptótica Bcl-2 y la proteína pro-apoptótica Bax (Briscini *et al.*, FEBS Lett 1998. 431, 80-84; Lindquist and Rehnmark, J Biol Chem 1998. 273, 30147-30156; Nisoli *et al.*, Cell Death Differ 2006. 13, 2154-2156). Al contrario del caso de los roedores, los adipocitos blancos humanos presentan una susceptibilidad importante a la apoptosis que parece estar relacionada con la baja expresión de los genes anti-apoptóticos Bcl-2 y NAIP (Papineau *et al.*, Metabolism 2003. 52, 987-992). Inesperadamente, el paso de las células hMADS del fenotipo blanco al fenotipo marrón se acompaña de un aumento de la expresión del gen anti-apoptótico Bcl-2 y de una disminución de la del gen pro-apoptótico Bax, implicando la relación Bcl-2/Bax que pasa de 1 a 3,7 (figura 7), según las especies, un patrón de expresión diferente de los genes asociados a la apoptosis. En la medida en la que UCP1 (figura 2), el receptor  $\beta$ 3-adrenérgico (figura 3A) y el receptor  $\beta$ 2-AR (resultado no mostrado) son expresados cuando las células hMADS-2 son expuestas a la rosiglitazona entre los días 3 y 16, se ha analizado la respuesta funcional a los  $\beta$ -agonistas. Como lo indican las figuras 3B y 3C, la expresión del ARNm UCP1 y la de la proteína UCP1 son significativamente aumentadas después de una estimulación durante 6h por el isoproterenol, un pan-agonista de los receptores  $\beta$ , y por el compuesto CL316243, un agonista  $\beta$ 3 selectivo, para unas concentraciones de 10 a 100nM. En resumen, una activación crónica prolongada de PPAR $\gamma$  conlleva la expresión de UCP1 y la adquisición de una respuesta funcional a los agonistas  $\beta$ .

La regulación de la expresión de UCP1 se produce en las células hMADS previamente diferenciadas en adipocitos blancos

Los experimentos anteriores no permiten saber si un tratamiento de largo plazo de las células hMADS es necesario para la adquisición de un fenotipo marrón, o si una breve exposición a la rosiglitazona de las células hMADS ya diferenciadas en adipocitos blancos permite su transdiferenciación. Con este objetivo, las células hMADS-2 se han expuesto previamente a la rosiglitazona entre los días 3 y 9, se ha eliminado el ligando y después se ha vuelto a añadir entre los días 14 y 16. Los resultados muestran que este tratamiento de dos días de los adipocitos blancos es suficiente para estimular la expresión de los genes UCP1, CIDEA y CPT1B (figura 4A). Este efecto es específico de PPAR $\gamma$ , no induciendo la activación de PPAR $\beta/\delta$  y de PPAR $\alpha$  por los ligandos específicos Wy14643 y L165041, respectivamente, la expresión de la proteína UCP1. La sustitución de la rosiglitazona por unos ácidos grasos poliinsaturados como activadores/ligandos de los PPARs (ácidos araquidónico, eicosapentaenoico y docosahexaenoico presentes a 10 $\mu$ M) se muestra sin efecto sobre la expresión del gen UCP1 (resultados no mostrados). El conjunto de estas observaciones demuestra que una activación específica de PPAR $\gamma$  durante un breve periodo de tiempo es suficiente para que los adipocitos blancos adquieran un fenotipo de adipocitos marrones. Los efectos de la rosiglitazona sobre la expresión de UCP1 no están restringidos a las células hMADS-2; se observan también con las células hMADS-1 y hMADS-3 (Rodríguez, A.M., *et al.*, J Exp Med, 2005. 201(9): p. 1397-405), que se habían establecido respectivamente a partir del tejido adiposo de la región umbilical de una donante de 31 meses y de tejido adiposo pre-púbico de un donante de 4 meses (figura 8 y resultados no mostrados).

Consumo de oxígeno y desacoplamiento respiratorio de las células hMADS diferenciadas en adipocitos blancos y marrones

Una característica principal de los adipocitos marrones es una actividad respiratoria intensa y un desacoplamiento importante de la fosforilación oxidativa. El consumo de oxígeno, determinado con la ayuda de un electrodo oxígeno-sensible (Cannon, B. y J. Nedergaard, *Physiol Rev*, 2004. 84(1): p. 277-359) ha permitido medir las velocidades relativas de respiración. Los resultados muestran el efecto importante de un tratamiento a largo plazo por la rosiglitazona sobre las actividades respiratoria total y desacoplada. Después de 20 días de exposición crónica que permiten la adquisición del fenotipo marrón, comparados con los valores obtenidos con las células hMADS-2 expuestas entre los días 3 y 9 y que expresan el fenotipo blanco, estas dos actividades aumentan de 3 veces y 2,5 veces, respectivamente (figura 5, A y B). Cuando las células hMADS-2 se diferencian previamente en adipocitos blancos, y después se tratan ulteriormente entre los días 16 y 20 por la rosiglitazona, el aumento de las actividades respiratoria total y desacoplada es menor, pero sigue siendo muy notable (figura 5, A y B). Una estimulación importante del consumo de oxígeno por un agonista específico de los receptores  $\beta$ -adrenérgico tal como el isoproterenol, se observa también durante la adquisición de un fenotipo marrón (figura 5C). Estos resultados muestran que la adquisición del fenotipo marrón por las células hMADS-2 se acompaña, como se esperaba, *vía* UCP1, de un aumento del consumo de oxígeno, de la actividad desacoplante y de una estimulación de la respiración por un agonista específico de los receptores  $\beta$ -adrenérgicos, lo que demuestra que los adipocitos marrones obtenidos a partir de las células hMADS son funcionales.

### III. Discusión

La técnica por emisión de positrones con la ayuda de fluorodeoxiglucosa ha permitido demostrar recientemente, en el ser humano adulto sano, a presencia de tejido adiposo marrón activo en los sitios distintos del tejido adiposo blanco (Nedergaard, J., T. *et al.*, *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2007. 293(2): p. E444-52). Así, contrariamente al consenso que ha prevalido durante estas últimas décadas, estas observaciones importantes sugieren la posibilidad de estimular la actividad metabólica de BAT a fin de modular los gastos energéticos en el hombre. En efecto, el tejido adiposo marrón juega un papel importante en los roedores en la termogénesis adaptativa, su ablación por transgénesis conduce a la obesidad y se observa una disfunción en los roedores obesos (Cannon, B. y J. Nedergaard, *Physiol Rev*, 2004. 84(1): p. 277-359; Lowell, B.B., *et al.*, *Nature*, 1993. 366(6457): p. 740-2), mientras que en el hombre, el papel de BAT sigue siendo controvertido (Cinti, S., *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, 2006. 16(8): p. 569-74). En el plano farmacológico, teniendo en cuenta el conjunto de estas observaciones, el desarrollo de un modelo de adipocitos marrones humanos debería por lo tanto resultar de suma importancia.

Nuestros resultados muestran por primera vez que de las células madre multipotentes humanas, establecidas a partir de tejido adiposo de jóvenes donantes y ya conocidos por diferenciarse en adipocitos blancos (Rodríguez, A.M., *et al.*, *Biochem Biophys Res Commun*, 2004. 315(2): p. 255-63; Rodríguez, A.M., *et al.*, *J Exp Med*, 2005. 201(9): p. 1397-405), son también capaces de dar lugar a unos adipocitos marrones.

En el plano biológico, nuestros resultados permiten adelantar la hipótesis según la cual las células hMADS son de las células madre inmaduras cuyo linaje se situaría secuencia arriba de los linajes blanco y marrón. Una vez introducidas en el linaje marrón, las células hMADS presentan todas las características de los adipocitos marrones de roedores; expresan los genes UCP1, CIDEA, PGC-1 $\alpha$ , PGC-1 $\beta$  y PRDM16, así como los tres miembros de la familia de los PPARs. Crucialmente, la adquisición del fenotipo marrón se acompaña de un aumento importante de las actividades respiratorias y desacoplante. La modulación positiva de la expresión de UCP1 por el isoproterenol y por el compuesto CL316243 demuestra que la vía de señalización generada por los receptores  $\beta$ -adrenérgicos, en

particular los receptores  $\beta_3$ , es también funcional en estas células.

Hasta ahora, la presencia y la función de los receptores  $\beta_3$ -adrenérgicos en el hombre siguen siendo controvertidas (Lafontan, M. y M. Berlan, *Trends Pharmacol Sci*, 2003. 24(6): p. 276-83). Así, los adipocitos marrones de los jóvenes babuinos expresan débilmente estos receptores pero no se observa ninguna lipólisis en respuesta a cuatro agonistas  $\beta_3$ -adrenérgicos (Viguerie-Bascands, N., *et al.*, *J Clin Endocrinol Metab*, 1996. 81(1): p. 368-75). Por otro lado, unos adipocitos marrones humanos inmortalizados por transgénesis y que expresan unos receptores  $\beta_3$ -adrenérgicos muestran sólo una baja actividad lipolítica en respuesta al CGP12177A, un agonista parcial  $\beta_3$ , y estos receptores aparecen sólo débilmente acoplados a la adenilato ciclasa (Zilberfarb, V., *et al.*, *J Cell Sci*, 1997. 110 (Pt 7): p. 801-7; Jockers, R., *et al.*, *Endocrinology*, 1998. 139(6): p. 2676-84). En los dos casos, no se ha generado ninguna estimulación de la expresión de UCP1 y ninguna actividad respiratoria desacoplante en respuesta a un agonista específico  $\beta_3$ , contrariamente a los resultados de nuestros trabajos. Además, no se ha generado ninguna estimulación de la actividad respiratoria por un agonista específico de los receptores específicos de los receptores  $\beta$ -adrenérgicos.

La rosiglitazona pertenece a la familia de las tiazolidinedionas, una clase de moléculas insulino-sensibilizantes utilizadas en el tratamiento del diabetes de tipo 2 (Olefsky, J.M. y A.R. Saltiel, *Trends Endocrinol Metab*, 2000. 11(9): p. 362-8). Promete la diferenciación adipocitaria terminal activando específicamente PPAR $\gamma$  (Rodríguez, A.M., *et al.*, *Biochem Biophys Res Commun*, 2004. 315(2): p. 255-63; Tai, T.A., *et al.*, *J Biol Chem*, 1996. 271(47): p. 29909-14; Forman, B.M., *et al.*, *Cell*, 1995. 83(5): p. 803-12). La activación de PPAR $\gamma$  se produce en los preadipocitos blancos como en los preadipocitos marrones y conduce a su diferenciación en adipocitos blancos y marrones, respectivamente (Nedergaard, J., *et al.*, *Biochim Biophys Acta*, 2005. 1740(2): p. 293-304; Petrovic, N. *et al.*, *Am J Physiol Endocrinol Metab*, (20 de mayo de 2008). doi:10.1152/ajpendo.00035.2008).

Notablemente, a pesar de la presencia de rosiglitazona y a pesar del hecho de que la activación de la vía PKA por el "cóctel" DEX/IBMX se muestra indispensable durante los tres primeros días de la diferenciación, este efecto estimulador se revela insuficiente y sólo se produce una diferenciación en adipocitos blancos. Después de la eliminación de DEX/IBMX del medio de cultivo, es llamativo constatar que la adquisición de un fenotipo de adipocito marrón por las células hMADS depende entonces sólo de la duración de la activación de PPAR $\gamma$  por la rosiglitazona, mientras que incluso PGC-1 $\alpha$ , PGC-1 $\beta$  y PRDM16 están ya totalmente expresados en las células que expresan el fenotipo blanco.

Se sabe que en el ratón, PRDM16 induce en los adipocitos blancos la expresión de UCP1, sin embargo la activación de PPAR $\gamma$  es necesaria para la expresión de CIDEA y de los componentes mitocondriales (Seale, P., *et al.*, *Cell Metab*, 2007. 6(1): p. 38-54). Nuestros resultados están en acuerdo con estas observaciones y con la presencia de un elemento de respuesta a los PPARs en el promotor del gen CIDEA (Viswakarma, N., *et al.*, *J Biol Chem*, 2007. 282(25): p. 18613-24). Sin embargo, no se excluye que, además de la expresión de PRDM16, PGC-1 $\alpha$  y PGC-1 $\beta$ , una exposición prolongada a la rosiglitazona induzca otros eventos moleculares que serían también necesarios para la plena adquisición de un fenotipo marrón. Un análisis transcriptómico diferencial entre las células hMADS tratadas brevemente o ampliamente con rosiglitazona debería aportar unos elementos de respuesta a esta hipótesis.

La rosiglitazona, al normalizar la glucemia y la insulinemia, conlleva un aumento del peso corporal tanto en el animal como en numerosos pacientes (Carmona, M.C., *et al.*, *Int J Obes (Lond)*, 2005. 29(7): p. 864-71; Goldberg, R.B., *Curr Opin Lipidol*, 2007. 18(4): p. 435-42; Home, P.D., *et al.*, *Diabet Med*, 2007. 24(6): p. 626-34; Joosen, A.M., *et al.*, *Diabetes Metab Res Rev*, 2006. 22(3): p. 204-10). Nuestros resultados no excluyen la posibilidad de que, en el ser humano, pueda también, aunque de manera insuficiente, aumentar la actividad de BAT observada en una proporción importante de individuos sanos (Nedergaard, J. *et al.*, *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2007. 293(2): p. E444-52; Cypess, AM *et al.*, *N. Engl. J. Med.* 2009. 360: p. 1509-17; Saito, M. *et al.*, *Diabetes* 2009. Publish Ahead of Print, Online April 28; van Marken Lichtenbelt, W *et al.*, *N. Engl. J. Med.* 2009. 390: p. 1500-08; Virtanen, KA *et al.*, *N. Engl. J. Med.* 2009. 360: p. 1518-1525).

La contribución de BAT a los gastos energéticos, en el caso de la termogénesis no-temblorosa o inducida por un régimen hipercalórico, está bien establecida en los roedores. En el hombre, las diferencias de ganancia de peso observadas entre los individuos parecen estar relacionados con las diferencias en su capacidad para aumentar los gastos energéticos en respuesta a las ingestas (Lowell, B.B. y E.S. Bachman, *J Biol Chem*, 2003. 278(32): p. 29385-8), y la masa de tejido adiposo marrón es inversamente proporcional a la masa del tejido adiposo blanco (Saito, M. *et al.*, *Diabetes* 2009. Publish Ahead of Print, Online April 28; Virtanen, KA *et al.*, *N. Engl. J. Med.* 2009. 360: p. 1518-1525). Si estas observaciones son relacionadas con capacidades diferentes entre los individuos para aumentar la masa y/o la actividad de BAT, nuestro modelo de adipocitos marrones humanos debería permitir el cribado de moléculas capaces de aumentar la formación y las funciones de BAT, en particular estimulando la expresión de PRDM16 y las capacidades respiratoria y desacoplante de las células. Entre las posibilidades, se podría considerar un aumento de la expresión de UCP1 gracias a la doble activación de la vía PKA a través de los receptores  $\beta$ -adrenérgicos y a través del receptor TGR5 activado por las sales biliares (Watanabe, M., *et al.*, *Nature*, 2006. 439(7075): p. 484-9).

#### IV. Resultados complementarios

Los materiales y métodos son los indicados en el punto I de la parte Ejemplos anterior.

- 5 1- Unos trabajos recientes han mostrado en el ratón i) la existencia de una firma miogénica de los adipocitos marrones distinta de la de los adipocitos blancos (Timmons *et al.*, 2007; Seale *et al.*, 2008, Nature 454:961-967) y ii) la posibilidad de generar unos adipocitos marrones a partir de precursores blancos por tratamiento por la Bone Morphogenic Protein 7 (BMP7) (Tseng *et al.*, 2008. Nature 454:1000-1004) o por transgénesis (Tiraby, C *et al.*, J. Biol; Chem. 2003. 278: p. 33370-76).
- 10 Se ha podido mostrar que nuestras células humanas hMADS no poseen firma muscular ya que no expresan el gen *Myf5* ni durante la fase de proliferación ni durante y después de su diferenciación en células adiposas como en células óseas.
- 15 Además, el tratamiento por la única BMP7 de las células hMADS no permite su diferenciación en adipocitos en ausencia de la rosiglitazona, sino que conlleva por el contrario un bajo aumento de la expresión de la proteína UCP-1 sobre las células previamente diferenciadas en adipocitos blancos.
- 20 2- Los efectos de la rosiglitazona sobre la diferenciación de las células hMADS en adipocitos blancos y marrones se miden por el receptor nuclear PPAR $\gamma$ . En efecto, la adición al medio de diferenciación de un antagonista de PPAR $\gamma$ , el compuesto GW 9662, impide por un lado la diferenciación de las células hMADS en adipocitos, y no permite por otro lado la expresión del gen UCP-1 en las células previamente diferenciadas en adipocitos blancos.
- 25 3- Comparados con los adipocitos blancos, los adipocitos marrones presentan una mitocondriogénesis muy importante. Se ha mostrado que el contenido en ARNm que codifica la carnitina palmitoiltransferasa mitocondrial (CTP1B) incrementa en gran medida cuando las células hMADS-2 cambian del fenotipo blanco al fenotipo marrón. Unos resultados recientes muestran que la actividad Citocroma C oxidasa (marcador de la membrana interna mitocondrial) aumenta también en los adipocitos hMADS marrones comparado con los adipocitos blancos, reforzando así nuestras observaciones sobre el aumento de la mitocondriogénesis durante la transición del fenotipo blanco hacia el fenotipo marrón.
- 30 4- En los roedores, los ácidos biliares que provienen de la reabsorción intestinal se unen a un receptor acoplado a las proteínas G (TGR5) situado sobre la membrana plásmica de los adipocitos marrones. La producción de AMPc estimula la expresión de una yodotironina desiodinasa de tipo 2 que aumenta las concentraciones intracelulares de T3. Éstas estimulan entonces el desacoplamiento mitocondrial por medio de UCP y la disipación de energía en forma de calor (Watanabe *et al.*, 2006). En el hombre, tal sistema no se ha descrito jamás. Las células hMADS expresan el gen TGR5 durante la diferenciación adipocitaria que permite así considerar unos estudios farmacológicos con la ayuda de ligandos agonistas del receptor TGR5 sobre el desacoplamiento de la respiración.
- 35 40

#### Referencias bibliográficas

- 45 Ailhaud, G., Grimaldi, P., y Negrel, R. (1992). Cellular and molecular aspects of adipose tissue development. *Annu Rev Nutr* 12, 207-233.
- 50 Bezy, O., Elabd, C., Cochet, O., Petersen, R.K., Kristiansen, K., Dani, C., Ailhaud, G., y Amri, E.Z. (2005). Delta-interacting protein A, a new inhibitory partner of CCAAT/enhancer-binding protein beta, implicated in adipocito differentiation. *J Biol Chem* 280, 11432-11438.
- Bogacka, I., Xie, H., Bray, G.A., y Smith, S.R. (2005). Pioglitazona induces mitochondrial biogenesis in human subcutaneous adipose tissue in vivo. *Diabetes* 54, 1392-1399.
- 55 Briscini, L., Tonello, C., Dioni, L., Carruba, M.O., y Nisoli, E. (1998). Bcl-2 and Bax are involved in the sympathetic protection of brown adipocitos from obesity-linked apoptosis. *FEBS Lett* 431, 80-84.
- Cannon, B., y Nedergaard, J. (2004). Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol Rev* 84, 277-359.
- 60 Carmona, M.C., Louche, K., Nibbelink, M., Prunet, B., Bross, A., Desbazeille, M., Dacquet, C., Renard, P., Casteilla, L., y Penicaud, L. (2005). Fenofibrate prevents Rosiglitazona-induced body weight gain in ob/ob mice. *Int J Obes (Lond)* 29, 864-871.
- 65 Casteilla, L., Champigny, O., Bouillaud, F., Robelin, J., y Ricquier, D. (1989). Sequential changes in the expresión of mitochondrial protein mRNA during the development of brown adipose tissue in bovine and ovine species. Sudden occurrence of uncoupling protein mRNA during embryogenesis and its disappearance after birth. *Biochem J* 257,

665-671.

Casteilla, L., Forest, C., Robelin, J., Ricquier, D., Lombet, A., y Ailhaud, G. (1987). Characterization of mitochondrial-uncoupling protein in bovine fetus and newborn calf. *Am J Physiol* 252, E627-636.

Casteilla, L., Nougues, J., Reyne, Y., y Ricquier, D. (1991). Differentiation of ovine brown adipocito precursor cells in a chemically defined serum-free medium. Importance of glucocorticoids and age of animals. *Eur J Biochem* 198, 195-199.

Cinti, S. (2006). The role of brown adipose tissue in human obesity. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 16, 569-574.

Cousin, B., Cinti, S., Morroni, M., Raimbault, S., Ricquier, D., Penicaud, L., y Casteilla, L. (1992). Occurrence of brown adipocitos in rat white adipose tissue: molecular and morphological characterization. *J Cell Sci* 103 (Pt 4), 931-942.

Cypess, A.M., Lehman, S., Williams, G., Tal, I., Rodman, D., Goldfine, A.B., Kuo, F.C., Palmer, E.L., Tseng, Y.H., Doria, A., Kolodny, G.M., y Kahn, C.R. (2009). Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans. *N Engl J Med* 360, 1509-1517.

Elabd, C., Chiellini, C., Massoudi, A., Cochet, O., Zaragosi, L.E., Trojani, C., Michiels, J.F., Weiss, P., Carle, G., Rochet, N., *et al.* (2007). Human adipose tissue-derived multipotent stem cells differentiate in vitro and in vivo into osteocyte-like cells. *Biochem Biophys Res Commun* 361, 342-348.

Foellmi-Adams, L.A., Wyse, B.M., Herron, D., Nedergaard, J., y Kletzien, R.F. (1996). Induction of uncoupling protein in brown adipose tissue. Synergy between norepinephrine and pioglitazona, an insulin-sensitizing agent. *Biochem Pharmacol* 52, 693-701.

Forman, B.M., Tontonoz, P., Chen, J., Brun, R.P., Spiegelman, B.M., y Evans, R.M. (1995). 15-Deoxy-delta 12, 14-prostaglandin J2 is a ligand for the adipocito determination factor PPAR gamma. *Cell* 83, 803-812.

Fukui, Y., Masui, S., Osada, S., Umesono, K., y Motojima, K. (2000). A new thiazolidinedione, NC-2100, which is a weak PPAR-gamma activator, exhibits potent antidiabetic effects and induces uncoupling protein 1 in white adipose tissue of KKAY obese mice. *Diabetes* 49, 759-767.

Garruti, G., y Ricquier, D. (1992). Analysis of uncoupling protein and its mRNA in adipose tissue deposits of adult humans. *Int J Obes Relat Metab Disord* 16, 383-390.

Goldberg, R.B. (2007). The new clinical trials with thiazolidinediones - DREAM, ADOPT, and CHICAGO: promises fulfilled? *Curr Opin Lipidol* 18, 435-442.

Home, P.D., Jones, N.P., Pocock, S.J., Beck-Nielsen, H., Gomis, R., Hanefeld, M., Komajda, M., y Curtis, P. (2007). Rosiglitazona RECORD study: glucose control outcomes at 18 months. *Diabet Med* 24, 626-634.

Jockers, R., Issad, T., Zilberfarb, V., de Coppet, P., Marullo, S., y Strosberg, A.D. (1998). Desensitization of the beta-adrenergic response in human brown adipocitos. *Endocrinology* 139, 2676-2684.

Joosen, A.M., Bakker, A.H., Gering, M.J., y Westerterp, K.R. (2006). The effect of the PPARgamma ligand rosiglitazona on energy balance regulation. *Diabetes Metab Res Rev* 22, 204-210.

Kelly, L.J., Vicario, P.P., Thompson, G.M., Candelore, M.R., Doebber, T.W., Ventre, J., Wu, M.S., Meurer, R., Forrest, M.J., Conner, M.W., *et al.* (1998). Peroxisome proliferator-activated receptors gamma and alfa mediate in vivo regulation of uncoupling protein (UCP-1, UCP-2, UCP-3) gene expresión. *Endocrinology* 139, 4920-4927.

Lafontan, M., y Berlan, M. (2003). Do regional differences in adipocito biology provide new pathophysiological insights? *Trends Pharmacol Sci* 24, 276-283.

Lindquist, J.M., y Rehnmark, S. (1998). Ambient temperature regulation of apoptosis in brown adipose tissue. Erk1/2 promotes norepinephrine-dependent cell survival. *J Biol Chem* 273, 30147-30156.

Lowell, B.B., y Bachman, E.S. (2003). Beta-Adrenergic receptors, diet-induced thermogenesis, and obesity. *J Biol Chem* 278, 29385-29388.

Lowell, B.B., V, S.S., Hamann, A., Lawitts, J.A., Himms-Hagen, J., Boyer, B.B., Kozak, L.P., y Flier, J.S. (1993). Development of obesity in transgenic mice after genetic ablation of brown adipose tissue. *Nature* 366, 740-742.

Mercer, S.W., y Trayhurn, P. (1986). Effects of ciglitazona on insulin resistance and thermogenic responsiveness to

- acute cold in brown adipose tissue of genetically obese (ob/ob) mice. *FEBS Lett* 195, 12-16.
- Moulin, K., Truel, N., Andre, M., Arnauld, E., Nibbelink, M., Cousin, B., Dani, C., Penicaud, L., y Casteilla, L. (2001). Emergence during development of the white-adipocito cell phenotype is independent of the brown-adipocito cell phenotype. *Biochem J* 356, 659-664.
- Nedergaard, J., Bengtsson, T., y Cannon, B. (2007). Unexpected evidence for active brown adipose tissue in adult humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 293, E444-452.
- Nedergaard, J., Petrovic, N., Lindgren, E.M., Jacobsson, A., y Cannon, B. (2005). PPARgamma in the control of brown adipocito differentiation. *Biochim Biophys Acta* 1740, 293-304.
- Negrel, R., Grimaldi, P., y Ailhaud, G. (1978). Establishment of preadipocito clonal line from epididymal fat pad of ob/ob mouse that responds to insulin and to lipolytic hormones. *Proc Natl Acad Sci U S A* 75, 6054-6058.
- Nisoli, E., Cardile, A., Bulbarelli, A., Tedesco, L., Bracale, R., Cozzi, V., Morroni, M., Cinti, S., Valerio, A., y Carruba, M.O. (2006). White adipocitos are less prone to apoptotic stimuli than brown adipocitos in rodent. *Cell Death Differ* 13, 2154-2156.
- Olefsky, J.M., y Saltiel, A.R. (2000). PPAR gamma and the treatment of insulin resistance. *Trends Endocrinol Metab* 11, 362-368.
- Papineau, D., Gagnon, A., y Sorisky, A. (2003). Apoptosis of human abdominal preadipocitos before and after differentiation into adipocitos in culture. *Metabolism* 52, 987-992.
- Petrovic, N., Shabalina, I.G., Timmons, J.A., Cannon, B., y Nedergaard, J. (2008). Thermogenically Competent Non-Adrenergic Recruitment in Brown Predipocytes by a PPAR{gamma} Agonist. *Am J Physiol Endocrinol Metab*.
- Puigserver, P., Rhee, J., Lin, J., Wu, Z., Yoon, J.C., Zhang, C.Y., Krauss, S., Mootha, V.K., Lowell, B.B., y Spiegelman, B.M. (2001). Cytokine stimulation of energy expenditure through p38 MAP kinase activation of PPARgamma coactivator-1. *Mol Cell* 8, 971-982.
- Rodriguez, A.M., Elabd, C., Deltiel, F., Astier, J., Vernochet, C., Saint-Marc, P., Guesnet, J., Guezennec, A., Amri, E.Z., Dani, C., *et al.* (2004). Adipocito differentiation of multipotent cells established from human adipose tissue. *Biochem Biophys Res Commun* 315, 255-263.
- Rodriguez, A.M., Pisani, D., Dechesne, C.A., Turc-Carel, C., Kurzenne, J.Y., Wdziekonski, B., Villageois, A., Bagnis, C., Breittmayer, J.P., Groux, H., *et al.* (2005). Transplantation of a multipotent cell population from human adipose tissue induces dystrophin expresión in the immunocompetent mdx mouse. *J Exp Med* 201, 1397-1405.
- Rosen, E.D., y Spiegelman, B.M. (2006). Adipocitos as regulators of energy balance and glucose homeostasis. *Nature* 444, 847-853.
- Saito, M., Okamatsu-Ogura, Y., Matsushita, M., Watanabe, K., Yoneshiro, T., Nio-Kobayashi, J., Iwanaga, T., Miyagawa, M., Kameya, T., Nakada, K., Kawai, Y., y Tsujisaki, M. (2009). High Incidence of Metabolically Active Brown Adipose Tissue in Healthy Adult Humans: Effects of Cold Exposure and Adiposity. *Diabetes*.
- Seale, P., Kajimura, S., Yang, W., Chin, S., Rohas, L.M., Uldry, M., Tavernier, G., Langin, D., y Spiegelman, B.M. (2007). Transcriptional Control of Brown Fat Determination by PRDM16. *Cell Metab* 6, 38-54.
- Seale, P., Bjork, B., Yang, W., Kajimura, S., Chin, S., Kuang, S., Scime, A., Devarakonda, S., Conroe, H.M., Erdjument-Bromage, H., *et al.* 2008. PRDM16 controls a brown fat/skeletal muscle switch. *Nature* 454:961-967.
- Tai, T.A., Jennermann, C., Brown, K.K., Oliver, B.B., MacGinnitie, M.A., Wilkison, W.O., Brown, H.R., Lehmann, J.M., Kliewer, S.A., Morris, D.C., *et al.* (1996). Activation of the nuclear receptor peroxisome proliferator-activated receptor gamma promotes brown adipocito differentiation. *J Biol Chem* 271, 29909-29914.
- Timmons, J.A., Wennmalm, K., Larsson, O., Walden, T.B., Lassmann, T., Petrovic, N., Hamilton, D.L., Gimeno, R.E., Wahlestedt, C., Baar, K., *et al.* (2007). Myogenic gene expresión signature establishes that brown and white adipocitos originate from distinct cell lineages. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 4401-4406.
- Tiraby, C., y Langin, D. (2003). Conversion from white to brown adipocitos: a strategy for the control of fat mass? *Trends Endocrinol Metab* 14, 439-441.
- Tiraby, C., Tavernier, G., Lefort, C., Larrouy, D., Bouillaud, F., Ricquier, D., y Langin, D. (2003). Acquirement of brown fat cell features by human white adipocitos. *J Biol Chem* 278, 33370-33376.

- 5 Tseng, Y.H., Kokkotou, E., Schulz, T.J., Huang, T.L., Winnay, J.N., Taniguchi, C.M., Tran, T.T., Suzuki, R., Espinoza, D.O., Yamamoto, Y., *et al.* (2008). New role of bone morphogenetic protein 7 in brown adipogenesis and energy expenditure. *Nature* 454:1000-1004.
- Uldry, M., Yang, W., St-Pierre, J., Lin, J., Seale, P., y Spiegelman, B.M. (2006). Complementary action of the PGC-1 coactivators in mitochondrial biogenesis and brown fat differentiation. *Cell Metab* 3, 333-341.
- 10 van Marken Lichtenbelt, W.D., Vanhommerig, J.W., Smulders, N.M., Drossaerts, J.M., Kemerink, G.J., Bouvy, N.D., Schrauwen, P., y Teule, G.J. (2009). Cold-activated brown adipose tissue in healthy men. *N Engl J Med* 360, 1500-1508.
- Viguerie-Bascands, N., Bousquet-Melou, A., Galitzky, J., Larrouy, D., Ricquier, D., Berlan, M., y Casteilla, L. (1996). Evidence for numerous brown adipocytes lacking functional beta 3-adrenoceptors in fat pads from nonhuman primates. *J Clin Endocrinol Metab* 81, 368-375.
- 15 Virtanen, K.A., Lidell, M.E., Orava, J., Heglind, M., Westergren, R., Niemi, T., Taittonen, M., Laine, J., Savisto, N.J., Enerback, S., y Nuutila, P. (2009). Functional brown adipose tissue in healthy adults. *N Engl J Med* 360, 1518-1525.
- 20 Viswakarma, N., Yu, S., Naik, S., Kashireddy, P., Matsumoto, K., Sarkar, J., Surapureddy, S., Jia, Y., Rao, M.S., y Reddy, J.K. (2007). Transcriptional regulation of Cidea, mitochondrial cell death-inducing DNA fragmentation factor alfa-like effector A, in mouse liver by peroxisome proliferator-activated receptor alfa and gamma. *J Biol Chem* 282, 18613-18624.
- 25 Watanabe, M., Houten, S.M., Matakai, C., Christoffolete, M.A., Kim, B.W., Sato, H., Messaddeq, N., Harney, J.W., Ezaki, O., Kodama, T., *et al.* (2006). Bile acids induce energy expenditure by promoting intracellular thyroid hormone activation. *Nature* 439, 484-489.
- 30 Wilson-Fritch, L., Nicoloso, S., Chouinard, M., Lazar, M.A., Chui, P.C., Leszyk, J., Straubhaar, J., Czech, M.P., y Corvera, S. (2004). Mitochondrial remodeling in adipose tissue associated with obesity and treatment with rosiglitazone. *J Clin Invest* 114, 1281-1289.
- Xue, B., Coulter, A., Rim, J.S., Koza, R.A., y Kozak, L.P. (2005). Transcriptional synergy and the regulation of Ucp1 during brown adipocyte induction in white fat depots. *Mol Cell Biol* 25, 8311-8322.
- 35 Zaragosi, L.E., Ailhaud, G., y Dani, C. (2006). Autocrine fibroblast growth factor 2 signaling is critical for self-renewal of human multipotent adipose-derived stem cells. *Stem Cells* 24, 2412-2419.
- Zhou, Z., Yon Toh, S., Chen, Z., Guo, K., Ng, C.P., Ponniah, S., Lin, S.C., Hong, W., y Li, P. (2003). Cidea-deficient mice have lean phenotype and are resistant to obesity. *Nat Genet* 35, 49-56.
- 40 Zilberfarb, V., Pietri-Rouxel, F., Jockers, R., Krief, S., Delouis, C., Issad, T., y Strosberg, A.D. (1997). Human immortalized brown adipocytes express functional beta3-adrenoceptor coupled to lipolysis. *J Cell Sci* 110 (Pt 7), 801-807.

45 **Listado de secuencias**

- <110> CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (CNRS) AILHAUD, Gérard AMRI, Ez-Zoubir DANI, Christian ELABD, Christian
- 50 <120> Linaje establecido de adipocitos marrones humanos y procedimiento de diferenciación a partir de un linaje de células hMADS
- <130> 354865
- 55 <150> FR0854140  
<151> 2008-06-23
- <160> 28
- 60 <170> PatentIn version 3.3
- <210> 1  
<211> 21  
65 <212> ADN  
<213> Secuencia artificial

5 <220>  
 <223> cebador sentido FABP4  
  
 <400> 1  
 tgtgcagaaa tgggatggaa a 21  
  
 10 <210> 2  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 15 <220>  
 <223> cebador antisentido FABP4  
  
 <400> 2  
 caacgtccct tggcttatgc t 21  
 20  
 <210> 3  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 25  
 <220>  
 <223> cebador sentido UCP-1  
  
 <400> 3  
 gtgtgccc aa ctgtgcaatg 20  
 30  
 <210> 4  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 35  
 <220>  
 <223> cebador antisentido UCP-1  
  
 <400> 4  
 ccaggatcca agtcgcaaga 20  
 40  
 <210> 5  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 45  
 <220>  
 <223> cebador sentido UCP-2  
 50  
 <400> 5  
 ggcctcaccg tgagacctta c 21  
  
 <210> 6  
 <211> 19  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 55  
 <220>  
 <223> cebador antisentido UCP-2  
 60  
 <400> 6  
 tggccttgaa cccaacat 19  
  
 <210> 7  
 <211> 21  
 65

<212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 5 <223> cebador sentido PPAR gamma  
  
 <400> 7  
 agcctcatga agagcctcc a 21  
  
 10 <210> 8  
 <211> 19  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 15 <220>  
 <223> cebador antisentido PPAR gamma  
  
 <400> 8  
 20 tccggaagaa acccttgca 19  
  
 <210> 9  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 25  
 <220>  
 <223> cebador sentido PPAR alfa  
  
 <400> 9  
 30 ggcgaacgat tcgactcaag 20  
  
 <210> 10  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 35 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> cebador antisentido PPAR alfa  
  
 <400> 10  
 40 tccaaaacga atcgcgttgt 20  
  
 <210> 11  
 <211> 24  
 45 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> cebador sentido PGC-1 alfa  
 50  
 <400> 11  
 ctgtgcacc acccaatcc ttat 24  
  
 <210> 12  
 55 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 60 <223> cebador antisentido PGC-1 alfa  
  
 <400> 12  
 tgtgtcgaga aaaggacctt ga 22  
  
 65 <210> 13  
 <211> 22

<212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 5 <223> cebador sentido PGC-1 beta  
  
 <400> 13  
 gcgagaagta cggcttcac ac 22  
  
 10 <210> 14  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 15 <220>  
 <223> cebador antisentido PGC-1 beta  
  
 <400> 14  
 20 cagcgcctt tgcaaagag 20  
  
 <210> 15  
 <211> 27  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 25  
 <220>  
 <223> cebador sentido PRDM16  
  
 <400> 15  
 30 gaaactttat tgccaatagt gagatga 27  
  
 <210> 16  
 <211> 19  
 <212> ADN  
 35 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> cebador antisentido PRDM16  
  
 <400> 16  
 40 ccgtccacga tctgcatg 19  
  
 <210> 17  
 <211> 18  
 45 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> cebador sentido beta 3-AR  
 50  
 <400> 17  
 gccttcgcct ccaacatg 18  
  
 <210> 18  
 <211> 22  
 55 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 60 <223> cebador antisentido beta 3-AR  
  
 <400> 18  
 agcatcacga gaagaggaag gt 22  
  
 65 <210> 19  
 <211> 20

<212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 5 <223> cebador sentido CIDEA  
  
 <400> 19  
 gccaggttca cgtgtggata 20  
  
 10 <210> 20  
 <211> 23  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 15 <220>  
 <223> cebador antisentido CIDEA  
  
 <400> 20  
 20 gaaacacagt gtttggtca aga 23  
  
 <210> 21  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 25  
 <220>  
 <223> cebador sentido CPT1B  
  
 <400> 21  
 30 aaacagtgcc aggcggtc 18  
  
 <210> 22  
 <211> 17  
 <212> ADN  
 35 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> cebador antisentido CPT1B  
  
 <400> 22  
 40 cgtctgcca cgccttg 17  
  
 <210> 23  
 <211> 22  
 45 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> cebador sentido Bax  
 50  
 <400> 23  
 tgcctcagga tgcgtccacc aa 22  
  
 <210> 24  
 55 <211> 25  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 60 <223> cebador antisentido Bax  
  
 <400> 24  
 cggcaatcat cctctgcagc tccat 25  
  
 65 <210> 25  
 <211> 17

# ES 2 622 068 T3

<212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 5 <223> cebador sentido Bcl-2  
  
 <400> 25  
 gcccccgttg cttttcc 17  
  
 10 <210> 26  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 15 <220>  
 <223> cebador antisentido Bcl-2  
  
 <400> 26  
 ccggttatcg taccctgttc tc 22  
 20  
 <210> 27  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 25  
 <220>  
 <223> cebador sentido TBP  
  
 <400> 27  
 30 cacgaaccac ggcactgatt 20  
  
 <210> 28  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 35 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> cebador antisentido TBP  
  
 <400> 28  
 40 ttttctgct gccagtctgg ac 22

## REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de diferenciación de una población de células madre humanas multipotentes derivadas del tejido adiposo (células hMADS) en una población de adipocitos marrones humanos funcional, que comprende la estimulación de dichas células hMADS por un agonista específico del receptor PPAR gamma, siendo dicho agonista una tiazolinediona, y llevándose a cabo esta estimulación:
- o bien durante un periodo de una duración comprendida entre 10 y 30 días,
  - o bien (i) durante un primer periodo de diferenciación de las células hMADS en adipocitos blancos de una duración comprendida entre 2 y 9 días, (ii) estando dicho primer periodo seguido de un segundo periodo de una duración comprendida entre 2 y 10 días durante la cual se detiene la estimulación, (iii) estando dicho segundo periodo seguido de un tercer periodo de estimulación de una duración comprendida entre 1 y 10 días.
2. Procedimiento de diferenciación según la reivindicación 1, en el que dicha tiazolinediona se selecciona de entre el grupo constituido por la rosiglitazona, la ciglitazona, la pioglitazona, la darglitazona y la troglitazona.
3. Procedimiento de diferenciación según la reivindicación 2, en el que la concentración en agonista específica del receptor PPAR gamma está comprendida entre 5 nM y 1000 nM cuando el agonista es la rosiglitazona, entre 0,2 µM y 10 µM cuando el agonista es la pioglitazona, entre 0,5 µM y 20 µM cuando el agonista es la ciglitazona, entre 0,2 y 20 µM cuando el agonista es la darglitazona y entre 0,2 y 10 µM cuando el agonista es la troglitazona.
4. Procedimiento de diferenciación según una de las reivindicaciones 1 a 3, que además comprende la verificación de la funcionalidad de la población de adipocitos marrones humanos obtenida después de la diferenciación de la población de células hMADS, comprendiendo dicha verificación las etapas sucesivas siguientes:
- estimular la actividad respiratoria de dicha población de adipocitos marrones humanos por un agonista específico de un receptor beta-adrenérgico seleccionado de entre el grupo constituido por isoproterenol, noradrenalina, adrenalina, dobutamina, terbutalina y el compuesto CL316243,
  - cuantificar la expresión del gen que codifica UCP1 y/o el consumo de oxígeno, y
  - verificar que dicha población es funcional cuando la expresión del gen que codifica UCP1 y/o el consumo de oxígeno es aumentado con respecto al obtenido en ausencia de estimulación por dicho agonista específico de un receptor beta-adrenérgico.
5. Procedimiento de diferenciación según la reivindicación 4, en el que el agonista específico de un receptor beta-adrenérgico es el isoproterenol.
6. Procedimiento de diferenciación según la reivindicación 4 o 5, en el que la concentración en agonista específico de un receptor beta-adrenérgico está comprendida entre 1 nM y 1000 nM.
7. Procedimiento de conversión de una población de adipocitos blancos humanos en una población de adipocitos marrones humanos funcional, que comprende la estimulación de dicha población de adipocitos blancos humanos por un agonista específico de PPAR gamma durante una duración comprendida entre 1 y 10 días, siendo dicho agonista una tiazolinediona.
8. Procedimiento de conversión según la reivindicación 7, en el que dicha tiazolinediona se selecciona de entre el grupo constituido por la rosiglitazona, la ciglitazona, la pioglitazona, la darglitazona y la troglitazona.
9. Procedimiento de conversión según la reivindicación 8, en el que la concentración en agonista específico del receptor PPAR gamma está comprendida entre 5 nM y 1000 nM cuando el agonista es la rosiglitazona, entre 0,2 µM y 10 µM cuando el agonista es la pioglitazona, entre 0,5 µM y 20 µM cuando el agonista es la ciglitazona, entre 0,2 y 20 µM cuando el agonista es la darglitazona y entre 0,2 y 10 µM cuando el agonista es la troglitazona.
10. Procedimiento de conversión según una de las reivindicaciones 7 a 9, que además comprende la verificación de la funcionalidad de la población de adipocitos marrones humanos obtenida después de la conversión de la población de adipocitos blancos humanos, comprendiendo dicha verificación las etapas sucesivas siguientes:
- estimular la actividad respiratoria de dicha población de adipocitos marrones humanos por un agonista específico de un receptor beta-adrenérgico seleccionado de entre el grupo constituido por isoproterenol, noradrenalina, adrenalina, dobutamina, terbutalina y el compuesto CL316243,
  - cuantificar la expresión del gen que codifica UCP1 y/o del consumo de oxígeno, y

- verificar que dicha población es funcional cuando la expresión del gen que codifica UCP1 y/o el consumo de oxígeno es aumentado con respecto al obtenido en ausencia de estimulación por dicho agonista específico de un receptor beta-adrenérgico.
- 5 11. Procedimiento de conversión según la reivindicación 10, en el que el agonista específico de un receptor beta-adrenérgico es el isoproterenol.
12. Procedimiento de conversión según la reivindicación 10 u 11, en el que la concentración en agonista específico de un receptor beta-adrenérgico está comprendido entre 1 nM y 1000 nM.
- 10 13. Método de identificación de una molécula o combinación de moléculas susceptible de favorecer la formación de adipocitos marrones humanos y/o de tratar el sobrepeso y/o la obesidad en un sujeto, que comprende las etapas sucesivas siguientes:
- 15 a) llevar a cabo el procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, de manera que se obtenga una población de referencia de adipocitos marrones humanos funcional,
- b) poner en contacto una población de células hMADS con dicha molécula o combinación de moléculas,
- 20 c) identificar dicha molécula o combinación de moléculas como siendo susceptible de favorecer la formación de adipocitos marrones humanos y/o de tratar el sobrepeso y/o la obesidad en un sujeto cuando la población de células hMADS de la etapa b) expresa el fenotipo de la población de referencia de adipocitos marrones humanos funcional de la etapa a).

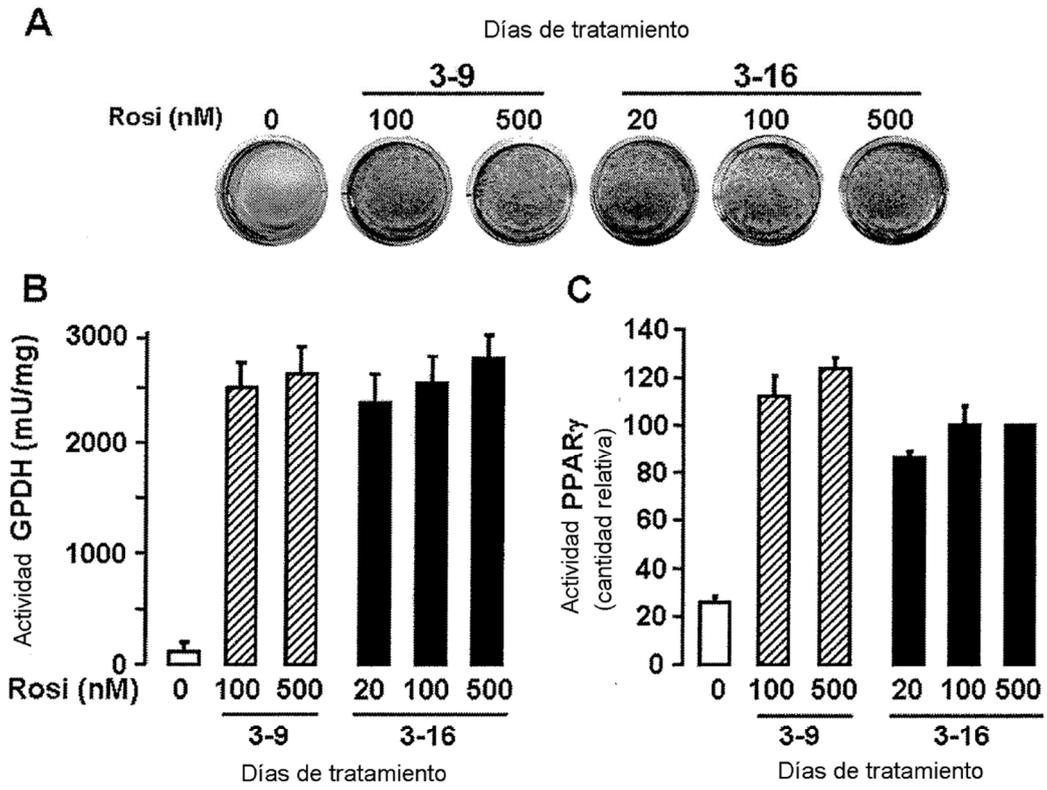


Figura 1

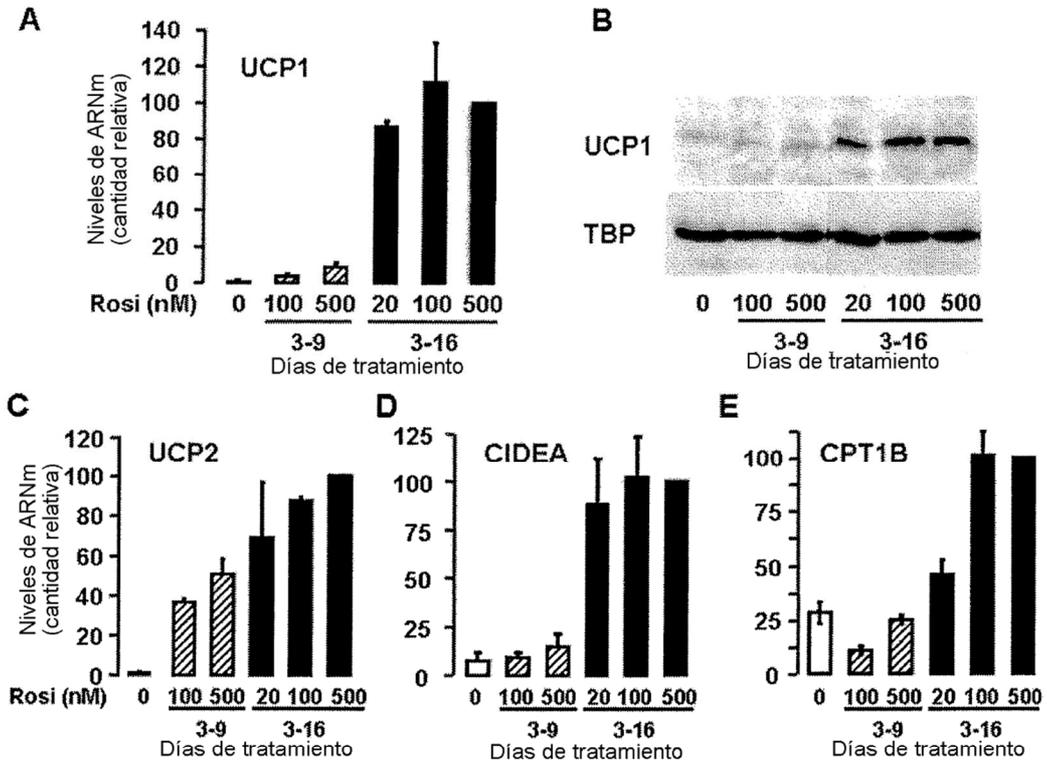


Figura 2

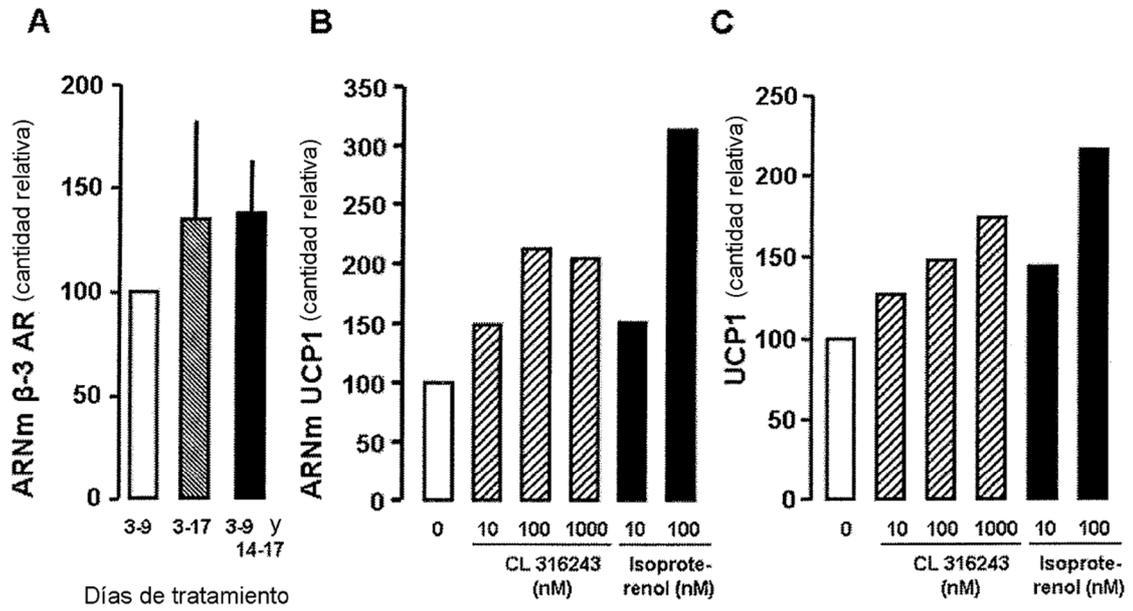


Figura 3

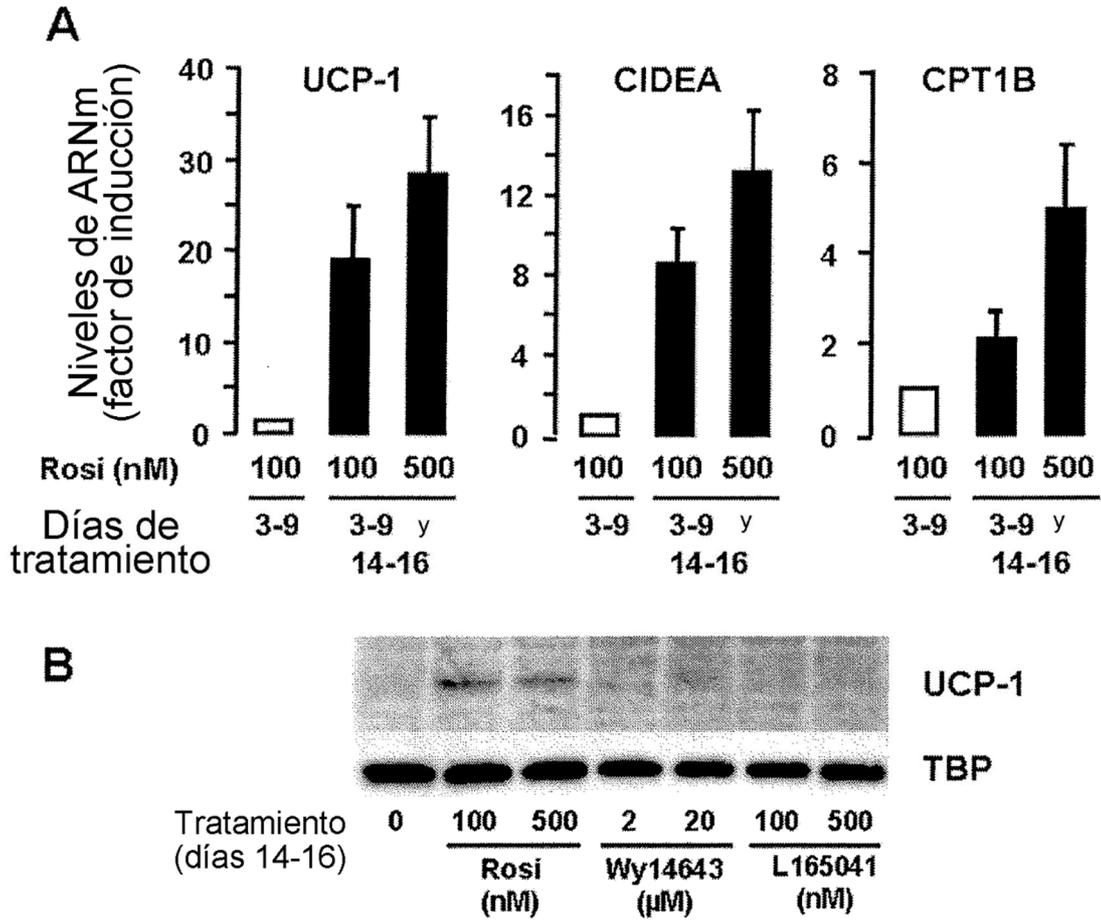


Figura 4

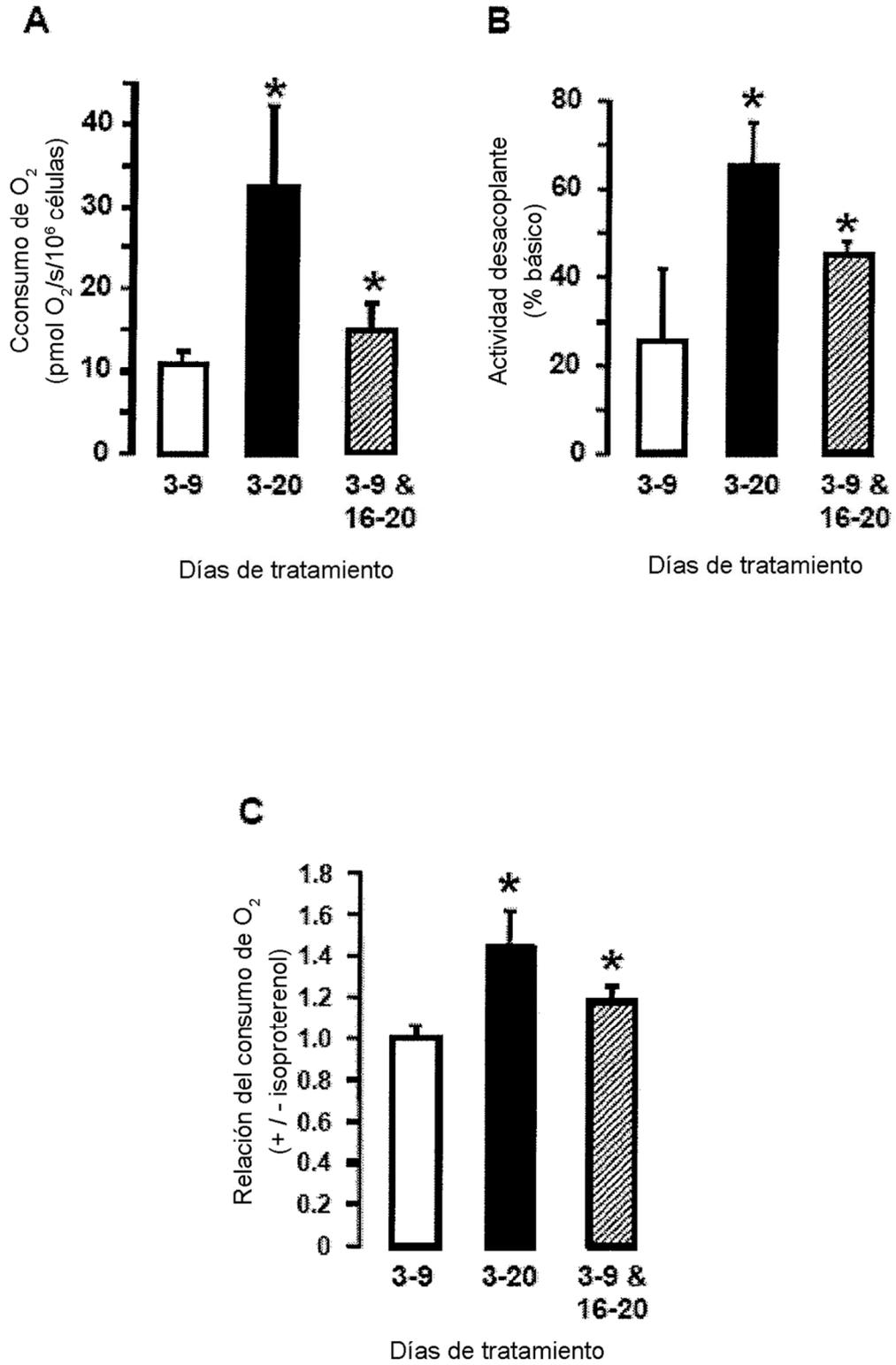


Figura 5

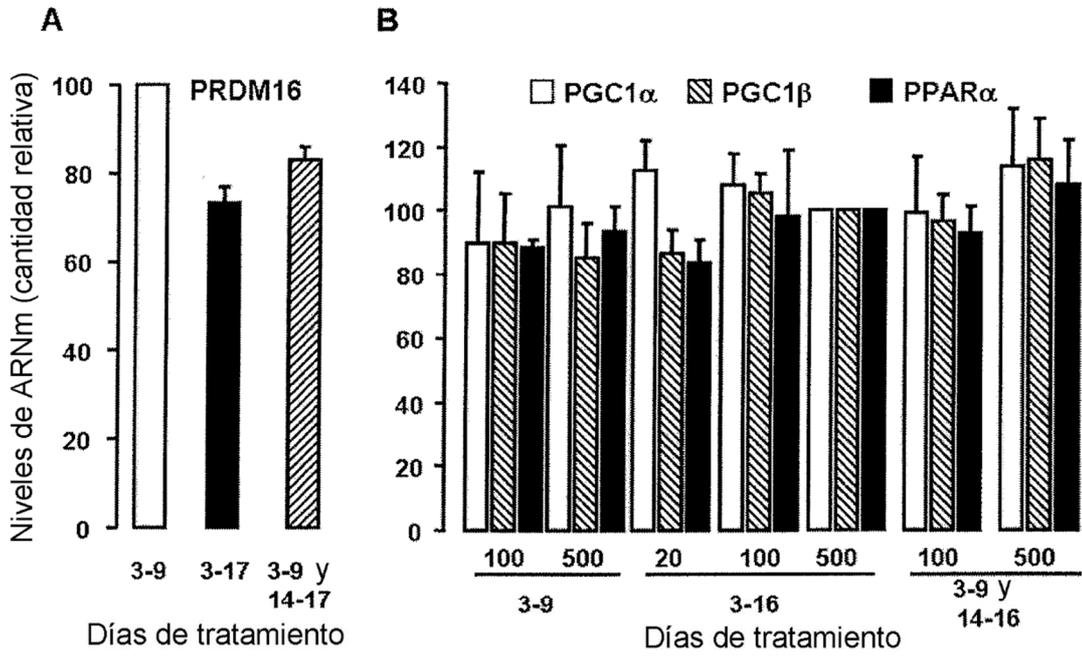


Figura 6

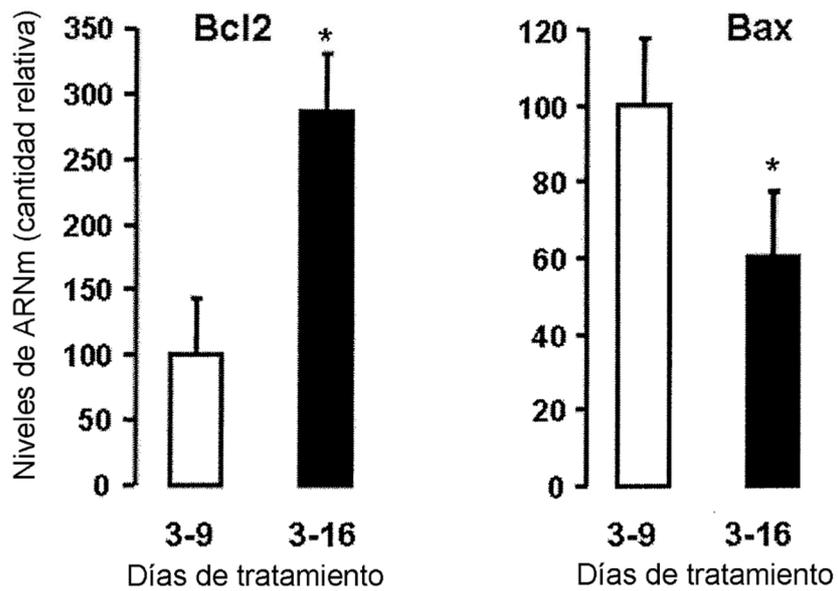


Figura 7

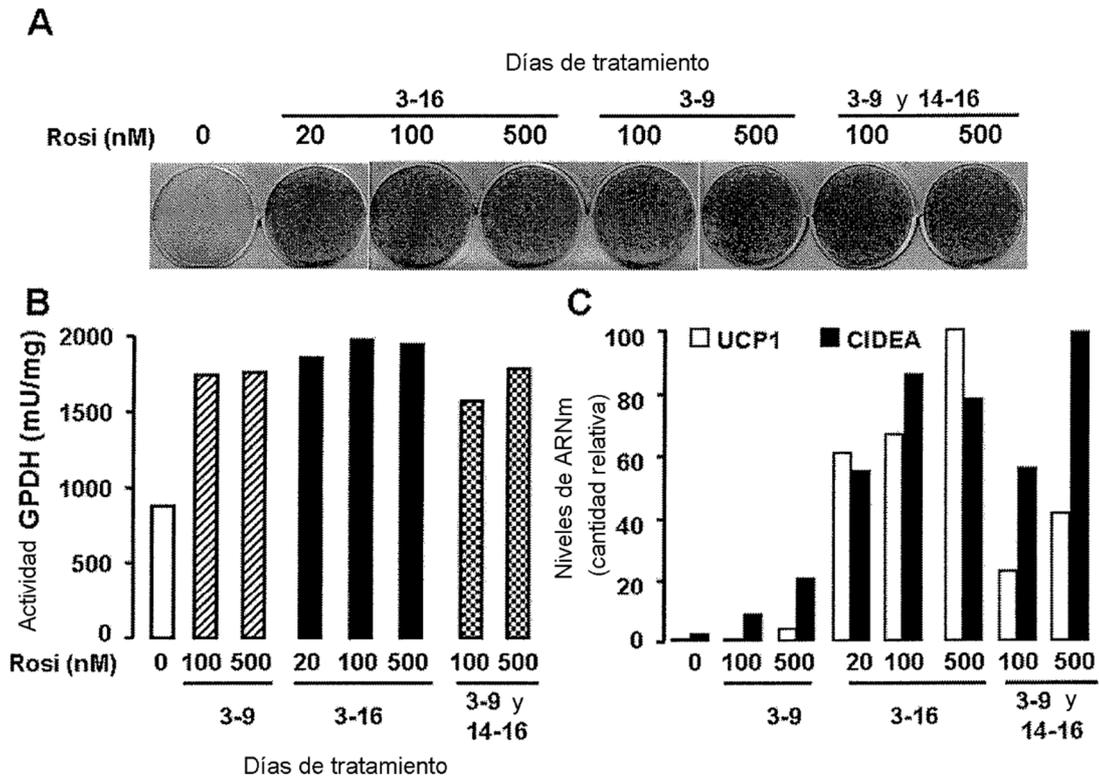


Figura 8